

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

EL ETANOL INDUCE DAÑO INFLAMATORIO EN HÍGADO
Y CEREBRO : PAPEL DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN
ASOCIADA A LOS RECEPTORES IL-1RI/TLR4

ANA MARÍA BLANCO SÁNCHEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de Maig de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Juan José Sastre Benlloch
- D. Vicente Felipo Orts
- D. Erwin Knecht Roberto
- D. Juan Carlos Leza Cerro
- D. José Enrique O'Connor Blasco

Va ser dirigida per:

D^a. Consuelo Guerri Sirera

D^a. Soraya Valles Martí

©Copyright: Servei de Publicacions

Ana María Blanco Sánchez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6830-5

Edita: Universitat de València

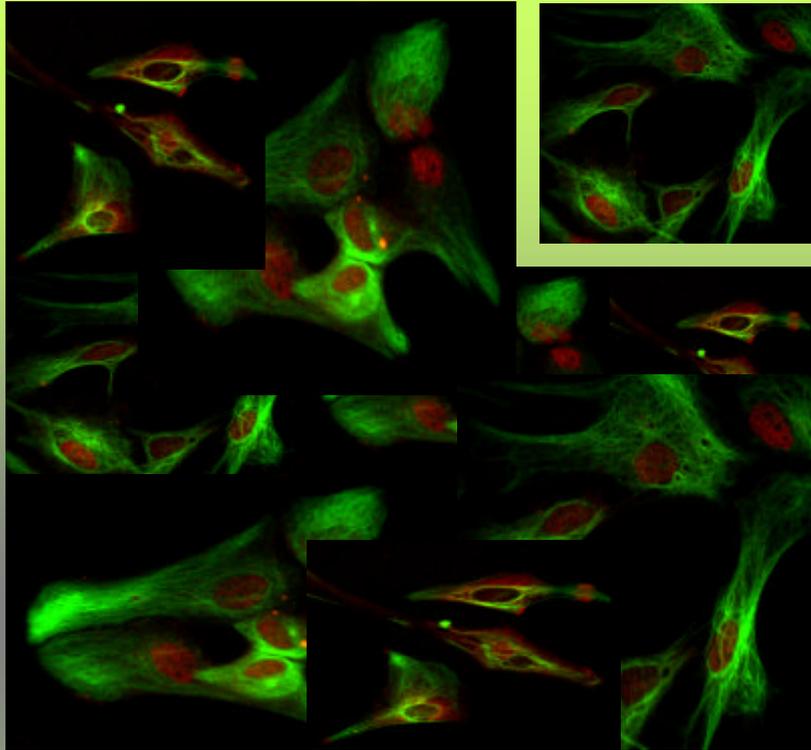
Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



Departamento de Fisiología. Universitat de València.



**EL ETANOL INDUCE DAÑO INFLAMATORIO EN HÍGADO Y CEREBRO:
PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADA A LOS RECEPTORES
IL-1RI/TLR4.**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR: Ana María Blanco Sánchez
DIRIGIDA POR: Dra. Consuelo Guerri Sirera
Dra. Soraya Vallés Martí



Valencia, Mayo 2007



Departamento de Fisiología

Dra. **Consuelo Guerri Sirera**, Investigadora y Jefe del Laboratorio de Patología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

Dra. **Soraya Vallés Marti**, Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D^a. Ana María Blanco Sánchez que lleva por título "El etanol induce daño inflamatorio en hígado y cerebro: papel de la vía de señalización asociada a los receptores IL-1RI/TLR4" ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, a 30 de Marzo de 2007

Fdo. Dra. Consuelo Guerri Sirera

Fdo: Dra. Soraya Vallés Marti

ÍNDICE	Pág.
Abreviaturas.....	9
<u>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN</u>	15
1.1. PAPEL DE LA INFLAMACIÓN Y EL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL DESARROLLO DEL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR EL ALCOHOL.....	15
1.2. INFLAMACIÓN Y RESPUESTA INMUNE EN EL SNC: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLRs Y SU SEÑALIZACIÓN.....	20
1.2.1. Papel de la inflamación en el daño cerebral.....	20
1.2.2. El Sistema Inmune Innato en el SNC: papel de la señalización intracelular de los receptores TLR4/IL-1Rl.....	24
1.2.3. Etanol y sistema inmune innato.....	30
1.3. FUNCIÓN DE LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFTS</i> EN SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y ENDOCITOSIS.....	32
<u>Capítulo 2: OBJETIVOS</u>	41
<u>Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS</u>	45
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	45
3.1.1. Animales con dieta líquida.....	45

3.1.2. Animales con dieta sólida.....	47
3.2. CULTIVOS CELULARES.....	48
3.2.1. Cultivo primario de hepatocitos.....	48
3.2.2. Cultivo primario de astrocitos.....	49
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS DE ETANOL EN LOS CULTIVOS CELULARES.....	50
3.3.1. Tratamientos de etanol y protocolo experimental en cultivos primarios de hepatocitos.....	51
3.3.2. Tratamientos de etanol y protocolo experimental en cultivos primarios de astrocitos.....	51
3.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y TISULARES.....	53
3.4.1. Aislamiento de fracciones subcelulares hepáticas.....	53
3.4.2. Obtención del lisado de hepatocitos.....	53
3.4.3. Aislamiento de fracciones subcelulares de astrocitos.....	54
3.4.4. Obtención del lisado de corteza cerebral y astrocitos.....	54
3.5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS: ANÁLISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA, INMUNOPRECIPITACIÓN / ENSAYO QUINASA <i>IN VITRO</i> Y ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL DE RETARDO.....	55
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	55
3.5.2. Inmunoprecipitación y ensayo quinasa <i>in vitro</i>	57
3.5.3. Ensayo de movilidad electroforética en gel de retardo (EMSA).....	58
3.6. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA.....	60

3.7. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS (IL-1b y TNF-a) Y ANTI-INFLAMATORIAS (IL-10).....	61
3.8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm de LOS RECEPTORES IL-1RI E IL-10R Y DE LAS PROTEÍNAS INFLAMATORIAS iNOS Y COX-2 MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)..	62
3.9. MEDIDA DE APOPTOSIS Y CASPASA-3.....	63
3.10. AISLAMIENTO DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA <i>LIPID RAFTS</i> EN AUSENCIA DE DETERGENTE: USO DE Na ₂ CO ₃ pH 11.....	63
3.11. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	65

Capítulo 4: RESULTADOS **69**

4.1. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INDUCE DAÑO INFLAMATORIO EN EL HÍGADO Y ACTIVA LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ASOCIADAS A IL-1b Y A LA ENDOTOXINA LPS.....	69
4.1.1. El consumo de alcohol causa daño hepático e incrementa los niveles de IL-1b, TNF-a e IL-10 en suero: efecto de la administración de LPS.	69
4.1.2. La estimulación de hepatocitos en cultivo con etanol o LPS causa liberación de citoquinas inflamatorias.....	72
4.1.3. El consumo de alcohol afecta a los niveles de IL-1RI en hígado y en hepatocitos en cultivo.....	75
4.1.4. El consumo crónico de alcohol induce la fosforilación de las quinasas IRAK y ERK ^{1/2} en hepatocitos.....	77

4.1.5. El consumo crónico de alcohol induce la activación del factor de transcripción NF- κ B en hepatocitos en cultivo79

4.2. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INDUCE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y MUERTE CELULAR EN CORTEZA CEREBRAL Y EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO82

4.2.1. El tratamiento con etanol incrementa los niveles de IL-1 β , la expresión de IL-1RI, así como la fosforilación de IRAK, en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo82

4.2.2. La exposición crónica al alcohol estimula en corteza cerebral y en astrocitos corticales, la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$, p38/MAPK y JNK/SAPK...84

4.2.3. El consumo de alcohol induce la expresión de los mediadores inflamatorios, iNOS y COX-2 en corteza cerebral y en astrocitos.....86

4.2.4. El tratamiento crónico con etanol induce la activación y unión al ADN de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 en corteza cerebral y en astrocitos.....88

4.2.5. El consumo crónico de alcohol aumenta la expresión de caspasa-3 y la muerte celular por apoptosis en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo90

4.3. EL TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL INDUCE LA EXPRESIÓN DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS iNOS Y COX-2, A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN ASTROCITOS EN CULTIVO91

4.3.1. El etanol induce un máximo de expresión de iNOS y COX-2 a 30 min y a 24 h, tanto a nivel proteico como de ARNm en astrocitos en cultivo primario.....91

4.3.2. El tratamiento agudo con etanol induce la activación y unión al ADN del factor de transcripción NF- κ B, a 30 min y 24 h en astrocitos en cultivo primario.....	93
4.3.3. La estimulación de iNOS y COX-2 inducida por el etanol está mediada por una activación de NF- κ B en astrocitos.....	95
4.4. LOS RECEPTORES TLR4/IL-1RI ESTÁN IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y MUERTE CELULAR CAUSADAS POR EL ETANOL EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.....	97
4.4.1. El etanol induce una activación rápida de la cascada de señalización intracelular asociada a TLR4/IL-1RI en astrocitos.....	97
4.4.2. El tratamiento agudo de etanol incrementa los niveles de NF- κ B, y causa muerte celular por apoptosis en astrocitos.....	100
4.4.3. El bloqueo de los receptores TLR4 e IL-1RI previene la activación de MAP quinasas, mediadores inflamatorios y muerte celular inducida por el etanol en astrocitos en cultivo.....	104
4.4.4. Los anticuerpos bloqueantes anti-TLR4 y anti-IL-1RI inhiben la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 producida por el etanol en astrocitos.....	109
4.5. EL ETANOL FACILITA EL RECLUTAMIENTO DE LOS RECEPTORES TLR4/IL-1RI EN LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA (<i>LIPID RAFTS</i>), CONLLEVANDO A UN AUMENTO EN SU RESPUESTA Y SEÑALIZACIÓN, EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.....	111
4.5.1. Uso de flotilina-1 y caveolina-1 como marcadores de <i>lipid rafts</i> en astrocitos en cultivo primario.....	111
4.5.2. El etanol induce el reclutamiento y traslocación de los receptores TLR4 e IL-1RI en los <i>lipid rafts</i> en astrocitos en cultivo.....	113

4.5.3. Tanto el tratamiento con LPS, como con etanol, induce una señalización del receptor TLR4 independiente de MyD88 en astrocitos en cultivo primario.....	114
4.5.4. El etanol induce el reclutamiento y activación de las quinasas IRAK y pERK en los <i>lipid rafts</i> en astrocitos en cultivo.....	115
4.6. EL ETANOL INDUCE LA INTERNALIZACIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR IL-1RI A TRAVÉS DE LA FUSIÓN DE VESÍCULAS CAVEOLARES Y CAVEOSOMAS, A LA MEMBRANA DE ENDOSOMAS DE GRAN TAMAÑO DEPENDIENTES DE CLATRINA.....	123

Capítulo 5: DISCUSIÓN **131**

5.1. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INDUCE DAÑO HEPÁTICO: PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LPS e IL-1b EN HEPATOCITOS.....	131
5.2. EL ETANOL INDUCE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y MUERTE CELULAR EN CORTEZA CEREBRAL Y EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.....	136
5.2.1. Etanol y daño cerebral: papel de los mediadores inflamatorios.....	137
5.2.2. El etanol estimula la cascada de señalización y los factores de transcripción asociados a la activación de los receptores TLRs: implicación en el daño inflamatorio cerebral inducido por el alcohol.....	143

5.3. ALCOHOL Y NEUROINFLAMACIÓN: ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES TLR4 e IL-1RI Y SU SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR, A TRAVÉS DE SU RECLUTAMIENTO EN LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS*.148

5.3.1. Implicación de los receptores TLR4 e IL-1RI en la respuesta inflamatoria inducida por el etanol en astrocitos.....148

5.3.2. Papel de los microdominios de membrana *lipid rafts* en el efecto del alcohol sobre los receptores TLR4 e IL-1RI y su señalización.....155

5.3.3. El etanol induce la internalización y señalización del receptor IL-1RI a través del ensamblaje y tráfico intracelular de vesículas caveolares...162

5.3.4. Perspectivas.....169

Capítulo 6: CONCLUSIONES **173**

Capítulo 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **177**

ABREVIATURAS

AcP: proteína accesoria
ADN: ácido desoxirribonucleico
ALT: alanino aminotransferasa
AP-1: proteína activadora tipo 1
ARNm: ácido ribonucleico tipo mensajero
ARNsi: ARN silenciador
AST: aspartato aminotransferasa
ATP: adenosina tri-fosfato
BBB: Barrera Hematoencefálica
BSA: suero albúmina bovina
COX-2: ciclo-oxigenasa tipo 2
cpm: cuentas por minuto
CPS I: carbamil fosfato sintetasa tipo I
CT-B: subunidad B de la toxina colérica
CYP2E1: citocromo P 450 tipo 2E1
DMEM: Dulbecco's modified eagle's médium
DMSO: Dimetil sulfóxido
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EEA1: proteína de endosomas tempranos
EGTA: ácido tetraacético + etilenglicol
ER: retículo endoplásmico
ERK½: quinasa regulada por señales extracelulares
GFAP: proteína acídica fibrilar de la glía
gr: gramos
h: horas
HRP: peroxidasa de rábano
IFN-a: interferón tipo alfa
IFN-b: interferón tipo beta
IFN-g: interferón tipo gamma
IKK: quinasa asociada al complejo I κ B- α
IL-6: interleuquina tipo 6
IL-8: interleuquina tipo 8
IL-10: interleuquina tipo 10
IL-1b: interleuquina-1 tipo beta
IL-1RI: receptor de interleuquina-1-beta tipo I

IL-10R: receptor de IL-10
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
IRAK: protein-quinasa asociada al receptor IL-1RI
IRF-3: factor regulador de interferón
JNK: quinasa c-jun del extremo N-terminal
L: litros
LPS: lipopolisacárido
LTA: ácido lipoteicoico
min: minutos
M: molar
MAP-2: proteína asociada a microtúbulos
MAPKs: protein-quinasas activadas por mitógenos
MBP: proteína básica de la mielina
MES: ácido 2-morfolino-etanosulfónico
MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
ml: mililitros
mm: milímetros
mM: milimolar
μl: microlitros
μm: micrómetros
MyD88: proteína adaptadora derivada del mieloides
NF-κB: factor nuclear kappa tipo B
ng: nanogramos
NIK: quinasa inductora de NF-κB
NK: células *natural killers*
NO: óxido nítrico
OTC: ornitina transcarbamilasa
p38: quinasa p38
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
PBS: tampón fosfato salino
PDTC: pirrolidino ditiocarbamato
pg: picogramos
PGN: peptidoglicano
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro
PVDF: difluoruro de polivinilideno
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
SAPK: protein-quinasa asociada a estrés

SBF: suero bovino fetal
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: SDS-electroforesis en geles de poliacrilamida
SNC: Sistema Nervioso Central
T.A.: temperatura ambiente
TAB: proteína unida a TAK
TAK-1: quinasa activada tipo 1 del factor TGF- β
TBS: tampón tris salino
TGF- β : factor de crecimiento transformante tipo beta
TIR: dominio Toll-IL-1R
TLR4: receptor Toll-like tipo 4
TLRs: receptores Toll-like
TNF- α : factor de necrosis tumoral tipo alfa
Traf-6: factor asociado al receptor de TNF- α tipo 6
TRIF: factor Toll-IL-1R
TRITC: rodamina
V: voltios
v/v: volumen/volumen
w/v: peso/volumen

1. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

1.1. PAPEL DE LA INFLAMACIÓN Y EL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL DESARROLLO DEL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR EL ALCOHOL.

La asociación entre consumo de alcohol y daño hepático está bien establecida y se conoce desde hace muchos años. De hecho, numerosos datos clínicos y epidemiológicos, indican que existe una relación directa entre el consumo de alcohol y la mortalidad por enfermedad hepática. La aparición de hepatopatía alcohólica parece estar relacionada con un umbral de consumo que se estima en 80-100 gr/día durante 10-20 años. El espectro de la enfermedad hepática alcohólica varía desde la presencia de un proceso benigno de hígado graso, sin inflamación ni fibrosis, hasta el desarrollo de formas más severas de enfermedad como la hepatitis alcohólica, la formación de fibrosis, y finalmente, la progresión a cirrosis con sus complicaciones de insuficiencia hepática y riesgo de hepatocarcinoma (Nagy, 2003).

La esteatosis hepática consiste en una acumulación de grasa (triglicéridos) en el hígado como consecuencia del daño hepático. En este caso, el paciente apenas tiene síntomas o presenta molestias inespecíficas, aunque en general existe una hepatomegalia y las pruebas analíticas se encuentran alteradas. En la hepatitis alcohólica, el daño hepático se asocia con inflamación y destrucción de las células del hígado; aparece más bruscamente y puede ser muy grave. Finalmente, la cirrosis se asocia con una importante destrucción de células hepáticas y con un marcado proceso de cicatrización (fibrosis), que altera de forma importante la arquitectura del hígado, llegando a comprometer sus funciones (Tilg and Diehl, 2000).

Sin embargo, es importante destacar que aunque el consumo de alcohol siempre conlleva a daño hepático, la incidencia de cirrosis alcohólica es relativamente baja (15-20%), lo que hace pensar que existen factores asociados (genéticos, inmunes, ambientales, nutritivos), que contribuyen al daño hepático relacionado con la ingesta de alcohol.

Así, está establecido que el etanol es un hepatotóxico y su consumo causa graves alteraciones a nivel bioquímico, fisiológico y funcional en el hepatocito (Blondell et al., 1996; Lands, 1995; Tsukamoto and Lu, 2001). Sin embargo, a pesar de los numerosos avances realizados en la última década, no están totalmente esclarecidos los mecanismos que participan en la progresión y en el daño que ocurren en la hepatopatía alcohólica, y que pueden conducir a cirrosis. La hepatopatía alcohólica es un proceso multifactorial, con participación de diferentes mecanismos, entre los que merecen destacar: 1) Producción y toxicidad del acetaldehído (Lieber, 2004), 2) aumento de radicales libres (Tsukamoto and Lu, 2001), con disminución de los niveles de glutathion mitocondrial e hipoxia en la zona centrilobular del hígado (Fernandez-Checa, 2003; Minana et al., 2002) y 3) inflamación y aumento en la expresión/metabolismo de citoquinas (Arteel, 2003; Molina et al., 2002). Este último mecanismo se le ha dado una especial relevancia durante los últimos años, ya que diferentes trabajos han demostrado una asociación entre hepatopatía alcohólica, incluyendo cirrosis, y aumentos en los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias (Bunout et al., 1996; Khoruts et al., 1991; McClain et al., 1999; Valles et al., 2003), sugiriendo que estas citoquinas causarían daño en el parénquima hepático y muerte del hepatocito (Bode and Bode, 2005; Tsukamoto and Lu, 2001).

En los procesos inflamatorios hepáticos, las citoquinas TNF- α e IL-1 β inician la cascada inflamatoria, actúan de forma sinérgica (Dinarelo, 2000) y desempeñan un papel clave en la patogénesis de muchos procesos inflamatorios, incluyendo el que se produce en la hepatopatía alcohólica (Kishore et al., 2002; McClain et al., 1999). De hecho, se ha encontrado aumento en los niveles plasmáticos de estas dos citoquinas en pacientes con hepatitis alcohólica y cirrosis (Khoruts et al., 1991; Shimada et al., 1993). El mecanismo que subyace a la liberación de citoquinas, se desconoce, aunque diversos estudios han demostrado que el consumo de alcohol induce tanto proliferación bacteriana intestinal, como la liberación de la endotoxina LPS (toxina procedente de la membrana de las bacterias Gram-negativas) al torrente circulatorio, lo que podría explicar el aumento de esta toxina en el plasma de alcohólicos (Bode et al., 1987; Fukui et al., 1991). Se ha sugerido que un aumento en los niveles de LPS jugaría un papel esencial en el desarrollo del daño hepático asociado al consumo de alcohol (Bode and Bode, 2005), ya que el LPS es capaz de exacerbar la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por los macrófagos e incrementar la activación de la respuesta inflamatoria y daño hepático (Adachi et al., 1995; Nanji et al., 1993).

La mayoría de los estudios sugieren que el etanol de forma directa o indirecta, a través de la liberación del LPS, estimularía a las células de Kupffer, o macrófagos residentes en el hígado, las cuales responderían rápida y eficientemente, liberando TNF- α al parénquima hepático y al suero, y produciendo daño inflamatorio asociado al consumo de alcohol (Bode and Bode, 2005). La demostración más clara del papel del LPS bacteriano en la hepatopatía alcohólica experimental, se pudo demostrar tras la

administración de antibióticos a ratas expuestas al alcohol por vía intragástrica. Este tratamiento redujo, tanto los niveles de TNF- α , como el daño hepático inducido por el etanol, sugiriendo que el aumento de TNF- α estaba, en parte mediado, por un aumento de LPS bacteriano (Nagy, 2003).

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que demuestran que tras un estímulo, la citoquina TNF- α se libera junto con la IL-1 β , no se ha considerado el posible papel de IL-1 β , y su potenciación con el LPS en la patogenia de la hepatopatía alcohólica. Al mismo tiempo, evidencias recientes indican que los receptores IL-1RI (cuyo ligando es la IL-1 β) y TLR4 (cuyo ligando es el LPS), pertenecientes a la superfamilia de los receptores TLR-IL-1R, desempeñan un papel clave, tanto en la respuesta del sistema inmune innato, como en el daño hepático inducido por el alcohol (Nagy, 2003). Así, se ha demostrado que el consumo crónico con etanol, incrementa la expresión (ARNm y proteína) del receptor TLR4, y de su proteína asociada CD14, en modelos murinos de exposición al etanol (Jarvelainen et al., 1999; Jarvelainen et al., 2001; Kishore et al., 2002). Además, en experimentos realizados con ratones mutantes que no expresan TLR4 (C3H/HeJ), se observó una disminución de la sensibilización de estos animales a la endotoxina (Poltorak et al., 1998), así como una disminución del daño hepático inducido por la exposición crónica de etanol (Uesugi et al., 2001b). Estos estudios demuestran que los receptores TLRs son esenciales para el desarrollo de la hepatopatía alcohólica en ratones, pero existe poca información acerca de cómo el consumo crónico de alcohol puede regular la expresión y actividad de estos receptores.

Como veremos más adelante en otros apartados de la Introducción (Sección 1.2.2), la activación de los receptores TLR4 e IL-1RI, conlleva a la

estimulación de una cascada de señalización intracelular, que se inicia con la fosforilación de la quinasa asociada al receptor de IL-1RI (IRAK) (Huang et al., 1997), que desencadena la activación de otras quinasas citoplásmicas (MAPKs) y la activación del factor de transcripción NF- κ B (MacGillivray et al., 2000) (ver Esquema 2).

Algunos estudios han demostrado que la exposición aguda al etanol, aumenta la fosforilación de IRAK en células de Kupffer, pero no se ha llegado a esclarecer si el LPS potencia la respuesta en la fosforilación de IRAK inducida por el etanol (Yamashina et al., 2000). Estudios recientes también demuestran que el alcohol incrementa la actividad de ERK1/2 y p38 (MAPKs) inducida por LPS en células de Kupffer (Cao et al., 2002; Kishore et al., 2002). En estos trabajos, se muestra que el aumento en la activación de ERK1/2 se asocia a un incremento en la liberación de TNF- α (Kishore et al., 2002).

La estimulación de NF- κ B y de genes dependientes a este factor de transcripción, está implicada en la respuesta asociada a los receptores TLRs, y es un factor necesario en la activación de la respuesta inflamatoria en hígado, ya que se ha observado que la unión al ADN y activación de NF- κ B, está incrementada en modelos experimentales de hepatopatía alcohólica (Nanji et al., 1999; Tsukamoto et al., 1999). Estos trabajos también proponen que esta respuesta puede ocurrir principalmente en las células de Kupffer (Nanji et al., 1999) y precede a la aparición del daño hepático (Jokelainen et al., 2001). La importancia fisiológica de la activación de NF- κ B en el daño hepático inducido por el etanol, se ha demostrado en un estudio realizado en ratas alcoholizadas, donde la inhibición de NF- κ B, previene la aparición de este daño (Uesugi et al., 2001a). Numerosos estudios indican que los

radicales libres de oxígeno (ROS), además de la estimulación de los receptores TLRs, puede ser un factor crítico en la activación de NF- κ B en hígados de ratas alcohólicas (Nanji et al., 2003) y en células de Kupffer (Cao et al., 2002).

En resumen, trabajos recientes indican que muchos de los intermediarios en la señal de transducción asociada a la respuesta inflamatoria y del sistema inmune innato, son esenciales en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica. En particular, la activación de los receptores estimulados por IL-1 β y LPS, como son IL-1RI y TLR4 respectivamente, interviene en la inflamación y daño celular en modelos experimentales de exposición al etanol. Alteraciones en el epitelio intestinal inducidas por el etanol y un aumento en la liberación de LPS, pueden jugar un papel esencial en la activación de la respuesta inflamatoria en el hígado. El entendimiento de los mecanismos moleculares por los que el etanol produce una alteración de la respuesta inmune innata en el hígado, facilitaría el desarrollo de nuevas terapias y estrategias terapéuticas, para prevenir, o incluso eliminar la progresión del daño hepático inducido por el alcohol.

1.2. INFLAMACIÓN Y RESPUESTA INMUNE EN EL SNC: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLRs Y SU SEÑALIZACIÓN.

1.2.1. Papel de la inflamación en el daño cerebral.

La inflamación es un proceso de respuesta defensiva contra lesiones, isquemia celular, respuestas autoinmunes o infecciones, produciendo una secuencia de eventos generalizados, conocida como respuesta de fase aguda, la cual puede limitar la proliferación de patógenos invasores. Sin

embargo, mientras la respuesta inflamatoria, tanto local como generalizada, ofrece claros beneficios en estados infecciosos, una inflamación inapropiada y sostenida, puede causar numerosas enfermedades, como la artritis reumatoide o la psoriasis. La inflamación, además, es también importante en el daño causado por enfermedades autoinmunes, y fundamentalmente contribuye a otras enfermedades como el cáncer, diabetes y daños cardiovasculares (Dalglish and O'Byrne, 2006; Tedgui and Mallat, 2006).

El Sistema Nervioso Central (SNC) se ha considerado como un órgano inmunológicamente privilegiado. El cerebro coordina y regula numerosos aspectos de la respuesta defensiva, que podrían explicar los efectos en el comportamiento derivados de enfermedades, tales como fatiga y depresión (Lucas et al., 2006). Además, trabajos recientes, indican que la inflamación representa un factor patogénico en muchas enfermedades del SNC, como enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson (Hunot and Hirsch, 2003), Alzheimer (Giovannini et al., 2003), Creutzfeldt-Jacob (Stoeck et al., 2006), y más recientemente, en algunas enfermedades psiquiátricas, tales como la depresión, ansiedad y esquizofrenia (Lucas et al., 2006). En estas enfermedades, la inflamación es atípica y ocurre en ausencia de infiltración de leucocitos (Perry et al., 2002).

No hay duda de que el cerebro, difiere significativamente de otros tejidos en cuanto a su respuesta a la infección o inflamación. Un ejemplo evidente en esta respuesta, es el reclutamiento de leucocitos que es rápido en órganos sistémicos, pero modesto y disminuído en el cerebro. Asimismo, el cerebro presenta unas características únicas ante la inflamación, y en respuesta a estímulos agudos, las células gliales liberan en pocos minutos,

mediadores inflamatorios que pueden causar daño neural (Lucas et al., 2006).

La glía, particularmente la microglía y los astrocitos, son responsables de las funciones inmunes en el cerebro, y juegan un importante papel en la respuesta inflamatoria. La microglía, o macrófagos parenquimales del cerebro, son rápidamente estimulados en respuesta a cualquier lesión o infección, y su morfología cambia adquiriendo una serie de funciones, incluyendo la fagocitosis, aumento de moléculas de la membrana celular, y la producción y secreción de mediadores inflamatorios (Hanisch, 2002). Los astrocitos desempeñan también un papel importante en la respuesta inmune, contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BBB) (Prat et al., 2001) y modulando la migración de monocitos y linfocitos a través de la BBB (Weiss and Berman, 1998). Los astrocitos también responden de forma rápida ante un daño, y parecen jugar un papel muy importante en la regulación de la inflamación cerebral (Dietrich et al., 2003). De hecho, el daño cerebral se acompaña, en muchos casos, de una hipertrofia astrocítica que se asocia con proliferación celular y expresión de ciertos genes, y que comúnmente se le refiere como astrogliosis reactiva (Ridet et al., 1997). Esta astrogliosis se asocia con procesos de inflamación (Little and O'Callagha, 2001). Dependiendo del contexto, la astrogliosis puede ser un evento positivo que promueve la supervivencia neuronal y glial, a través de la producción de neurotrofinas y factores de crecimiento, pero a su vez puede tener una influencia negativa en la regeneración a través de la inhibición del crecimiento y la migración neuronal y glial (Little and O'Callagha, 2001). La naturaleza difusa de la astrogliosis reactiva en el SNC, sugiere la implicación de mediadores solubles, tales como citoquinas y/o la

presencia de un sincitio integrado de astrocitos que permite la transferencia de información a distancias muy remotas dentro del cerebro.

Las citoquinas que intervienen en la iniciación y modulación de la gliosis reactiva, incluyen IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y TGF- β . Las células gliales expresan receptores para todas estas citoquinas, y cada uno de ellos posee un papel funcional diferente en la respuesta del astrocito (John et al., 2005). La estimulación de los astrocitos en respuesta a un proceso neuropatológico, conlleva a la activación de la respuesta inmune innata, produciendo citoquinas inflamatorias y radicales libres, así como a la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad II (MHC II) (Dong and Benveniste, 2001). Esta reprogramación funcional puede ser esencial para el mantenimiento de la homeostasis, y la regulación local de respuestas inflamatorias e inmunes (Benveniste, 1998). De todas estas citoquinas, la IL-1 β , ha sido considerada como un mediador esencial en la respuesta inflamatoria del SNC. De hecho, la IL-1 β , se ha implicado en un gran número de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Mrak and Griffin, 2005), y se sabe que en condiciones de daño cerebral, lesión o estrés, esta citoquina se produce de forma masiva en el cerebro (Patel et al., 2003). Aunque los mecanismos de estos efectos no están esclarecidos, parece que la IL-1 β es liberada inicialmente por células gliales, y a su vez, actúa sobre los astrocitos y la microglía para la producción de citoquinas adicionales y factores de crecimiento, promocionando la actividad inflamatoria en el cerebro (Benveniste, 1992; Merrill and Benveniste, 1996).

Finalmente, aunque muchos trabajos sugieren que la inflamación contribuye al desarrollo de numerosas enfermedades del SNC, existe

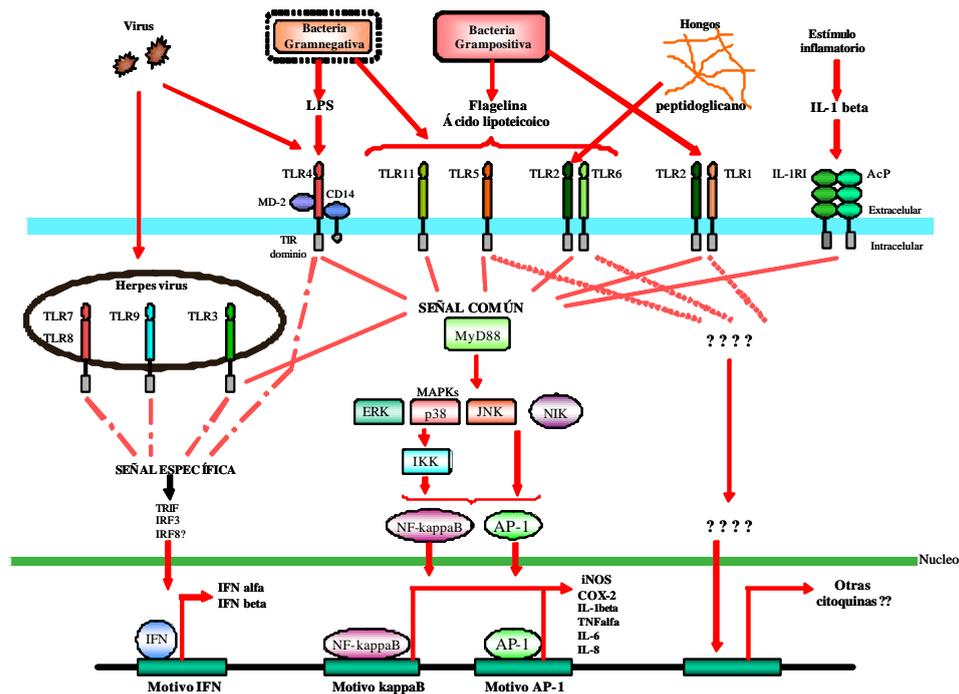
controversia en cuanto a si la neuroinflamación y la activación glial puede ser beneficiosa o perjudicial. Además, muchos mediadores producidos como resultado de una activación microglial y astrogial tienen un papel dual; pueden ser neuroprotectores, o neurotóxicos, interviniendo en la reparación o en el daño a largo plazo. Por ello, es necesario profundizar en los mecanismos responsables de la respuesta glial, ya que nos permitirá identificar terapias potenciales que selectivamente repararán el daño cerebral.

1.2.2. El Sistema Inmune Innato en el SNC: papel de la señalización intracelular de los receptores TLR4/IL-1RI.

El sistema inmune está subdividido en dos ramas interactivas, el sistema inmune innato (celular) y adaptativo (humoral). Ambos sistemas participan en la respuesta infecciosa y autoinmune en el SNC. En general, la inmunidad innata representa la primera línea de defensa frente a patógenos, y no requiere una exposición preliminar a antígenos foráneos para que sea activada. Los tipos celulares que participan en el sistema inmune innato incluyen macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK y microglía, además de macrófagos perivasculares en el SNC. En contraposición, la inducción de la inmunidad adaptativa, requiere señales procedentes del sistema inmune innato, que facilita la expansión de antígenos-específicos T y linfocitos B, que son importantes en la producción de anticuerpos y la formación de células de memoria de larga vida.

Las células del sistema inmune innato no son capaces de reconocer cualquier antígeno, ya que reconocen estructuras altamente conservadas y expresadas por un gran grupo de microorganismos. Estos motivos

estructurales altamente conservados se refieren como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Los receptores del sistema inmune innato que reconocen estas moléculas se conocen como receptores Toll-like (TLRs). Hasta el momento, han sido identificados en humanos 11 receptores TLRs, mientras que en el genoma del ratón se han identificado 13 TLRs. Los TLRs 1-9 están conservados en las dos especies y todos ellos comparten un dominio citosólico común, denominado TIR (Dunne and O'Neill, 2003). De los 11 TLRs humanos, los TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 11 se expresan en la membrana extracelular, en oposición a la localización intracelular de los TLRs 3, 7, 8 y 9 (Akira and Sato, 2003; Kopp and Medzhitov, 2003; Takeda and Akira, 2005). Cada TLRs reconoce componentes específicos de patógenos bacterianos y fúngicos, aunque evidencias recientes indican que también están implicados en el reconocimiento viral. Por tanto, tanto TLR3 como TLR4 se engloban dentro de los receptores que reconocen virus, y utilizan también una vía de señalización intracelular que es independiente de MyD88 (proteína adaptadora derivada del mielóide) (Wesche et al., 1997), y mediante la unión de la proteína adaptadora TRIF (factor Toll-IL-1R), regula la activación de IRF-3 (factor de regulación del interferón) y consiguiente estimulación de interferón α y β (IFN- α y - β) (Doyle et al., 2002) (ver Esquema 1).



Esquema 1. Representación esquemática de la señalización intracelular de los receptores Toll-like (TLRs). Cada TLRs reconoce componentes específicos de patógenos bacterianos y fúngicos, LPS (bacterias Gram-negativas), PGN y LTA (bacterias Gram-positivas). Todos los receptores TLRs, excepto TLR3, 7, 8 y 9, comparten la vía MyD88-dependiente, que culmina en la activación de NF- κ B y AP-1, via MAPKs/NIK, conllevando a la inducción de mediadores inflamatorios (iNOS, COX-2) y citoquinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8). TLR3 y TLR4 parecen estar implicados en el reconocimiento viral, y activan IRF-3 (interferon regulatory factor-3), que conlleva a la inducción de genes IRF-3 dependientes, tales como interferón- α y - β (IFN). Aunque todos los TLRs comparten el dominio citoplásmico TIR, la estimulación de estos receptores conlleva a la homodimerización, heterodimerización o multimerización de los TLRs para la señalización. TLR4 e IL-1RI adicionalmente reclutan moléculas adaptadoras, tales como MD-2 y CD14 (para TLR4) y AcP "Accessory protein" (para IL-1RI), que son esenciales para su respuesta y señalización.

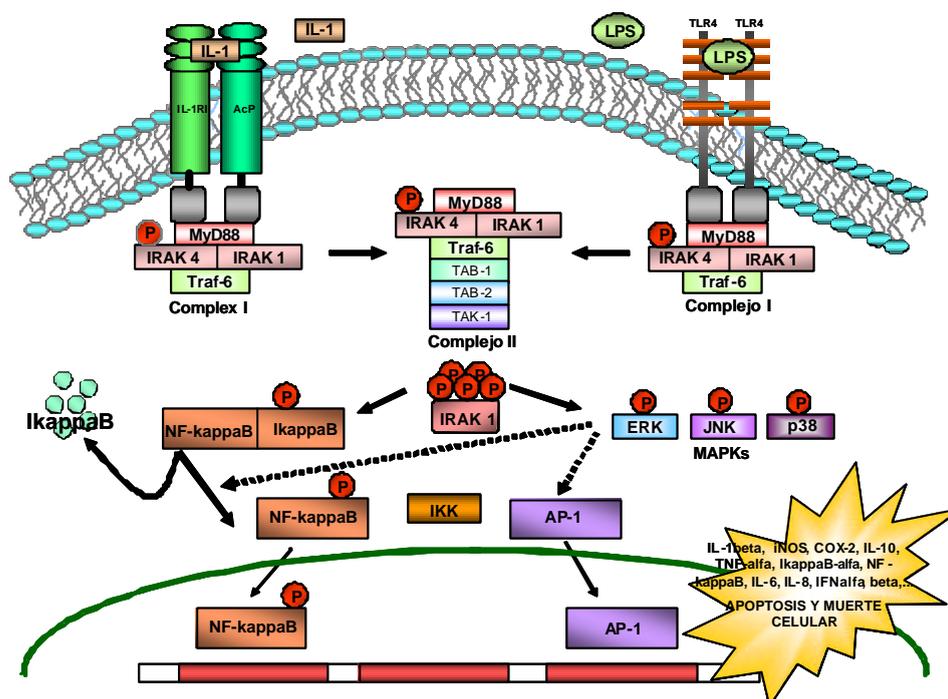
De todos los receptores TLRs, el primero que se identificó en humanos fue el TLR4. Su ligando específico es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), el componente mayoritario en la pared celular de las bacterias gram-negativas, y la cascada de señalización que desencadena, ha sido extensamente estudiada durante los últimos años (Dunne and O'Neill, 2003).

Es interesante resaltar, que las vías de señalización intracelular que se activan con los TLRs, son similares a las que se generan por la unión de IL-1 β a su receptor IL-1RI. De hecho, se ha demostrado que los receptores TLRs son miembros de una gran superfamilia que incluye los receptores de interleuquina-1 (IL-1Rs) (Akira and Takeda, 2004; O'Neill and Dinarello, 2000). Los TLRs e IL-1Rs tienen regiones conservadas de aproximadamente 200 aminoácidos en su parte citoplasmática, la cual es conocida como dominio Toll-IL-1R (TIR) (Akira and Takeda, 2004; Kurt-Jones et al., 2000). En contraste, la región extracelular de los TLRs e IL-1Rs difieren de forma marcada (Takeda and Akira, 2004).

La activación de los receptores TLRs e IL-1Rs conlleva a una señalización intracelular similar, ya que comparten moléculas asociadas a la señalización, que culminan en la estimulación del factor de transcripción NF- κ B, implicado en la regulación de un gran número de genes envueltos en la respuesta inmune. La señal de transducción de IL-1Rs y TLRs, ocurre a través de unas complejas interacciones entre proteínas, entre las que merecen destacar las quinasas asociadas a mitógenos (MAPK), tales como la quinasa de regulación extracelular (ERK1/2), p38 y c-jun quinasa N-terminal (JNK) (Yang et al., 2006b).

La activación de TLR4 e IL-1RI se inicia a través del reclutamiento de la quinasa asociada al IL-1RI tipo 4 (IRAK-4) (Li et al., 2002), lo que permite

la asociación de IRAK-1 (Cao et al., 1996a). IRAK-4 se activa durante la formación de este complejo (complejo I), conllevando a la hiperfosforilación de IRAK-1, que a su vez, induce la interacción de Traf-6 (factor asociado al receptor de TNF- α tipo 6) con el complejo I (Cao et al., 1996b). La asociación de IRAK-4/IRAK-1/Traf-6 causa cambios conformacionales en uno o más de estos factores, conllevando a la disociación del complejo unido al receptor. El complejo I interacciona a nivel de membrana, con un complejo pre-formado constituido por TAK-1 (quinasa asociada a TGF- α 1), TAB-1 (proteína unida a TAK) y TAB-2 (Jiang et al., 2002), formando el segundo complejo o Complejo II. Esta interacción induce la fosforilación de TAB-2 y TAK-1, los cuales se traslocan, junto con Traf-6 y TAB-1, al citoplasma. TAK-1 es activado en el citoplasma, conllevando a la activación de IKK (complejo κ B- α -quinasa). La fosforilación de κ B- α induce su degradación, y posterior liberación de NF- κ B y la activación de genes dependientes de NF- κ B, tales como IL-1 β , TNF- α , IL-6, COX-2, iNOS (DiDonato et al., 1997). Evidencias bioquímicas también indican que la activación del Complejo II puede estimular a ERK1/2, p38 y JNK (O'Neill and Dinarello, 2000), que a su vez regulan la activación nuclear de factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (proteína activadora 1) (Kracht and Saklatvala, 2002). Puesto que ciertos sitios de unión de NF- κ B y AP-1 se han encontrado en los promotores de numerosos genes que se inducen durante la inflamación, es posible que el gran número de receptores específicos del sistema inmune innato, puedan activar genes principalmente a través de señales de transducción asociadas a MAPK y IKK/NF- κ B (Akira and Takeda, 2004; Dunne and O'Neill, 2003; Martin and Wesche, 2002) (ver Esquema 2).



Esquema 2. Esquema representativo de los principales componentes de la cascada de señalización intracelular de los receptores TLR4 e IL-1RI. La activación de los receptores TLR4 e IL-1RI por sus ligandos específicos LPS e IL-1 β , conlleva al reclutamiento de moléculas de señalización (MyD88, Traf-6, IRAKs) que forman el Complejo I, el cual activa la formación del Complejo II (Traf-6, IRAKs, TAB-1, -2, TAK-1), que culmina en la inducción de MAPKs y factores de transcripción (NF- κ B y AP-1), que regulan la expresión de genes diana en la respuesta inmune y muerte celular.

Por tanto, la anterior señalización sugiere que la estimulación, tanto con IL-1 β o LPS, podría conllevar a la inducción transcripcional de un conjunto de genes comunes que codifican para proteínas pro-inflamatorias, como citoquinas, proteasas y enzimas metabólicas, tales como iNOS (óxido

nítrico sintasa inducible) y COX-2 (ciclo-oxigenasa-2) (Kracht and Saklatvala, 2002). Además, iNOS y COX-2 son importantes componentes en la cascada inflamatoria post-lesión de varios tipos de daños cerebrales (Heales et al., 1999; O'Banion, 1999; Yamada et al., 1999) (ver Esquema 2).

Finalmente, resultados de los últimos años, nos han permitido entender el papel de la respuesta inmune innata en el SNC, y la implicación de los TLRs como mediadores esenciales en esta respuesta del cerebro. De hecho, se ha demostrado la presencia de los TLRs en células gliales de cerebro y espina dorsal, y un aumento de su expresión durante la neuroinflamación (Bsibsi et al., 2002), y además, se ha demostrado que el receptor TLR4 interviene en el daño neuronal y en la neurodegeneración inducida por LPS (Lehnardt et al., 2003). Hay que destacar, que aunque un incremento transitorio de dicha respuesta puede ser beneficiosa para paliar condiciones patogénicas (Rivest, 2003), una super-activación de la inmunidad innata puede conllevar neurodegeneración (Campbell, 2004). Además, el daño celular y la apoptosis se producen de forma concomitante como resultado de la estimulación de cascadas de señalización intracelular y mediadores inflamatorios asociados a TLR4/IL-1RI, induciendo, a su vez, una exacerbada respuesta inflamatoria en el SNC bajo condiciones de daño, enfermedad o estrés (Ehrlich et al., 1999).

1.2.3. Etanol y sistema inmune innato.

Estudios clínicos y experimentales revelan que el consumo de alcohol afecta a los sistemas, tanto inmune como inflamatorio (MacGregor, 1986), conllevando a defectos específicos en los componentes celulares de la respuesta inmune innata frente a patógenos bacterianos y virales (Cook,

1998). El etanol altera los niveles de citoquinas en una gran variedad de tejidos incluyendo pulmón, hígado y cerebro. Los datos que poseemos hasta el momento, demuestran que la regulación de la respuesta inmune por el etanol es compleja, y depende de la dosis, duración del tratamiento (agudo frente a crónico), así como del tipo celular y patógeno (Crews et al., 2006). Así, el tratamiento agudo de etanol altera las funciones inmunes, interfiriendo con una respuesta inflamatoria e incrementando la susceptibilidad a una gran variedad de infecciones, tales como la neumonía bacteriana (Ruiz et al., 1999). De acuerdo con lo anterior, se ha descrito que el etanol suprime la respuesta de los receptores TLR3 (Pruett et al., 2004) y TLR4 (Dai et al., 2005), en monocitos y macrófagos *in vitro*, disminuyendo la síntesis y secreción de numerosas citoquinas (Goral et al., 2004).

Por el contrario, el consumo crónico de etanol se asocia con niveles séricos elevados de citoquinas pro-inflamatorias (McClain et al., 1999; McClain and Cohen, 1989), y activación de la respuesta de ciertas citoquinas, tales como IL-1 β y TNF- α (Valles et al., 2003), implicándose en el daño hepático inducido por el etanol (Hoek and Pastorino, 2002).

Los resultados anteriores demuestran que el etanol, puede inhibir o aumentar la señalización de los receptores TLRs y la liberación de citoquinas. Aunque los mecanismos involucrados en las diferentes respuestas del etanol, no se han esclarecido, algunos hallazgos sugieren que el etanol podría estar afectando a los primeros eslabones en la señalización de los TLRs, es decir, a la agregación y reclutamiento de estos receptores en microdominios de membrana *lipid rafts* (Chiou et al., 1990; Peoples et al., 1996).

En conclusión, los efectos del etanol, tanto en el sistema inmune, como en los receptores TLRs son complejos, y dependen de la dosis de

etanol, duración del tratamiento, tipo celular y tejido analizado. Claramente, se necesitan más estudios para esclarecer los mecanismos moleculares y celulares de los efectos del etanol en la respuesta inmune mediada por los TLRs.

1.3. FUNCIÓN DE LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS* EN SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y ENDOCITOSIS.

Los *lipid rafts* son microdominios de membrana ricos en esfingomielina, con una estructura altamente ordenada en la membrana plasmática (Laude and Prior, 2004). Los análisis bioquímicos y purificación de diferentes proteínas procedentes de *lipid rafts* de diversos tipos celulares, han mostrado una sorprendente concentración de moléculas de señalización contenidas dentro de estos microdominios de membrana (Zajchowski and Robbins, 2002). La existencia de diferentes clases de *lipid rafts* (Pike, 2003) y su organización lateral, confieren una gran ventaja para la consecución de la señalización (Harder and Engelhardt, 2004), ya que los diversos tipos de proteínas o componentes de la señalización pueden estar confinados en diferentes microdominios de membrana. Por tanto, los *lipid rafts* pueden ser vistos como plataformas de señalización que sirven para ensamblar y colocalizar los componentes requeridos, facilitando su interacción y señalización (Magee et al., 2002; Pike, 2003; Simons and Ikonen, 1997). Así, receptores, proteínas adaptadoras, enzimas efectoras y sustratos estarían colocalizados en un solo microdominio. Para que esta plataforma sea capaz de soportar tales procesos celulares de señalización, y poder organizar los ensamblajes del conjunto de proteínas, los *lipid rafts* están formados por

diferentes proteínas de andamiaje que estabilizan estas interacciones, como son, entre otras, la caveolina-1, la flotilina-1 (Harder and van Meer, 2003) y la actina (Dykstra et al., 2003). Actualmente se han propuesto dos tipos de *lipid rafts* con respecto a la transducción de señales: 1) *lipid rafts planos* (también referidos como no-caveolares o glicolipídicos) que son ricos en flotilina-1, no poseen la proteína caveolina-1, y por tanto no son capaces de invaginar en caveolas para la señalización intracelular; y 2) *caveolas*, que son pequeñas invaginaciones ricas en caveolina-1, capaces de generar vesículas caveolares en el citoplasma, como mecanismo alternativo a la endocitosis mediada por clatrina (Le Roy and Wrana, 2005; Rajendran and Simons, 2005).

Además de la importante implicación de los *lipid rafts* como plataformas para una exitosa señal de transducción, estos microdominios se han asociado a la regulación del transporte de proteínas desde la membrana plasmática (Simons and Toomre, 2000; Tuosto et al., 2001), y sobre todo, por su papel funcional en la endocitosis. Resultados de los últimos años sugieren, que los *lipid rafts* organizan la regulación de la red de citoesqueleto de actina y la endocitosis, permitiendo potencialmente la coordinación de la señalización del receptor con su internalización (Dykstra et al., 2003). Aunque la endocitosis mediada por clatrina ha sido tradicionalmente asumida como distinta de la internalización de proteínas mediada por caveolas o *lipid rafts*, evidencias actuales indican que la señalización mediada por *rafts* y la endocitosis mediada por clatrina, están relacionadas (Dykstra et al., 2003).

El mecanismo mejor caracterizado de la internalización de proteínas específicas mediante la invaginación de la membrana, es la endocitosis mediada por clatrina, aunque a partir de los años 90, se debatieron otros

mecanismos alternativos en la internalización de componentes de membrana (Griffiths et al., 1989). El desarrollo posterior de mutantes específicos de proteínas que eran esenciales en la función de la clatrina (Chen et al., 1998; Ford et al., 2001; van der Blik et al., 1993), permitió la realización de estudios que demostraban que la internalización de un alto rango de moléculas continuaba, incluso en ausencia de vesículas de clatrina. Esto supuso la aceptación, cada vez más extendida, de mecanismos de endocitosis independientes de clatrina (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001).

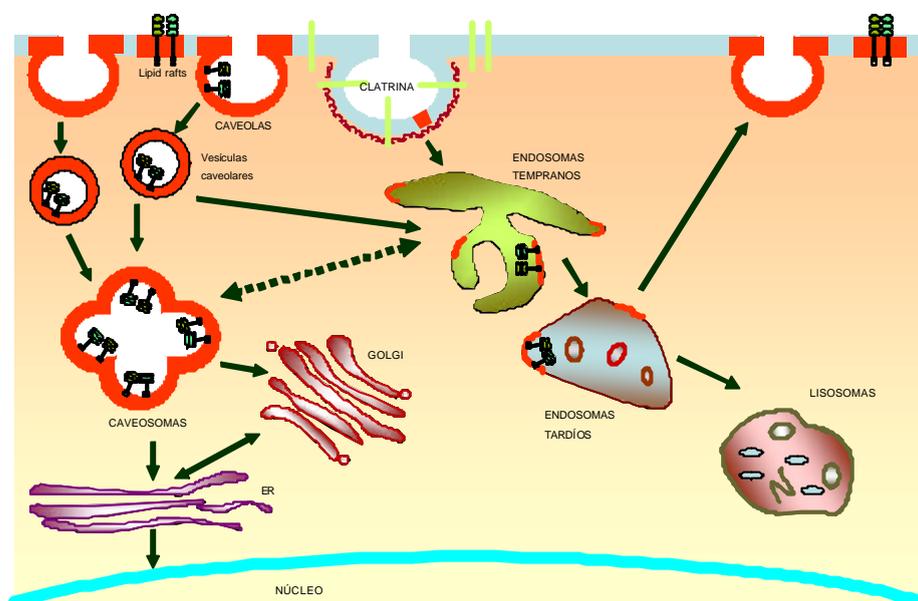
Uno de estos mecanismos más estudiados es la endocitosis caveolar, ya que la mayor parte de las moléculas que se internalizan independientemente de clatrina se han encontrado en los microdominios *lipid rafts* (Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001). La endocitosis caveolar se produce principalmente por la presencia de caveolas, que son los *lipid rafts* mejor caracterizados y que son invaginaciones estables de la membrana plasmática. Las caveolas están presentes en la superficie de numerosos tipos celulares y se diferencian de los *lipid rafts* no-caveolares (o planos) por su contenido en caveolina-1, como su principal componente (Pelkmans and Helenius, 2002). Aunque los detalles de cómo las caveolas se disocian de la membrana plasmática no están totalmente claros, sí que está completamente aceptado que la endocitosis se produce por una fisión caveolar de la membrana, la cual se activa principalmente por un estímulo, como puede ser la unión de un ligando a su receptor (Pietiainen et al., 2005). La caveola citoplásmica (vesícula caveolar) tiene la función de transporte de los componentes proteicos que porta, y los transfiere, presumiblemente,

mediante su fusión a unas estructuras citoplásmicas de mayor tamaño, denominadas caveosomas.

Los caveosomas están altamente enriquecidos con caveolina-1, pero dan negativo a los marcadores de endosomas por vía clatrina (Pelkmans and Helenius, 2002), y a proteínas marcadoras de lisosomas, Golgi o retículo endoplásmico. Sin embargo, el análisis ultra-estructural muestra que su forma es vesicular y son heterogéneos en cuanto a tamaño (Kartenbeck et al., 1989; Pelkmans et al., 2001). Los caveosomas se dirigen a la membrana perinuclear del retículo endoplásmico o Golgi, liberando su contenido proteico (Pelkmans et al., 2001), pero el mecanismo de transporte de estas moléculas al núcleo está aún sin esclarecer (Kasamatsu and Nakanishi, 1998). Es importante destacar que el citoesqueleto de actina juega un papel esencial, tanto en la formación de vesículas caveolares, como en la transferencia de estas vesículas a lo largo del citoplasma. Este proceso contrasta con la internalización de vesículas dependientes de clatrina, en donde el proceso de internalización no es estrictamente dependiente del citoesqueleto de actina (Brodsky et al., 2001; Fujimoto et al., 2000).

Hay que destacar, que se ha descrito una conexión entre los caveosomas y los endosomas tempranos dependientes de clatrina. Así, ciertas proteínas asociadas a *rafts* pueden ser internalizadas mediante endocitosis mediada por clatrina, aunque esta vía no haya sido asociada con los *lipid rafts* (Nichols, 2003). Ciertos componentes proteicos que sólo pueden residir y transportarse en caveosomas, deberían detectarse, sólo y exclusivamente, en retículo endoplásmico o Golgi, pero se ha detectado su reciclaje en membrana plasmática (Lalli and Schiavo, 2002; Nichols et al., 2001). La existencia de dos rutas de tráfico caveolar donde participan, tanto

los caveosomas como los endosomas, ha generado numerosas preguntas en cuanto a su independencia.



Esquema 3. Representación esquemática de la endocitosis mediada por clatrina y de la endocitosis caveolar. Tras un estímulo, se produce la traslocación del receptor a *lipid rafts* caveolae, y su internalización se produce por una fisión de las caveolas de la membrana plasmática, formando vesículas caveolares, que se fusionan a los caveosomas citoplásmicos, responsables de conducir el receptor al retículo endoplásmico o Golgi, y posteriormente, al núcleo celular. Pero, puede ocurrir que, tanto las vesículas caveolares como los caveosomas, se fusionen con la membrana de endosomas tempranos dependientes de clatrina, y el receptor siga el tráfico normal de degradación por lisosomas o reciclaje a membrana plasmática.

Se ha demostrado que las vesículas caveolares, después de su internalización, se fusionan con los caveosomas en el citoplasma, pero también pueden acoplarse con la membrana de endosomas tempranos, no fusionándose completamente, con el fin de preservar su compartimento, reteniendo sus componentes lipídicos y proteicos (Pelkmans et al., 2004). Puesto que los endosomas tempranos generan, por una parte cuerpos multivesiculares o exosomas, que son vesículas responsables de liberar componentes de nuevo a la membrana a través de su fusión exocítica con la misma, y por otra, generan endosomas tardíos, que directamente liberan su contenido proteico en los lisosomas para su degradación, se ha propuesto que el sistema caveolar conecta con orgánulos, tanto endocíticos como exocíticos (Pelkmans et al., 2004) (ver Esquema 3).

2. OBJETIVOS

Capítulo 2: OBJETIVOS

Evidencias de los últimos años sugieren la participación de procesos inflamatorios en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica. Sin embargo, aunque el TNF- α y la IL-1 β son las dos citoquinas que inician los procesos inflamatorios, y ambas están elevadas en el suero de individuos con hepatopatía alcohólica, existe poca información sobre si el etanol potencia las vías intracelulares asociadas a la IL-1 β , que pueden conducir a un aumento de mediadores inflamatorios y daño en el hepatocito.

Al mismo tiempo, puesto que datos de nuestro laboratorio indican la susceptibilidad del cerebro y de las células gliales a los efectos tóxicos del etanol, quisimos evaluar la posible participación de procesos inflamatorios y de la respuesta inmune innata en el daño que induce el alcohol en cerebro y en astrogliá.

Por tanto, los objetivos han sido los siguientes:

1.- Determinar si el daño hepático inducido por el consumo crónico de alcohol, se asocia con un aumento de citoquinas inflamatorias y una estimulación de la señalización intracelular producida por IL-1b y LPS en hígado y en hepatocitos en cultivo.

2.- Evaluar si el consumo de alcohol incrementa los mediadores inflamatorios, y causa daño y muerte celular en cerebro y en astrocitos.

3- Analizar si el consumo de alcohol causa una activación de la respuesta inmune innata en cerebro y en astrocitos, estimulando la vía de señalización asociada a los receptores TLR4 e IL-1RI.

4.- Investigar si los efectos neuroinflamatorios del etanol tienen lugar a través de su acción sobre TLR4 e IL-1RI, mediante la inhibición de estos receptores con anticuerpos bloqueantes específicos.

5.- Determinar si el efecto del etanol sobre los receptores TLR4 e IL-1RI se produce a través de su interacción con los microdominios de membrana *lipid rafts*.

6.- Comparar la internalización y endocitosis del receptor IL-1RI tras el tratamiento con etanol e IL-1b en astrocitos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Capítulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales de experimentación utilizados fueron ratas hembras de raza Wistar, con un peso inicial de 150-170 gr, criadas en perfectas condiciones de higiene, climatización (23 ± 1 °C), humedad (60 %) y con ciclos de luz/oscuridad (12/12 h).

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos, según la dieta administrada:

1.- Control: ratas alimentadas con dieta líquida isocalórica (dieta líquida control).

2.- Alcohol: ratas alimentadas con dieta líquida que contenía 5% (w/v) de etanol (dieta líquida alcohólica).

3.- Dieta sólida: ratas alimentadas con dieta sólida convencional y agua (dieta sólida control).

3.1.1. Animales con dieta líquida

Las ratas del grupo control y alcohol fueron alimentadas con una dieta líquida formulada por Lieber-DeCarli (Lieber and DeCarli, 1994), que consiste en una mezcla de proteínas, vitaminas, minerales, carbohidratos y grasa. En la dieta líquida alcohol, éste se introduce en una proporción del 5% (v/v), y en la dieta control, las calorías del etanol se sustituyen por carbohidratos (isocalórica). La ventaja de esta dieta, es que el animal toma los elementos nutritivos al mismo tiempo que consume el alcohol, eliminando la desnutrición que acompaña a su consumo, y pudiendo estudiar el efecto

directo del alcohol en el organismo. En la tabla 3.1 se muestra la composición cuantitativa de las dietas control y alcohol.

COMPONENTES	DIETA CONTROL	DIETA ALCOHOL
Leche entera	345 gr	345 gr
Leche desnatada	345 gr	345 gr
DL-metionina	2 gr	2,4 gr
L-cistina	3,25 gr	3,9 gr
Aceite maíz	3,26 ml	12,45 ml
Aceite oliva	10,44 ml	3,9 ml
Tween 80	0,750 ml	0,9 ml
Sacarosa	182,6 gr	63 gr
Dextrina/Maltosa	267 gr	66 gr
Mezcla vitaminas	20 gr	24 gr
Mezcla sales	50 gr	60 gr
Colina bitartrato	3,5 gr	3,5 gr
Gum Xanthan	12 gr	12 gr
Cl ₂ Zn	0,07 gr	0,07 gr
Sacarina	3 ml	3 ml
Celulosa	60 gr	60 gr
Etanol	-----	414 ml
Agua c.s.p.	6 L	6 L

Tabla 3.1- Composición de las dietas líquidas control y alcohol.

Los animales fueron alimentados con dieta líquida alcohol *ad libitum* durante 20 semanas. Durante este tiempo, los animales alimentados con dieta líquida control se les restringió la dieta, suministrándoles diariamente la misma cantidad que consumían los animales alcohol (paralelamente alimentados). A partir de las cuatro semanas de alcoholización con dieta líquida se considera que los animales son dependientes al alcohol. Además, la concentración de alcohol en sangre que se alcanza con la dieta líquida, es de $24,5 \pm 6$ mM (Sigma Aldrich Quimica kit), que se encuentra en el rango de valores observados en sangre de pacientes alcohólicos (10-125 mM) (Adachi et al., 1991).

Los animales alimentados con las dietas líquidas control y alcohol se utilizaron para diferentes protocolos experimentales:

1º) Los hígados y los cerebros (cortezas cerebrales) se congelaron a -70°C para su posterior tratamiento y análisis del efecto crónico del etanol *in vivo*.

2º) Los hígados de ratas control y alcoholizadas se usaron para el aislamiento de hepatocitos en cultivo primario, cuya metodología se describe posteriormente (Sección 3.2.1).

3.1.2. Animales con dieta sólida

Las ratas del grupo control sólido fueron alimentadas con dieta sólida estándar y agua *ad libitum*. Las hembras se expusieron a los machos por la noche, y tras confirmar la gestación (presencia de espermatozoides en el flujo vaginal), las hembras preñadas se sacrificaron a los 21 días de gestación, y los cerebros de los fetos se utilizaron para el establecimiento de los cultivos primarios de astrocitos (sección 3.2.2).

3.2. CULTIVOS CELULARES

3.2.1. Cultivo primario de hepatocitos

Para el aislamiento y cultivo de hepatocitos se contó con la colaboración de la Dra. M. J. Gómez-Lechón del Centro de Investigación Hospital La Fe.

Se utilizaron ratas hembras alimentadas con dieta control o alcohólica. El método de aislamiento de los hepatocitos consiste básicamente en la perfusión *in situ*, a través del sistema vascular del hígado, con colagenasa para desintegrar la trama conectiva intercelular y liberar las células. La perfusión se realiza en dos etapas. Inicialmente se perfunde el hígado con solución salina de Krebs-Henseleit (pH 7.5, glucosa 10 mM, EGTA 0.5 mM) exenta de Ca^{++} , con un flujo de 16-18 ml/min. A continuación, se realiza una perfusión recirculante durante 10 min con la misma solución salina, esta vez sin EGTA, pero conteniendo Cl_2Ca 2.5 mM y colagenasa 0.025%. Este método proporciona un rendimiento muy elevado en el aislamiento de hepatocitos (25-30x10⁶ células viables por gr de hígado). La viabilidad celular se determina mediante el test de exclusión con el colorante azul tripán y habitualmente es de 85-95%. Los hepatocitos recién obtenidos se siembran a una densidad de 5x10⁵ células/ml en medio de cultivo Ham F-12/L-15 (1:1) complementando con 0.2% de albúmina, 2% de suero de ternera, 10⁻⁸ M insulina y antibióticos (Invitrogen-Gibco), en placas de cultivo de plástico (80x103 células/cm²). El medio se renueva una hora tras la siembra, y a partir de las 24 horas los hepatocitos se cultivan en el mismo medio pero sin suero, suplementando el medio con insulina y dexametasona a una concentración de 10⁻⁸ M. Los hepatocitos se cultivaron

durante 3 días. La pureza de los cultivos se comprobó mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos para las enzimas intramitocondriales del ciclo de la urea CPS I y OTC (marcadores de hepatocitos) y ED-2 y -1 (marcadores de células de Kupffer y monocitos, respectivamente) (Serotec Ltd.) (Barbe et al., 1990). Bajo nuestras condiciones, el 99,95% de células expresaron CPS y OTC, mientras que solo un 0,05% fueron positivas para ED-2 y ninguna para ED-1.

3.2.2. Cultivo primario de astrocitos

Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos tipo-1 procedentes de corteza cerebral de fetos de 21 días de ratas control con dieta sólida, siguiendo procedimientos anteriormente descritos (Guerra et al., 1990). Concretamente, los animales se sacrificaron, y tras extraer los cerebros en condiciones estériles, las cortezas cerebrales se diseccionaron, eliminando las meninges y otras partes de cerebro, y las células se disgregaron mediante aspiración con una pipeta de 10 ml en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). El extracto celular se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante un minuto y se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 80 μm , para eliminar los agregados celulares. El extracto se mezcló con DMEM conteniendo 20% de suero bovino fetal (SBF), 1% de penicilina/estreptomicina (concentración final: 1000 unidades/ml), 1% de fungizona (2.5 $\mu\text{g/ml}$), 1% de glutamina (2mM) (Invitrogen-Gibco) y 1000 mg/L de glucosa extra, y se sembró en placas de 100 y 60 cm de diámetro, o sobre cubres de 16mm, para los experimentos de inmunofluorescencia. Los cultivos se crecieron en un incubador a 37°C, al 5% CO₂/95% aire. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana, y tras siete días de crecimiento, el

contenido de SBF se redujo al 10%. Los astrocitos se dejaron crecer hasta su confluencia y se usaron después de once días de cultivo.

La pureza de los cultivos se comprobó mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos contra las siguientes proteínas: GFAP o proteína ácida fibrilar de la glía (marcadora de células astrogliales), CD-68 (marcador de microglía), MAP-2 (marcador neuronal) y MBP o proteína básica de mielina (marcador de oligodendroglía). En nuestras condiciones, el 99% de las células fueron GFAP positivas.

Los diferentes tratamientos se añadieron al medio DMEM, al que previamente se le eliminó el SBF, sustituyéndolo por albúmina bovina del suero (BSA), 1 mg/ml.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL Y TRATAMIENTOS DE ETANOL EN LOS CULTIVOS CELULARES

Para el mantenimiento de una concentración adecuada de etanol en el medio, los cultivos se mantuvieron en el incubador en recipientes cerrados que contenían una placa con agua destilada y etanol a la misma concentración del medio de cultivo, garantizando así, la saturación del aire y evitar la evaporación.

3.3.1. Tratamientos de etanol y protocolo experimental en cultivos primarios de hepatocitos

Los hepatocitos en condiciones de confluencia, que ocurre a las 48 h de cultivo, se les eliminó el SBF, y se añadió al medio de cultivo etanol (25 y 50 mM), manteniéndose durante 24 horas

En los experimentos en los que se estudiaba el efecto de la estimulación del lipopolisacárido bacteriano, 50 ng/ml (LPS, de *Escherichia coli*, serotipo O26:B6, Sigma Aldrich) o de la interleuquina-1-beta, 10 ng/ml (IL-1 β) (Sigma Aldrich), estos compuestos se adicionaron al medio de cultivo sin SBF, junto con el etanol o individualmente, durante 10, 30 min o 24 h, dependiendo del análisis a realizar. En algunos estudios, los hepatocitos control y procedentes de ratas alcohólicas, se pre-trataron dos horas antes del tratamiento con etanol, con los inhibidores PD-98059 (10 μ M), SB-203580 (10 μ M) (Sigma-Aldrich) o vehículo (DMSO), que bloquean la actividad de las quinasas ERK1/2 y p38, respectivamente.

3.3.2. Tratamientos de etanol y protocolo experimental en cultivos primarios de astrocitos

Para analizar el efecto crónico del etanol *in vitro*, al 4^o día de cultivo se añadió el etanol a una concentración de 75 mM, y se mantuvieron las células con el tratamiento hasta el día 11 de cultivo. Por tanto, los astrocitos estuvieron expuestos al etanol durante 7 días. La concentración de etanol se determinó enzimáticamente cada día (Sigma-Aldrich Quimica kit). La concentración de alcohol que utilizamos, 75 mM, se encuentra dentro del rango de los niveles sanguíneos de etanol encontrado en alcohólicos (Adachi et al., 1991).

Para analizar el efecto agudo del etanol *in vitro*, se usaron astrocitos al día 11 de cultivo, a los que previamente se les había eliminado el suero, y añadido BSA 1mg/ml durante 12 h. Se analizaron diferentes concentraciones de etanol (0, 2, 8, 10, 20, 40, 50, 100 y 200 mM) y diferentes tiempos de exposición (0, 5, 10, 15, 30 min, 1, 3, 24 y 72 h).

En algunos experimentos, tras estimular las células con LPS (50 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) o etanol (10 y 50 mM), durante diferentes periodos de tiempo (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min) en medio sin SBF, se aislaron los *lipid rafts* (sección 3.10).

En otros estudios, se utilizaron anticuerpos bloqueantes de los receptores IL-1RI y TLR4, específicamente se usaron anti-IL-1RI (BD Pharmingen) y anti-TLR4 (Santa Cruz Biotechnology), que se pre-incubaron durante 30 min antes, y durante el tratamiento con etanol a 50 mM. Estos anticuerpos son capaces de bloquear la unión al receptor de los ligandos específicos, como son IL-1 β y LPS, respectivamente, reaccionando con gran afinidad con el dominio extracelular de IL-1RI y TLR4 (Chow et al., 1999; McIntyre et al., 1991).

Finalmente, otro tratamiento experimental utilizado, ha sido el pre-tratamiento (2 horas) de los astrocitos con inhibidores de la activación del factor de transcripción NF- κ B, como son BAY 11-7082 (5 μ M) o ditiocarbamato de pirrolidina PDTC (100 μ M) (Sigma-Aldrich), antes y durante el tratamiento con etanol (50 mM) de 30 min o 24 h. BAY 11-7082 previene la fosforilación de I κ B- α , y por tanto, su unión con NF- κ B y posterior activación (Ohkita et al., 2002). PDTC previene la fosforilación y degradación de I κ B- α , así como la traslocación nuclear de NF- κ B (Wu et al., 1996).

3.4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y TISULARES

3.4.1. Aislamiento de fracciones subcelulares hepáticas

Para el aislamiento de fracciones subcelulares en tejido, los hígados obtenidos de animales control y tras un consumo crónico de alcohol se homogeneizaron con sacarosa 0.25M + Tris-HCl 10mM (0,5ml / 0,1gr) y mediante centrifugación diferencial se separaron las fracciones nuclear, mitocondrial, citosólica y microsomal. Específicamente, el lisado celular se centrifugó a 1000xg 10 min, obteniendo la fracción nuclear en el precipitado. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 10000xg 10 min, quedando la fracción mitocondrial en el precipitado, y tras centrifugar el sobrenadante a 100000xg 90 min, se obtuvo la fracción microsomal en el precipitado, y la fracción citosólica en el sobrenadante. Las fracciones precipitadas se resuspendieron en tampón de lisis (0,1% SDS, 0,5% Sodio Deoxicolato, 1% Nonidet P-40).

3.4.2. Obtención del lisado de hepatocitos

Tras los correspondientes tratamientos, los hepatocitos se lavaron con PBS frío, se despegaron mediante rascado, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis 0,1% SDS, 0,5% Sodio Deoxicolato, 1% Nonidet P-40, 1.25 mM PMSF, 40 μ M leupeptina, 10 μ g/ml aprotinina, 1 mM ortovanadato sódico. Tras mantener el lisado en hielo durante 30 min, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se obtuvo el sobrenadante como extracto proteico.

3.4.3. Aislamiento de fracciones subcelulares de astrocitos

Para el estudio de la activación de NF- κ B en el núcleo y degradación de κ B- α en citoplasma, fue necesaria la separación de núcleo y citoplasma. Este fraccionamiento se realizó tal y como se describe en el trabajo de (Ishida et al., 2002).

Los astrocitos se lavaron con PBS, se centrifugaron y el precipitado obtenido se resuspendió en 200 μ l de solución I (Na_2HPO_4 5mM pH7.4, NaCl 50mM, sacarosa 150mM, KCl 5mM, DTT 2mM, MgCl_2 1mM, CaCl_2 0.5mM y PMSF 0.1mM), a la que se le añadió un 0.2% de Nonidet P-40 fresco. Después de 5 min en hielo y vórtex suave, se centrifugó a 1000xg durante 10min (4°C). El sobrenadante obtenido fue la fracción citoplasmática. El precipitado se resuspendió en 100 μ l de solución I sin NP-40. Esta suspensión se depositó suavemente sobre 1ml de solución II (Tris-HCl 2.5mM pH 7.4, NaCl 10mM, 30% sacarosa), generando un gradiente que se centrifugó a 1000xg durante 10min a 4°C para purificar los núcleos. Finalmente, la fracción nuclear se lisó con 40 μ l de solución III (Tris-HCl 50mM pH7.4, NaCl 300mM, Triton X-100 0.5%) y se recogió por centrifugación a 10000xg durante 10min a 4°C.

3.4.4. Obtención del lisado de corteza cerebral y astrocitos

Tanto las cortezas cerebrales obtenidas de ratas control y alcoholizadas, como los astrocitos obtenidos tras los diferentes tratamientos, se lavaron con PBS frío, y se resuspendieron en tampón de lisis 1% NP-40, 20mM Tris-HCl pH8, 130mM NaCl, 10mM NaF, 10 μ g/ml aprotinina, 40 μ M leupeptina, 1mM DTT, 1mM Na_3VO_4 , y 1mM PMSF (para corteza cerebral 0,3

ml/0,1 gr). Después de una incubación en hielo de 30min, se centrifugó a 16000xg durante 10 min y se recogió el sobrenadante.

3.5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS: ANÁLISIS DE INMUNOTRANSFERENCIA, INMUNOPRECIPITACIÓN / ENSAYO QUINASA *IN VITRO* Y ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL DE RETARDO

3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La concentración de proteína, tanto en las fracciones subcelulares como en los lisados totales, se cuantificó por Bradford (Bio-Rad).

Se utilizaron geles de 1,5 mm de grosor con porcentajes de acrilamida (en el gel separador) entre el 8 y el 15% según el peso molecular de los fragmentos proteicos a resolver y adicionando dodecil sulfato sódico (SDS). Se mantuvo una relación acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 en todos los casos. A las muestras obtenidas se les añadió tampón de carga 6x (350mM Tris pH 6,8, 30% glicerol, 30% mercaptoetanol, 100gr/L SDS, 200mg/L azul de bromofenol) y se hirvieron durante 4 min. Para la electroforesis se utilizó un sistema Mini Protean de Bio-Rad en tampón: 6gr/L de Trizma base, 2.88 gr/L de glicina y 20 gr/L de SDS.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon Transfer Membrane, Millipore) en tampón 3gr/L de Trizma base, 1.44 gr/L de glicina y un 20% de metanol, durante 1h a 100V. Las membranas se bloquearon durante 60min en leche desnatada al 5% en TBS-Tween (TBS-T) 0.1% (Tris 20mM y NaCl 500mM pH 7.5) y se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación, con los correspondientes

anticuerpos primarios. Las membranas se lavaron 3-4 veces con TBS-T 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios –anti IgG-conjugado con HRP (anti-raton peroxidasa, 1:1000, Santa Cruz; anti-conejo peroxidasa, 1:20000, Sigma; anti-cabra peroxidasa, 1:10000, Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando ECL-Plus (Amersham) y se expusieron a films MXG de Kodak o Hyperfilm de Amersham.

En algunos casos, las membranas se reincubaron nuevamente con otros anticuerpos. Para ello, antes del bloqueo, las membranas se trataron con 200mM de glicina pH 2.5 y 0.4% de SDS durante 30 min, a temperatura ambiente.

Los anticuerpos utilizados con sus correspondientes diluciones, organismo de origen, pesos moleculares de las proteínas a detectar, así como las casas comerciales donde se han obtenido cada uno de ellos, se detallan en la tabla 3.2.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORGANISMO	DILUCIÓN	PM (KDa)	CASA COMERCIAL
IL-1RI	conejo	1:100	80	Pharmlngen
IRAK	ratón	1:200	100	Trans. Lab.
IL-10R	conejo	1:250	90-110	Santa Cruz
P-ERK	ratón	1:250	42-44	Santa Cruz
ERK1/2	conejo	1:500	42-44	Santa Cruz
I κ B- α	ratón	1:50	37	Santa Cruz
NF- κ B p65	conejo	1:50	65	Santa Cruz

COX-2	conejo	1:1000	72	Cayman C.
iNOS	conejo	1:200	130	Santa Cruz
P-p38	conejo	1:200	43	Cell Sign.
p-38	conejo	1:250	38	Santa Cruz
P-SAPK/JNK	conejo	1:250	46-54	Cell Sign.
JNK	conejo	1:250	46-54	Santa Cruz
Caspasa-3	conejo	1:250	32-20	Santa Cruz
CD11b	cabra	1:100	165-95	Santa Cruz
NG2	conejo	1:100	250	Santa Cruz
α -tubulina	ratón	1:100	55	Sigma
TLR4	cabra	1:50	110	Santa Cruz
Caveolina-1	conejo	1:500	22	Sigma
Flotilina-1	conejo	1:100	45	Santa Cruz
MyD88	conejo	1:500	35	Santa Cruz
Lamina A/C	conejo	1:1000	70	Cell Sign.

Tabla 3.2. - Lista detallada de los anticuerpos utilizados.

3.5.2. Inmunoprecipitación y ensayo quinasa *in vitro*

Esta técnica se utilizó para estudiar la fosforilación *in vitro* de quinasas asociadas a los receptores IL-1RI y TLR4 en hepatocitos en cultivo. El protocolo experimental fue el siguiente: Tras estimular los hepatocitos con IL-1 β o LPS durante 10 min en medio sin SBF, con o sin tratamiento con etanol, las células se lisaron (tampón de lisis: 0,1% SDS, 0,5% Sodio Deoxicolato, 1% Nonidet P-40, 1.25 mM PMSF, 40 μ M leupeptina, 10 μ g/ml

aprotinina, 1 mM ortovanadato sódico), y se incubaron con los anticuerpos anti-IRAK y anti-ERK1/2 en una proporción 1µg de anticuerpo por cada 200µg de proteína, a 4°C durante 2-4 h. Transcurrido este tiempo, se añadió al lisado, proteína G plus unida a agarosa (Santa Cruz), previamente lavada 3 veces con el tampón de lisis, en una proporción 10µl de Gagarosa por cada 100µg de proteína, y se inmunoprecipitaron durante 2 h más a 4°C. El inmunoprecipitado se lavó 3 veces con tampón de lisis, y una vez, con el tampón quinasa: 20 mM HEPES pH 7,6, 20 mM MgCl₂, 20 mM paranitrofenilfosfato, 1 mM EDTA, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM DTT. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm 2 min 4°C, y el inmunoprecipitado resultante se resuspendió en 50 µl de tampón quinasa, suplementado con adenosina tri-fosfato (ATP) 5 µM, proteína básica de la mielina (MBP) 1 µg (Sigma) y [γ -³²P] ATP (1 µl, 10 µCi) (Amersham Biosciences). La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 37°C. Transcurrida la reacción, se añadió 10 µl de tampón de carga y las muestras se hirvieron durante 4 min. Tras separar las proteínas en SDS-PAGE con geles al 15% de acrilamida, el gel se secó al vacío durante 60 min a 70°C, se expuso a films para rayos X durante 30-60 min a -80°C y finalmente se cuantificó con PhosphorImager (Biorad).

3.5.3. Ensayo de movilidad electroforética en gel de retardo (EMSA)

Esta técnica se utilizó para determinar los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 y su activación por diferentes tratamientos. Estos factores de transcripción se determinaron en hepatocitos en cultivo (tratados con IL-1 β o LPS), en corteza cerebral de ratas control y alcoholizadas, y en astrocitos

tratados con etanol. Para este ensayo se aislaron extractos nucleares utilizando un kit comercial (Nuclei Pure Prep Nuclei isolation kit, Sigma), diseñado para la obtención de núcleos, tanto en células en cultivo como en muestras tisulares. Mediante este procedimiento que utiliza gradientes de sacarosa se obtiene una gran pureza nuclear.

Para el EMSA se utilizó una mezcla de reacción que contenía: 10 μ g de extractos nucleares, 7.5 μ g/ml BSA, 1 μ g poli (dI-dC) (Amersham Biosciences), 5 μ l de tampón de unión (5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 175 mM NaCl, 37.5% glicerol, 37.5 mM HEPES) y 50000 cpm de oligonucleótidos consenso para NF- κ B y AP-1 (Santa Cruz) marcados con [γ - ^{32}P] ATP. La mezcla de reacción se incubó 30 min a T.A. La verificación de los lugares de unión específicos para NF- κ B y AP-1 se realizó mediante ensayos de competición, añadiendo 100 veces la cantidad de oligonucleótidos no marcados. La mezcla de reacción se analizó mediante SDS-PAGE al 5% de acrilamida. El gel se secó al vacío durante 60 min a 70°C, se expuso en films para rayos X durante 24h a -80°C y finalmente se cuantificó con PhosphorImager (Biorad). Los oligonucleótidos consenso de NF- κ B y AP-1 utilizados para este ensayo fueron:

- 1) NF- κ B, 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'
- 2) AP-1, 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGGA-3'.

3.6. ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Como estudio adicional a la medida de activación de factores de transcripción mediante EMSA, se realizó además un análisis por inmunofluorescencia de NF- κ B, para corroborar que su activación conllevaba a su traslocación al núcleo de la célula. Para ello, los astrocitos de 11 días de cultivo se sembraron en cubres de 16 mm, y tras estimularlos con etanol durante 30 min y 24 h, las células se lavaron con tampón fosfato salino Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (PBS + 1.5mM MgCl₂ + 1mM CaCl₂) (Gibco) frío y se fijaron con formaldehído (Merck) al 3.7% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras cinco lavados con PBS, se permeabilizaron con 5% suero bovino fetal, 5% suero de cabra normal y 0.1% Tritón X-100 en PBS. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos anti-p65 NF- κ B de conejo (1:1000, Santa Cruz) y anti-GFAP de ratón (1:200, Sigma-Aldrich) durante 2 h a T.A. Tras varios lavados con PBS, las células se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína y rodamina, (anti-ratón conjugado con fluoresceína, 1:200, Sigma-Aldrich y anti-conejo conjugado con rodamina, 1:200, Sigma-Aldrich). Una vez incubados los anticuerpos secundarios, los cubres se lavaron varias veces con PBS, y el núcleo celular se tiñó con Hoechst (1:20000, Molecular Probes). Para el montaje se utilizó FA Mounting Fluid (BD Disco) y las micrografías se tomaron con un microscopio Zeiss (Axioskop) utilizando el programa SPOT.

Otro de los ensayos realizados por inmunofluorescencia, fue la detección del receptor IL-1RI, junto con marcadores de los *lipid rafts*, para el estudio de movilidad del mismo y su colocalización. Los astrocitos se sembraron en cubres de 16 mm, y tras 11 días de cultivo se realizaron los

tratamientos con etanol (10 y 50 mM) o con IL-1 β (10 ng/ml), durante 0, 5, 10 y 30 min. Para los experimentos de colocalización con IL-1RI, se usó Vybrant® Alexa Fluor 488 *Lipid rafts* labeling kit (Molecular Probes), constituido por la subunidad B de la toxina colérica (CT-B) conjugada a Alexa Fluor 488 fluorescente en verde, que se une específicamente al gangliósido G_{M1} de membrana, y que es un componente selectivo de los *lipid rafts*. Para este procedimiento las células se lavaron 2-3 veces con medio completo frío, y se incubaron con CT-B en PBS a 4°C durante 10 min. Posteriormente, tras lavarse con PBS frío, las células se fijaron con formaldehído al 3,7%, y se incubaron en oscuridad durante 1 h a T.A. con la solución de bloqueo (10% suero bovino fetal, 5% leche desnatada en polvo, 0.5% BSA en PBS). Posteriormente, las células se incubaron con anti-IL-1RI, seguido de un anti-conejo conjugado con rodamina (1:200, Jackson ImmunoResearch) en PBS.

Una vez incubados los anticuerpos secundarios, los cubres se lavaron varias veces con PBS y el núcleo se tiñó con Hoechst (1:20000, Molecular Probes). Para el montaje se utilizó FA Mounting Fluid (BD Disco) y las micrografías se tomaron con un microscopio confocal LCS Lite TCS-AOBS-SP2 (Zeiss).

3.7. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS (IL-1 β y TNF- α) Y ANTI-INFLAMATORIAS (IL-10)

Los niveles de citoquinas IL-1 β , IL-10 y TNF α (pg/ml) se determinaron mediante ELISA específicos (R & D System, para IL-1 β y TNF- α y Pharmingen, para IL-10), tanto en suero y cerebro, como en el medio de hepatocitos o astrocitos en cultivos controles y expuestos al alcohol. Para

estas últimas determinaciones, las células se mantuvieron con medio definido y sin suero, y las citoquinas se determinaron en el medio de 24 o 48 h de cultivo. Para determinar niveles de citoquinas en corteza cerebral, las muestras de cerebro se pulverizaron mecánicamente con un politrón, y se lisaron en tampón 10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Tritón X100, durante 1 h a 4°C. Tras centrifugar el lisado a 10000xg 10 min, las citoquinas se determinaron en el sobrenadante.

3.8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm DE LOS RECEPTORES IL-1RI e IL-10R Y DE LAS PROTEÍNAS INFLAMATORIAS iNOS Y COX-2 MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Además de la medida de las proteínas IL-1RI, IL-10R, COX-2 e iNOS mediante inmunotransferencia (Sección 3.5), se analizaron los niveles de ARNm mediante RT-PCR (SYBR® Green PCR, Applied Biosystems).

El ARN total se extrajo utilizando el kit TriReagent RNA (Sigma). La reacción en cadena de la polimerasa se efectuó con 100 ng de ARN total y a una temperatura de 65°C durante 35 ciclos, con los cebadores que se describen a continuación, y utilizando la ciclofilina como referencia:

- IL-1RI: 5' 3' GATTATGAGCCCACGGAATGA
 reverso 5' 3' CGTGACGTTGCAGATCAGTTG
- IL-10R: 5' 3' TCGAGGAAGCCTCCCGACTT
 reverso 5' 3' TCAGCTCGGGTGACACCTTT
- iNOS: 5' 3' CGGGATGTGGCTACCACTTT
 reverso 5' 3' GTAATCCTCAACCTGCTCCTCACTC

- COX-2: 5' 3' GGAAATGCTGCATTGTTGGTT
reverso 5' 3' CCACATCGGTTGCTCCTAACAT
- Ciclofilina: 5' 3' GCCATCCAGCCACTCAGTCT
reverso 5' 3' CAAATGCTGGACCAAACACAA

Los productos obtenidos de la PCR se analizaron y cuantificaron mediante GeneAmp 5700 Sequence Detector.

3.9. MEDIDA DE APOPTOSIS Y CASPASA-3

Para evaluar la apoptosis se utilizó un kit (Cell death detection ELISA, Roche) que cuantifica histonas asociadas a la fragmentación del ADN de pequeño tamaño (mono- y oligonucleosomas en fracciones citoplásmicas), característica de muerte celular por apoptosis. Se utilizaron lisados citoplásmicos de las cortezas cerebrales y astrocitos en cultivo.

Para la medida de caspasa-3 se utilizó la técnica de inmunotransferencia para detectar pro-caspasa 3 (32 kDa).

3.10. AISLAMIENTO DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS* EN AUSENCIA DE DETERGENTE: USO DE Na₂CO₃ pH 11

Tras el tratamiento de los astrocitos con etanol (10 y 50 mM), IL-1 β o LPS a diferentes tiempos, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 400 μ l de tampón de homogeneización pH 11 (150 mM Na₂CO₃, 2 mM EDTA, 10 mM Na₄P₂O₇, 100 mM NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 2 μ M leupeptina, 0.5 mM PMSF, 2 μ M aprotinina). El lisado se homogeneizó

pasandolo 10 veces a través de una jeringa de 25 G x 5/8" y posteriormente sonicándolo 3 veces durante 10 segundos a 100% de potencia máxima. Se recogió un volumen total de lisado de 370 μ l y tras mezclarlo con 370 μ l de de sacarosa al 80% (en agua bidestilada), se depositó en el fondo de un tubo de ultracentrífuga de 4 ml. Posteriormente, se depositaron encima 1.640 ml de una solución de sacarosa al 35%, y 1.640 ml de solución de sacarosa al 5% en MES (25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA). El gradiente se centrifugó a 200000xg (39000 rpm) a 4°C durante 16 h, en una ultracentrífuga XL-80 (Sorvall), utilizando un rotor SW60Ti (Sorvall). Trascurrido este tiempo, se separaron fracciones de 0.5 ml del gradiente, desde la fracción 1 (menos densa) hasta la fracción 8 (más densa). El precipitado resultante de la ultracentrifugación se resuspendió en 0.5 ml de tampón de homogeneización pH 11 con inhibidores de proteasas (precipitado). Todas las fracciones se prepararon para su posterior análisis por SDS-PAGE, cargando aprox. en cada pocillo del gel, 75 μ l de cada fracción. La comprobación de que el aislamiento había sido correcto, se realizó mediante el uso de anticuerpos marcadores de los *lipid rafts*, como anti-caveolina-1 y anti-flotilina-1. Normalmente, las fracciones más enriquecidas en caveolas solían estar en las fracciones 3-5, entre una densidad del 15-25% de sacarosa.

3.11. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Para la cuantificación del trabajo experimental se utilizó el programa Graph Pad (versión 3.0), y el programa Microsoft Excel, para el cálculo de la media y la SD (desviación estándar), así como la comprobación de la significación mediante el test one- y two- way ANOVA. El programa Excel fue empleado para la construcción de las gráficas y el Adobe Photoshop (versión 7.0) para el procesamiento de las imágenes de fluorescencia.

4. RESULTADOS

Capítulo 4: RESULTADOS

4.1. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INDUCE DAÑO INFLAMATORIO EN EL HÍGADO Y ACTIVA LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR ASOCIADAS A IL-1 β Y A LA ENDOTOXINA LPS.

4.1.1. El consumo de alcohol causa daño hepático e incrementa los niveles de IL-1 β , TNF- α e IL-10 en suero: efecto de la administración de LPS.

Está claramente demostrado que el consumo de alcohol causa daño hepático, en un rango que comienza por la esteatosis hasta la esteatohepatitis, y en algunos casos, hasta la cirrosis. Aunque son muchos los mecanismos que se han postulado para explicar los efectos del alcohol en hígado (Tsukamoto and Lu, 2001), estudios de los últimos años sugieren que los procesos inflamatorios desempeñan un importante papel en la progresión y patogenia de la hepatopatía alcohólica (Tilg and Diehl, 2000). Específicamente, ciertas citoquinas inflamatorias, tales como TNF- α , y la endotoxina bacteriana LPS (liberada por el etanol a nivel intestinal), parecen ser las responsables del inicio del daño inflamatorio inducido por el etanol en hígado (Hoek and Pastorino, 2002). Dado que la citoquina IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria que interviene de forma activa en el proceso inflamatorio, y que junto al TNF- α inicia la cascada de procesos que median la inflamación (Dinarello, 2000), quisimos estudiar la posible participación de esta citoquina y su respuesta, en la inflamación asociada a la hepatopatía

alcohólica. Al mismo tiempo, quisimos analizar si la endotoxina LPS potenciaba el daño hepático inducido por el etanol.

Para contestar a estas preguntas utilizamos ratas alimentadas con una dieta líquida alcohólica o control durante 20 semanas. Las ratas alcoholizadas presentaban una hepatomegalia o incremento de peso hepático con respecto al peso corporal (0.03 ± 0.005 gr en ratas control frente a un 0.046 ± 0.006 gr en ratas alcohol). Este incremento en el peso hepático se acompañó de alteraciones ultraestructurales hepáticas (incremento en el tamaño de los hepatocitos, daño mitocondrial, acumulación de grasa, incremento del retículo endoplásmico) (Valles et al., 2003), junto con aumentos significativos en las enzimas séricas AST (aspartato aminotransferasa, 43.7 ± 10 UI/litro en ratas control frente a 95.15 ± 14 UI/litro en ratas alcohol) y ALT (alaninoaminotransferasa, 14.1 ± 3 UI/litro en control frente a 34.15 ± 9.1 UI/litro en ratas alcohol), enzimas marcadoras de daño hepático.

Para analizar si la endotoxina LPS potenciaba el daño hepático inducido por el consumo de alcohol, se administró esta toxina a animales control y alcohólicos. De acuerdo con resultados previos (Deaciuc et al., 2000), la administración intraperitoneal de LPS (0.5 mg/Kg), incrementó los niveles en suero de AST (71.5 ± 3 UI/litro) y de ALT (71.8 ± 20 UI/litro). Los aumentos en los niveles de estas enzimas fue muy superior en las ratas alcohólicas inyectadas con LPS (AST 108 ± 10 UI/litro; ALT 150.3 ± 30 UI/litro) (Valles et al., 2003).

Paralelamente al incremento en los niveles de AST y ALT, el consumo crónico de alcohol aumentó en 3 veces los niveles séricos de TNF- α (9.6 ± 1.2 pg/ml en ratas control frente a 26.5 ± 10.2 pg/ml en ratas

alcohol) y, en 4 y 7 veces los niveles de IL-1 β e IL-10, respectivamente (Figura 1). El tratamiento con LPS también indujo un incremento de los valores séricos de estas citoquinas (10 veces para TNF- α , 5 veces para IL-1 β y 13 veces para IL-10), pero sólo los niveles de IL-1 β e IL-10 incrementaron mucho más al administrar LPS en ratas alcoholizadas. Estos resultados se muestran en la Figura 1.

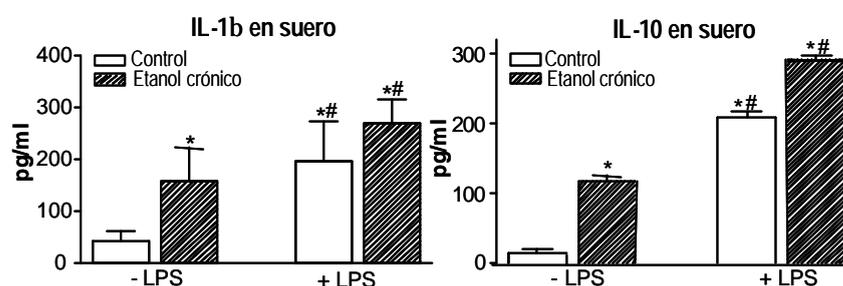


Figura 1. El consumo crónico de alcohol, la administración de LPS o ambos, incrementan los niveles de IL-1 β e IL-10 en suero. Ratas alimentadas con dieta líquida control y alcohol, se les administró LPS a una concentración 0.5 mg/kg. Transcurridas 24 h, los niveles en suero de las citoquinas IL-1 β e IL-10 se determinaron mediante ELISA específicos, tal y como se describe en Material y Métodos (Sección 3.7). Los datos se presentan como media \pm SD (n=5). * $p < 0.01$ frente al grupo dieta líquida control; # $p < 0.05$ frente a ratas no tratadas con LPS, en un test two-way ANOVA.

4.1.2. La estimulación de hepatocitos en cultivo con etanol o LPS causa liberación de citoquinas inflamatorias.

Está bien establecido que las células de Kupffer son las principales productoras de citoquinas inflamatorias en el hígado (Adachi et al., 1991; Adachi et al., 1995; Nanji et al., 1993). Sin embargo, se desconoce si los hepatocitos pueden liberar citoquinas, en presencia de endotoxinas u otros estímulos. Hay que considerar que la población de hepatocitos representa el 85% del volumen hepático (Tsukamoto and Lu, 2001), y que la liberación de citoquinas por estas células podría contribuir al aumento de citoquinas que observamos en animales alcohólicos.

Por tanto, nuestro siguiente objetivo, fue aislar hepatocitos de animales control y alcohólicos, estimularlos con LPS y etanol, y medir la posible liberación de citoquinas. Para ello, cultivos de hepatocitos procedentes de ratas control y alcoholizadas, se incubaron con etanol (25 y 50 mM) o LPS (50 ng/ml), y se midió la secreción de IL-1 β e IL-10 en el medio de cultivo después de 24 h de tratamiento.

Los resultados de la Figura 2 muestran que, tanto el etanol (25 o 50 mM), como el LPS, son capaces de aumentar la liberación de IL-1 β e IL-10 en el medio de hepatocitos control. Sin embargo, en hepatocitos procedentes de ratas alcoholizadas, sólo la administración de LPS fue capaz de aumentar significativamente los niveles de IL-1 β e IL-10. Es interesante resaltar que los hepatocitos alcohol, incluso en ausencia de tratamiento con etanol, liberaron grandes cantidades de IL-1 β e IL-10, en comparación con los niveles en hepatocitos control (Figura 2).

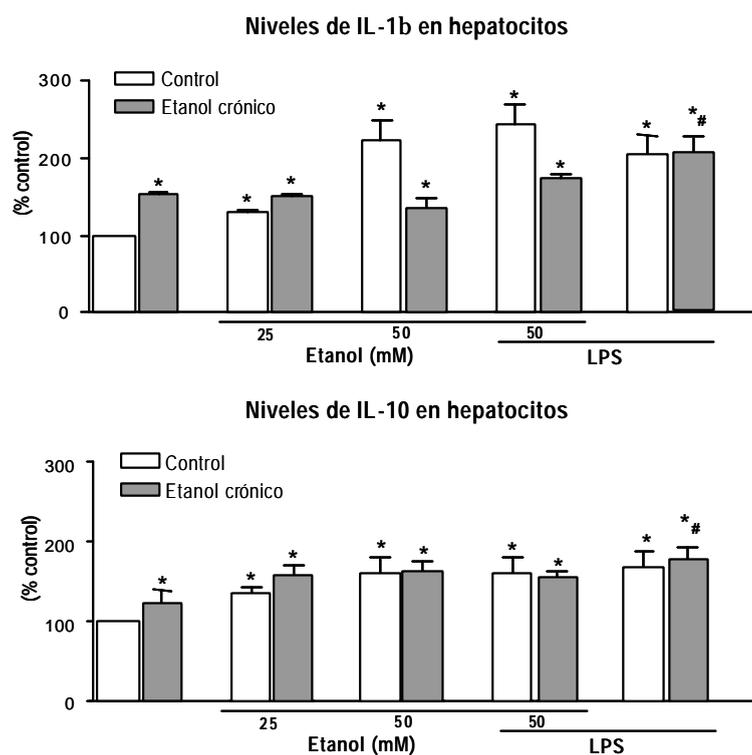


Figura 2. El tratamiento con etanol y LPS estimula la secreción de IL-1b e IL-10 en hepatocitos en cultivo. Los hepatocitos aislados de ratas con dieta líquida control y alcohol, fueron incubados con etanol (25 o 50 mM), LPS (50 ng/ml), o 50 mM etanol+LPS, durante 24 h. Transcurrido este tiempo, los medios de cultivo celular se recogieron y la secreción de IL-1 β e IL-10 se determinó mediante ELISA específicos (Sección 3.7). Los valores control para IL-1 β e IL-10 fueron 464.3 ± 0.8 pg / 1.4×10^6 células y 162.7 ± 0.5 pg / 1.4×10^6 células en 24 h, respectivamente. Los valores son media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.02$ frente a hepatocitos control y # $p < 0.05$ frente a hepatocitos alcohol, en un test two-way ANOVA.

Ante estos resultados, un objetivo importante era evaluar la pureza del cultivo de hepatocitos, ya que contaminaciones de células de Kupffer en

estos cultivos, podrían explicar la liberación de citoquinas inducida por el LPS o el etanol.

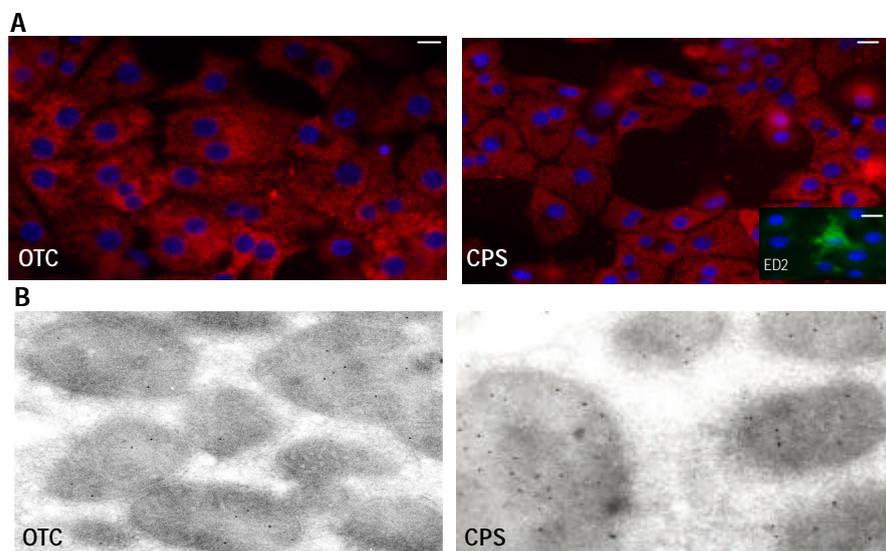


Figura 3. Análisis de la pureza de hepatocitos en cultivo mediante inmunofluorescencia e inmunocitoquímica. (A) Los hepatocitos confluentes crecidos en presencia de fibronectina, se fijaron y tiñeron con CPSI, OTC, ED1 o ED2. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Solo el 0,05% de las células expresaron ED2 (tal y como su muestra en el ejemplo). Barra = 10 μm . **(B)** El marcaje con oro para OTC y CPSI mostró la localización mitocondrial de estas enzimas. Todas las células manifestaron sitios de unión con anti-CPS y anti-OTC, y ninguna célula ED2 positiva se observó. Magnificación X 42.500.

Este objetivo lo abordamos utilizando técnicas de inmunofluorescencia e inmunocitoquímica. Utilizamos como marcadores de hepatocitos, los enzimas intra-mitocondriales del ciclo de la urea: carbamil fosfato sintetasa I (CPSI) y la ornitina transcarbamilasa (OTC). Como marcadores de células de Kupffer y monocitos, utilizamos la ED2 y ED1 (Barbe et al., 1990), respectivamente. Los resultados se analizaron por microscopia confocal y revelaron que de 5500 células, el 99,95% expresaban CPSI y OTC, mientras que sólo el 0,05% (3 células) expresaba ED2 y ninguna de ellas expresó ED1 (Figura 3), lo que demostraba que las citoquinas detectadas en el medio de cultivo habían sido producidas y liberadas por los hepatocitos.

4.1.3. El consumo de alcohol afecta a los niveles de IL-1RI en hígado y en hepatocitos en cultivo

Para analizar si el aumento en los niveles de IL-1 β e IL-10 que inducía el consumo crónico de alcohol, se asociaba con cambios en la expresión de los receptores IL-1RI e IL-10R, se analizaron los niveles de estos receptores en microsomas y en hepatocitos en cultivo, procedentes de hígados de ratas control y alcohólicas. La expresión de estos receptores se evaluó mediante inmunotransferencia y RT-PCR.

Nuestros resultados demostraron que el consumo crónico de alcohol incrementa los niveles de IL-1RI, pero no de IL-10R (Figura 4). Sin embargo, los niveles de ARNm de ambos receptores no se afectaron tras el consumo de alcohol, sugiriendo que los efectos del etanol sobre IL-1RI, podrían deberse a alteraciones en la internalización o endocitosis del receptor (datos no mostrados) (Tuma et al., 1996).

La administración de LPS, tanto a ratas control como alcohólicas y en el cultivo de hepatocitos tratados o no con etanol, aumentó significativamente los niveles de IL-1RI, pero no los niveles de IL-10R (Figura 4).

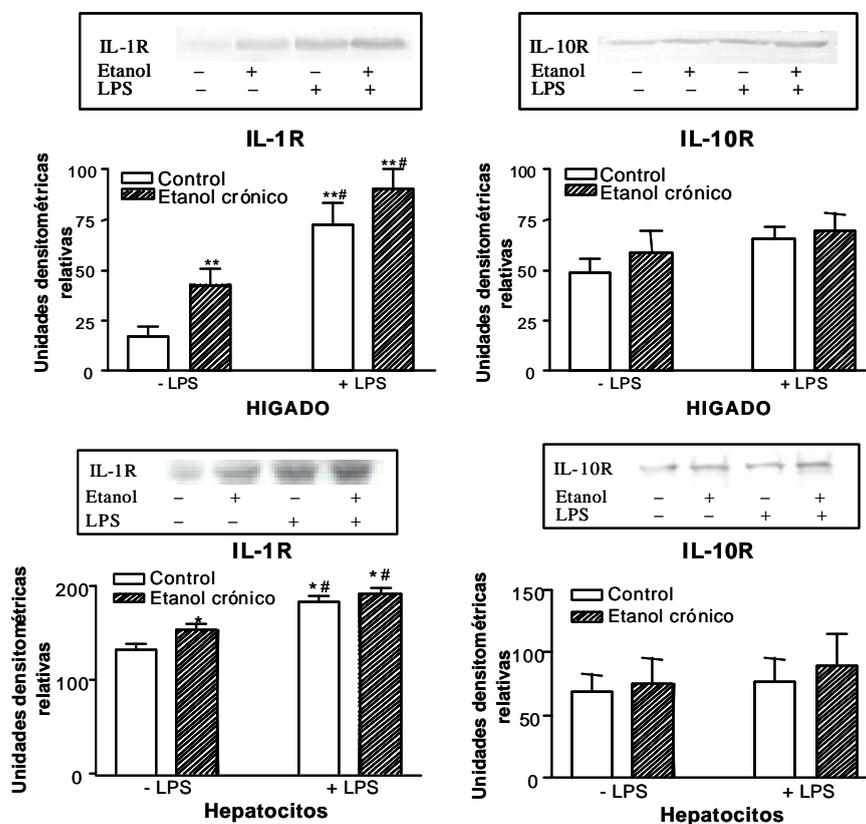


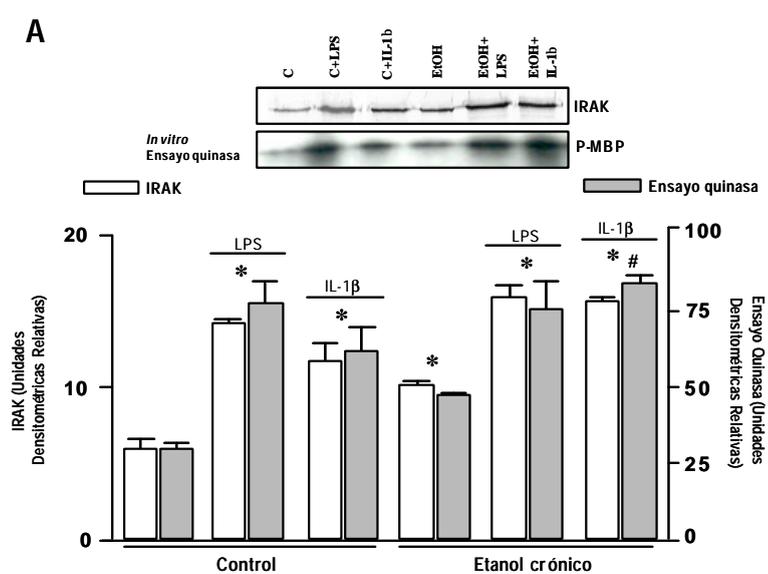
Figura 4. El consumo crónico de alcohol incrementa los niveles del receptor IL-1RI en hígado y en hepatocitos. Se usaron fracciones microsomales de hígado y hepatocitos aislados de ratas con dieta líquida control y alcohol, tratados o no con LPS (en ratas se administró LPS 0.5 mg/kg, 24 h; en hepatocitos se trató con LPS 50 ng/ml, 24 h), y se analizaron IL-1RI e IL-10R mediante inmunotransferencia. Los histogramas presentados son cuantificaciones densitométricas (media \pm SD) de 5 experimentos para hígado y de 4 experimentos para hepatocitos. ** $p < 0.01$ frente a hígado de rata con dieta líquida control; # $p < 0.05$ frente a hígado de rata no tratada con LPS, y * $p < 0.05$ frente a hepatocitos de rata

con dieta líquida control, # $p < 0.05$ frente a hepatocitos no tratados con LPS, en un test two-way ANOVA.

4.1.4. El consumo crónico de alcohol induce la fosforilación de las quinasas IRAK y ERK1/2 en hepatocitos

Para determinar si la inducción de IL-1RI por el etanol, afecta a su cascada de señalización intracelular, se estudió la activación de IRAK y ERK1/2, tras la estimulación con IL-1 β o LPS en hepatocitos procedentes de ratas con dieta líquida control y alcohol. La estimulación, tanto con IL-1 β o con LPS, incrementó la fosforilación de IRAK y ERK1/2, tanto en hepatocitos de rata control como alcohólica.

Un resultado de interés fue el aumento en la fosforilación de estas quinasas en hepatocitos de ratas alcohólicas, en ausencia de IL-1 β o LPS (Figura 5).



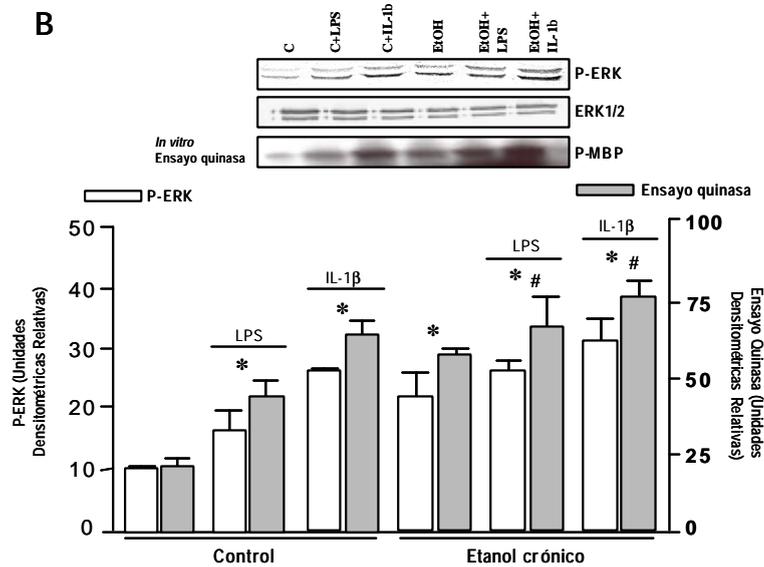


Figura 5. La exposición crónica al alcohol induce la activación y fosforilación de IRAK y ERK1/2 en hepatocitos, tratados o no con LPS e IL-1 β . Los hepatocitos en cultivo procedentes de ratas control y alcohólicas, con o sin estimulación con LPS (50 ng/ml) o IL-1 β (10 ng/ml) durante 10 min, se lisaron y los extractos proteicos se inmunoprecipitaron con anticuerpos monoclonales anti-IRAK y anti-ERK1/2, analizándose los niveles de IRAK (A) y la fosforilación de ERK (B) mediante inmunotransferencia. Las membranas se reprobaron y se midieron los niveles totales de ERK1/2. La actividad quinasa de IRAK y ERK1/2 se determinó mediante un ensayo quinasa *in vitro* (ver Material y Métodos, Sección 3.5.2), analizándose la fosforilación de la proteína básica de mielina (P-MBP). Los valores son media \pm SD de 4 experimentos independientes. * $p < 0.01$ frente a hepatocitos de rata con dieta líquida control, # $p < 0.01$ frente a hepatocitos control no tratados con LPS o IL-1 β , en un test two-way ANOVA.

4.1.5. El consumo crónico de alcohol induce la activación del factor de transcripción NF- κ B en hepatocitos en cultivo

La fosforilación de IRAK y ERK1/2 puede conducir a la traslocación de NF- κ B al núcleo y su activación. Por tanto, quisimos analizar si el etanol activaba la vía IRAK/ERK/NF- κ B. Para ello, aislamos fracciones nucleares de hepatocitos procedentes de ratas control y alcohol, estimulados o no con IL-1 β o LPS, y se evaluó la unión al ADN de este factor utilizando EMSA (Figura 6.A). Los resultados de esta figura muestran que hepatocitos de ratas con dieta alcohol presentan una alta activación de NF- κ B de forma constitutiva, comparada con las ratas control. La estimulación con IL-1 β o LPS causó una activación similar, tanto en hepatocitos control como en los procedentes de ratas alcohol.

La activación transcripcional de NF- κ B está mediada por la fosforilación y posterior degradación de su inhibidor citoplasmático, I κ B- α . En presencia de un estímulo, I κ B- α se degrada, permitiendo la traslocación de NF- κ B al núcleo (Karin and Ben-Neriah, 2000). De acuerdo con estos datos, la activación de NF- κ B tras el tratamiento con IL-1 β , se acompañó con un descenso de los niveles citoplasmáticos de I κ B- α en hepatocitos control y alcohol. Es interesante resaltar que en hepatocitos procedentes de ratas alcohólicas se observó una disminución de I κ B- α , incluso en ausencia de IL-1 β (Figura 6.B), lo que explicaría la activación constitutiva de NF- κ B en estas células.

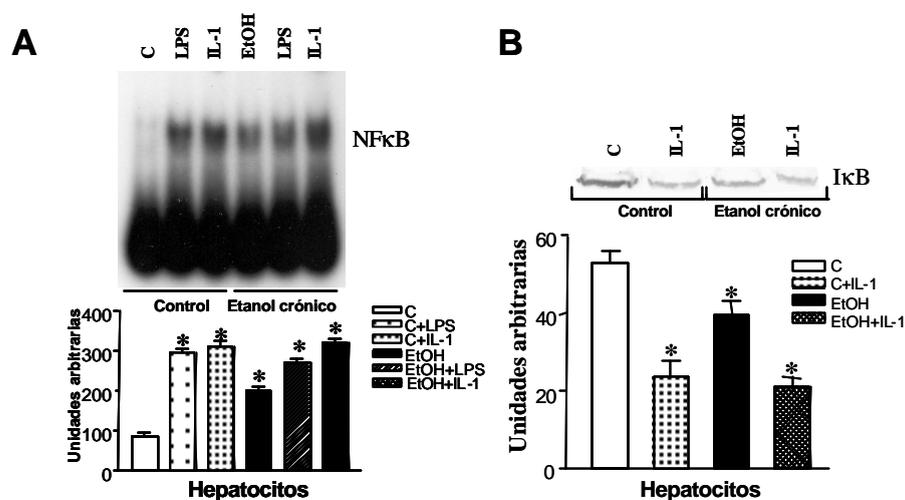


Figura 6. El tratamiento crónico con etanol incrementa la activación de NF-κB inducida por LPS o IL-1β en hepatocitos en cultivo. Se usaron hepatocitos en cultivo, procedentes de ratas control y alcohólicas, con o sin estimulación con LPS (50 ng/ml) o IL-1β (10 ng/ml) durante 30 min. **(A)** Se extrajeron los extractos nucleares para su análisis mediante EMSA, usando γ -³²P-oligonucleótidos de NF-κB (ver Material y Métodos, Sección 3.5.3). Los valores densitométricos de las bandas de NF-κB (media ± SD) de 4 experimentos diferentes se presentan en la gráfica. **(B)** Análisis de los extractos citoplásmicos (30 μg) para κB-α mediante inmunotransferencia de hepatocitos de ratas con dieta control y alcohol, tratados o no con IL-1β. El histograma representa media ± SD de las cuantificaciones densitométricas de los resultados obtenidos de 4 experimentos independientes. * $p < 0.01$ frente a hepatocitos control no estimulados, en un test two-way ANOVA.

Para evaluar si la activación de NF-κB, se producía vía ERK1/2 o p38 MAPK, los hepatocitos control y de ratas alcohólicas, se pre-trataron con PD-98059 (inhibidor de ERK1/2) o con SB-203580 (inhibidor de p38), antes de su estimulación con IL-1β. Los resultados demostraron que, mientras el

tratamiento con PD-98059 disminuye la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β ($30 \pm 2\%$, $p < 0.02$ y $29 \pm 3\%$, $p < 0.05$, en hepatocitos control y alcohol, respectivamente), la inhibición de p38 MAPK no afectó a la unión al ADN de este factor de transcripción (Figura 7).

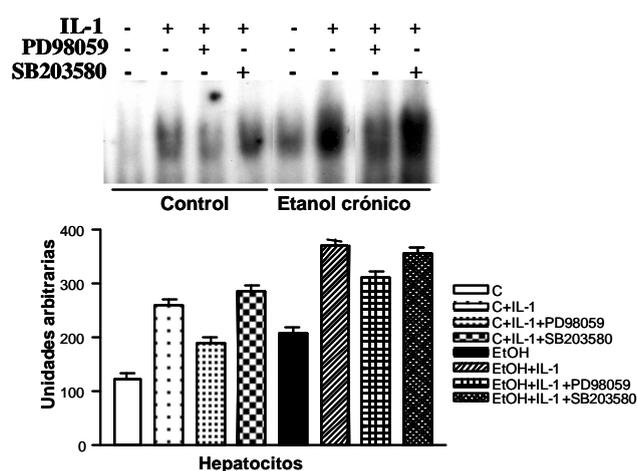


Figura 7. La inhibición en la actividad de la quinasa ERK1/2 afecta a la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β en hepatocitos en cultivo. Los hepatocitos procedentes de ratas control y alcohólicas se pre-trataron con el inhibidor de ERK1/2 PD-98059 ($10 \mu\text{M}$) o con el inhibidor de p38 SB-203580 ($10 \mu\text{M}$) durante 2 h. Transcurrido este tiempo, los hepatocitos se estimularon con IL-1 β (10 ng/ml) durante 30 min y se extrajeron los extractos nucleares para su análisis mediante EMSA, usando γ - ^{32}P -oligonucleótidos de NF- κ B (ver Material y Métodos, Sección 3.5.3). Los valores densitométricos de las bandas de NF- κ B (media \pm SD) de 3 experimentos diferentes se presentan en la gráfica.

4.2. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INDUCE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y MUERTE CELULAR EN CORTEZA CEREBRAL Y EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

4.2.1. El tratamiento con etanol incrementa los niveles de IL-1 β , la expresión de IL-1RI, así como la fosforilación de IRAK, en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo

Los resultados anteriores demostraban que la vía de señalización asociada a IL-1 β , puede desempeñar un papel esencial en la estimulación de mediadores inflamatorios y daño celular inducidos por el alcohol, tanto en hígado como en hepatocitos. Ante estos resultados, nos preguntamos si el etanol estimulaba la vía de señalización asociada a IL-1 β , sólo en hepatocitos, o también ocurría en otros tipos celulares. Para responder a esta pregunta, utilizamos astrocitos, ya que estudios recientes habían demostrado que la IL-1 β , era un potente activador de estas células e inducía importantes cambios funcionales y fenotípicos (Hua et al., 2002). Además, resultados de nuestro laboratorio indicaban que las células astrogliales eran muy susceptibles a los efectos tóxicos del etanol (Guerra and Renau-Piqueras, 1997; Guerra et al., 1990).

Para determinar si el etanol era capaz de estimular a los astrocitos y liberar citoquinas, tales como IL-1 β , astrocitos en cultivo primario se expusieron a 75 mM de etanol durante 7 días y se recogió el medio de cultivo, para analizar los niveles de IL-1 β mediante ELISA. Se observó que mientras los astrocitos control (c) liberaron 100 ± 12 pg/ml de IL-1 β , los

astrocitos tratados con etanol (Et) secretaron aprox. 178 ± 40 pg/ml (Figura 8.A).

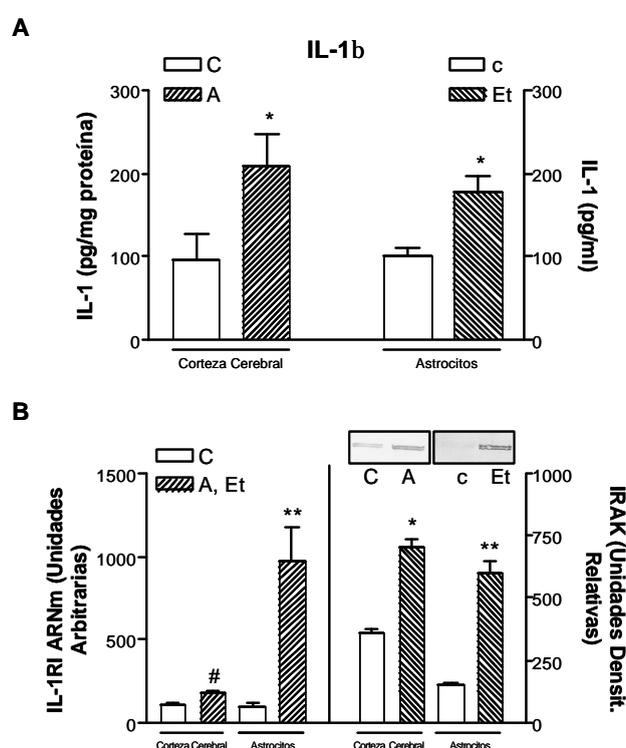


Figura 8. El tratamiento crónico con alcohol incrementa la secreción de IL-1b y la expresión de IL-1RI e IRAK, en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo. **(A)** Los lisados obtenidos de corteza cerebral de ratas con dieta líquida control y alcohol, se usaron para determinar los niveles de IL-1 β mediante ELISA específico (Sección 3.7). Para evaluar el efecto crónico del etanol sobre la secreción de IL-1 β en astrocitos, las células se incubaron con etanol 75 mM, durante 7 días. Los niveles de IL-1 β se determinaron en el medio de cultivo mediante ELISA específico. **(B)** Los niveles de ARNm y proteína de IL-1RI e IRAK se evaluaron mediante RT-PCR e inmunotransferencia respectivamente, en corteza cerebral de ratas control (C) y alcohólicas (A), así como en astrocitos tratados (Et) o no (c) con etanol. Los valores son media \pm SD de tres experimentos diferentes. ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$, # $p < 0.04$ frente a grupo control, en un test one-way ANOVA.

Al mismo tiempo, se analizó si la secreción de IL-1 β inducida por el etanol, ocurría de forma concomitante con la activación de su respuesta de señalización, es decir, un aumento en la activación de IL-1RI e IRAK. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento crónico de etanol inducía un incremento de los niveles de ARNm de IL-1RI (\sim 8 veces) y de fosforilación de IRAK (\sim 4 veces) en astrocitos (Figura 8.B).

De forma paralela, se realizaron los mismos estudios en corteza cerebral de ratas tratadas durante 5 meses con dieta líquida control (C) y alcohólica (A). Los resultados revelaron que el consumo crónico de alcohol incrementa en corteza cerebral y en astrocitos, los niveles de IL-1 β , activa la fosforilación de IRAK y aumenta la expresión del ARNm de IL-1RI (Figura 8.A, B).

4.2.2. La exposición crónica al alcohol estimula en corteza cerebral y en astrocitos corticales, la fosforilación de ERK1/2, p38/MAPK y JNK/SAPK

Puesto que la estimulación de IL-1RI e IRAK puede conllevar a la activación de diferentes MAP quinasas (MacGillivray et al., 2000; Valles et al., 2003), examinamos si el etanol era capaz de activar la fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK, en astrocitos expuestos (Et) o no (c) al etanol, así como en corteza cerebral de ratas control (C) y alcoholizadas (A).

Utilizando técnicas de inmunotransferencia, pudimos demostrar que el tratamiento con etanol estimula significativamente las tres quinasas, tal y como lo demuestra el aumento de las proteínas fosforiladas (P-ERK, P-p38 y P-JNK), tanto en astrocitos en cultivo (Figura 9.A), como en cortezas

cerebrales (Figura 9.B), sin cambios significativos en los niveles totales de ERK1/2, p38 y JNK.

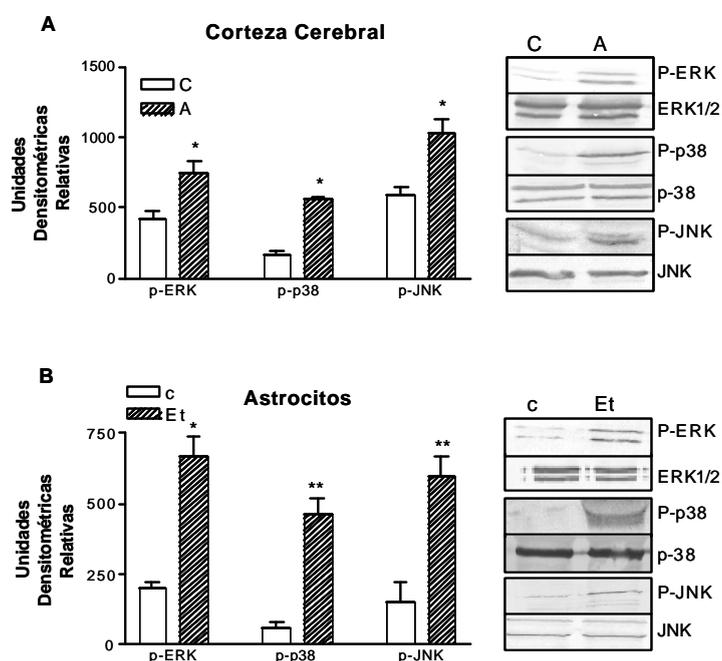


Figura 9. El tratamiento crónico de etanol induce la activación y fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK en corteza cerebral y en astrocitos. Los niveles de fosforilación de las quinasas ERK, p38 y JNK se determinaron mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpos específicos anti-P-ERK, anti-P-p38 y anti-P-JNK, en **(A)** cortezas cerebrales procedentes de ratas con dieta líquida control (C) y alcohol (A), y en **(B)** astrocitos en cultivo tratados (Et) o no (c) con 75 mM de etanol durante 7 días. Posteriormente las membranas se reprobaron, y se midieron los niveles totales de ERK1/2, p38 y JNK. Los valores son media \pm SD de 4 experimentos independientes. ** $p < 0.001$, * $p < 0.02$ frente a las muestras control, en un test one-way ANOVA.

4.2.3. El consumo de alcohol induce la expresión de los mediadores inflamatorios, iNOS y COX-2 en corteza cerebral y en astrocitos

Se sabe que la activación de la cascada de señalización asociada a IL-1RI, puede conducir a un aumento de mediadores inflamatorios, como iNOS y COX-2 (Chowdhury et al., 2006; Wong et al., 1996). Por tanto, quisimos determinar si el tratamiento crónico de alcohol, inducía cambios en los niveles de estas proteínas, tanto en astrocitos como en corteza cerebral.

Los resultados obtenidos mediante inmunotransferencia y RT-PCR demostraron que, astrocitos tratados de forma crónica con etanol, muestran incrementos significativos en los niveles de expresión de iNOS (3 veces) y COX-2 (9 veces) (Figura 10.A). No obstante, aunque la inducción de iNOS se correlacionó con un aumento en sus niveles de ARNm, no se observaron cambios en el ARNm de COX-2, sugiriendo que el incremento de esta proteína, no es debido a cambios en la expresión del gen COX-2, sino que se produce a nivel post-transcripcional.

La posible inducción de iNOS y COX-2 en cortezas cerebrales de ratas alcohólicas también se realizó con las mismas técnicas. En este caso, se observó una potente estimulación de iNOS y COX-2, tanto a nivel génico como proteico (Figura 10.B), inducida por el tratamiento crónico de alcohol.

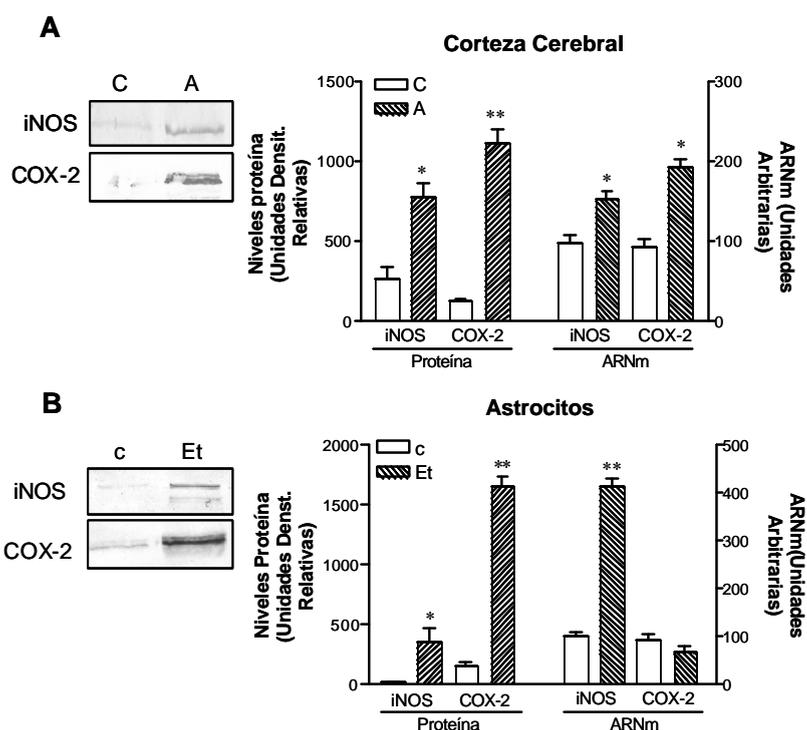


Figura 10. El tratamiento crónico con alcohol induce la expresión de iNOS y COX-2 en corteza cerebral y en astroцитos en cultivo. Los niveles de proteína y ARNm de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 se evaluaron mediante inmunotransferencia y RT-PCR, en **(A)** cortezas cerebrales procedentes de ratas con dieta líquida control (C) y alcohol (A), y en **(B)** astroцитos en cultivo tratados (Et) o no (c) con 75 mM de etanol durante 7 días. Las gráficas representan las cuantificaciones densitométricas (media \pm SD) de 4 experimentos independientes, tanto de inmunotransferencia como de RT-PCR para iNOS y COX-2. ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$ frente a las muestras control de corteza cerebral y astroцитos, en un test one-way ANOVA.

4.2.4. El tratamiento crónico con etanol induce la activación y unión al ADN de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 en corteza cerebral y en astrocitos

Ciertas citoquinas, como IL-1 β , son capaces de inducir la expresión de genes asociados con la inflamación, a través de la activación de varios factores de transcripción. Dos de estos factores son NF- κ B y AP-1, esenciales en la respuesta inflamatoria, que participan en la inducción de mediadores inflamatorios, como son iNOS y COX-2 (Marks-Konczalik et al., 1998; Means et al., 2000).

Para determinar si la estimulación de IL-1RI/IRAK/MAPK por el etanol estaba asociada con la activación de estos factores de transcripción, se realizó EMSA con los extractos nucleares, tanto de astrocitos tratados o no con etanol de forma crónica, como de corteza cerebral de rata control y alcohólica. Se observó que el etanol induce la activación y unión al ADN de NF- κ B y AP-1 (Figura 11.A). Además, la inducción de NF- κ B por el alcohol se acompañó de una disminución significativa de I κ B- α a nivel citoplasmático (Figura 11.B).

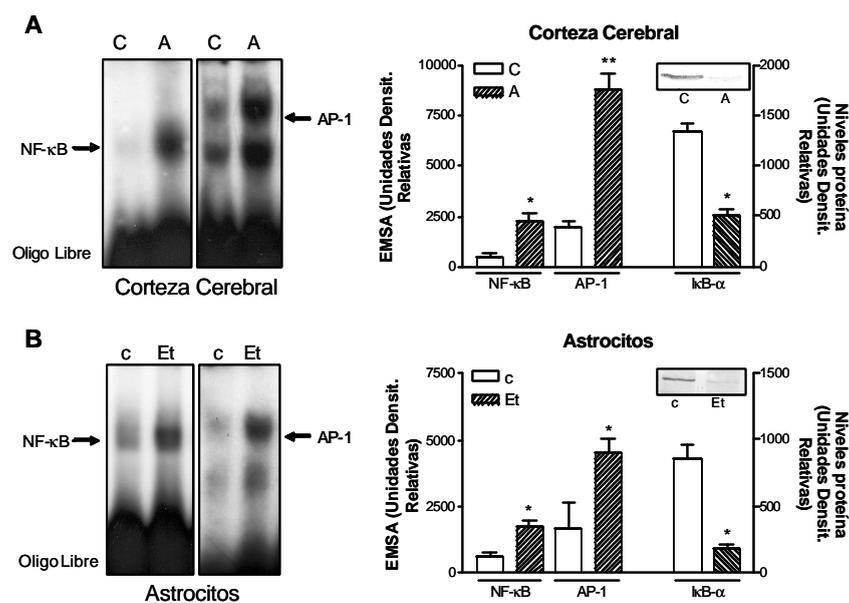


Figura 11. El consumo crónico de alcohol activa la unión al ADN de NF-κB y AP-1 en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo. La actividad de NF-κB y AP-1 se ensayó en extractos de proteína nuclear de **(A)** cortezas cerebrales procedentes de ratas con dieta líquida control (C) y alcohol (A), y de **(B)** astrocitos en cultivo tratados (Et) o no (c) con 75 mM de etanol durante 7 días, mediante EMSA, usando γ - 32 P-oligonucleótidos consenso de NF-κB y AP-1 (ver Material y Métodos, Sección 3.5.3). La inmunotransferencia realizada con extractos proteicos para el análisis de IκB-α también se presenta en las gráficas. ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$ frente a las muestras control en un test one-way ANOVA (n=4).

4.2.5. El consumo crónico de alcohol aumenta la expresión de caspasa-3 y la muerte celular por apoptosis en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo

Para explorar la posibilidad de que un aumento de mediadores inflamatorios inducido por el alcohol pudiese causar daño y muerte celular, se cuantificó fragmentos de ADN oligonucleosomal asociados a histonas, usando un kit Cell death detection ELISA (Roche).

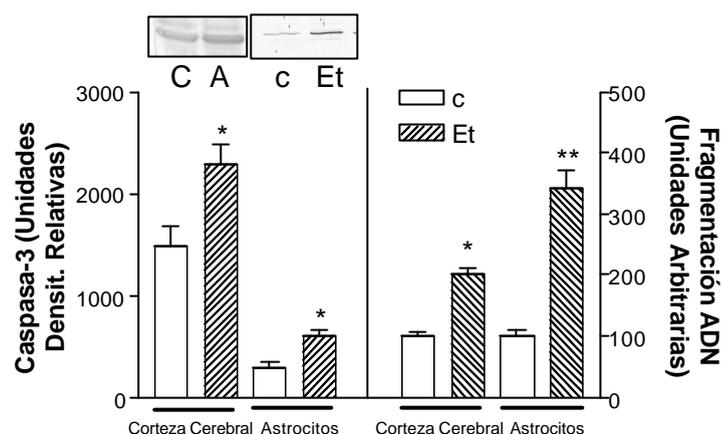


Figura 12. La exposición crónica al alcohol incrementa la expresión de caspasa-3 y la apoptosis en corteza cerebral y en astrocitos. Los niveles de pro-caspasa-3 y de fragmentación apoptótica del ADN se evaluaron mediante inmunotransferencia y el kit Cell death detection ELISA respectivamente, en lisados obtenidos de cortezas cerebrales procedentes de ratas con dieta líquida control (C) y alcohol (A), y de astrocitos en cultivo tratados (Et) o no (c) con etanol. Los valores se presentan como media \pm SD de 4 experimentos. ** $p < 0.01$, * $p < 0.03$ frente al grupo control, en un test one-way ANOVA.

La Figura 12 demuestra que la exposición crónica de alcohol, tanto *in vivo* como en astrocitos en cultivo, induce un aumento de muerte celular por apoptosis. De acuerdo con este resultado, se observó una activación de pro-caspasa-3 en corteza cerebral de ratas adultas alcohólicas y en astrocitos tratados con etanol (Figura 12).

Estos datos sugieren que la activación de mediadores inflamatorios por el etanol sería la responsable del daño cerebral observado en el alcoholismo crónico.

4.3. EL TRATAMIENTO AGUDO CON ETANOL INDUCE LA EXPRESIÓN DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS iNOS Y COX-2, A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN ASTROCITOS EN CULTIVO

4.3.1. El etanol induce un máximo de expresión de iNOS y COX-2 a 30 min y a 24 h, tanto a nivel proteico como de ARNm en astrocitos en cultivo primario

Para examinar si los efectos del etanol sobre la liberación de factores que median en la inflamación, se producen como consecuencia de procesos adaptativos del tratamiento crónico, o si el etanol es capaz de activar dichos procesos de forma rápida, incubamos los astrocitos con una única dosis de etanol (100 mM) y analizamos la expresión iNOS y COX-2 a diferentes tiempos (0, 15, 30 min; 1, 3, 24 y 72 h), mediante inmunotransferencia.

Los resultados demostraron una rápida inducción de ambas proteínas a los 10 min de la adición de etanol al medio de cultivo, aunque la máxima señal se detectó a 30 min y 24 h (Figura 13). La inducción de estas

proteínas se correlacionó con un incremento en sus niveles de ARNm (Figura 15.A, B).

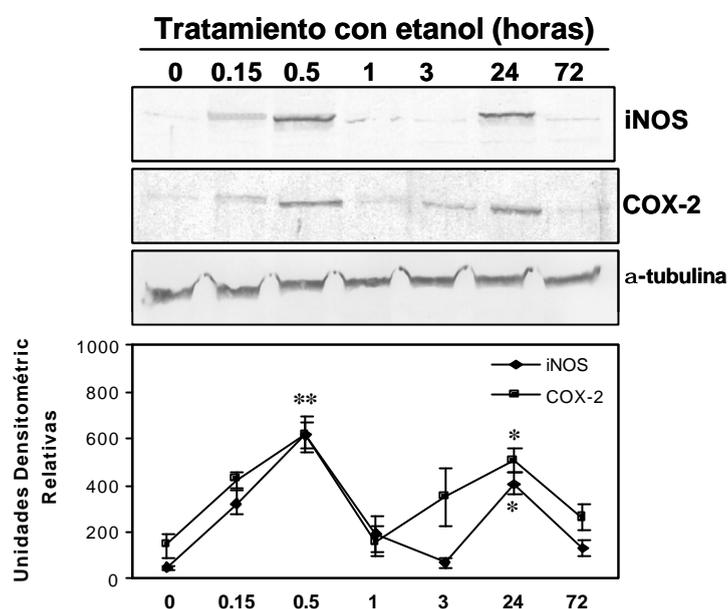


Figura 13. Una única dosis de etanol induce un aumento en los niveles iNOS y COX-2 en astrocitos, que es máximo a 30 min y a 24 h del tratamiento. Los astrocitos se incubaron con 100 mM de etanol a diferentes tiempos (0, 15, 30 min; 1, 3, 24 y 72 h) y se midieron los niveles proteicos de iNOS, COX-2 y α -tubulina mediante inmunotransferencia. La gráfica representa las cuantificaciones densitométricas (media \pm SD) de 7 experimentos independientes, ** $p < 0.02$, * $p < 0.05$ (iNOS y COX-2 frente a la muestra control), en un test one-way ANOVA.

Para confirmar la inducción en la expresión de iNOS por el etanol a las 24 h, determinamos la acumulación de nitritos (NO_2^-), el producto final estable de la degradación del óxido nítrico (NO) en el medio celular, mediante la reacción de Griess (Kolb et al., 1994). Se observó que el etanol

incrementaba de forma muy marcada la acumulación de nitritos en el sobrenadante celular a las 24 h de tratamiento (control 2.1 $\mu\text{M}/10^6$ células; etanol 100 mM 9.34 $\mu\text{M}/10^6$ células).

4.3.2. El tratamiento agudo con etanol induce la activación y unión al ADN del factor de transcripción NF- κ B, a 30 min y 24 h en astrocitos en cultivo primario

Para investigar el mecanismo implicado en la activación de iNOS y COX-2 por el etanol, y conociendo que estos mediadores inflamatorios estaban regulados a nivel transcripcional por NF- κ B, evaluamos la posible activación de este factor de transcripción a los mismos tiempos de inducción de iNOS y COX-2, es decir, 30 min y 24 h mediante EMSA. De acuerdo con los anteriores resultados, la actividad de unión al ADN de NF- κ B incrementó en los astrocitos tratados con etanol a los 30 min y 24 h (Figura 14.A). Esta inducción se corroboró mediante análisis por inmunofluorescencia de los astrocitos tratados con etanol, también durante 30 min y 24 h, utilizando anticuerpos anti-p65 NF- κ B y el marcador astrogial GFAP (Ver Material y Métodos Sección 3.6). En células control, el marcaje de p65 se distribuyó principalmente en el citoplasma, mientras que en astrocitos tratados con etanol, tanto a 30 min como a 24 h, se encontró principalmente en el núcleo, indicativo de una activación y traslocación nuclear de NF- κ B (Figura 14.B).

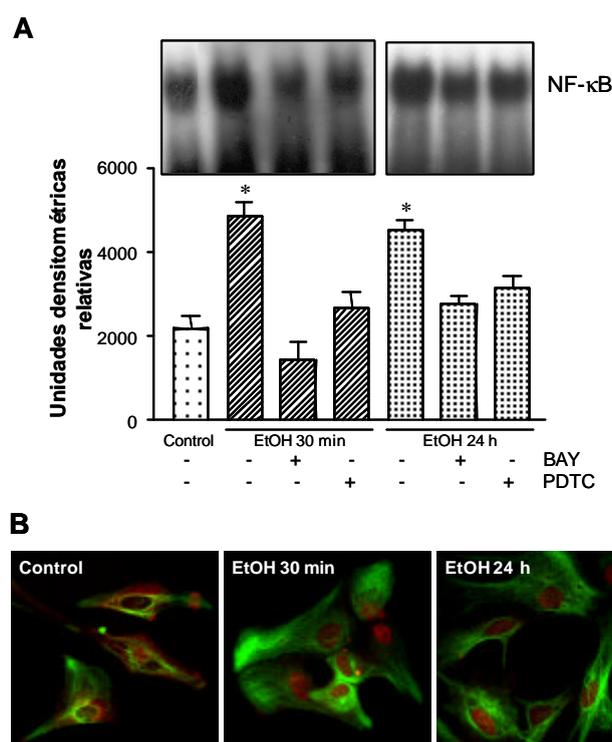
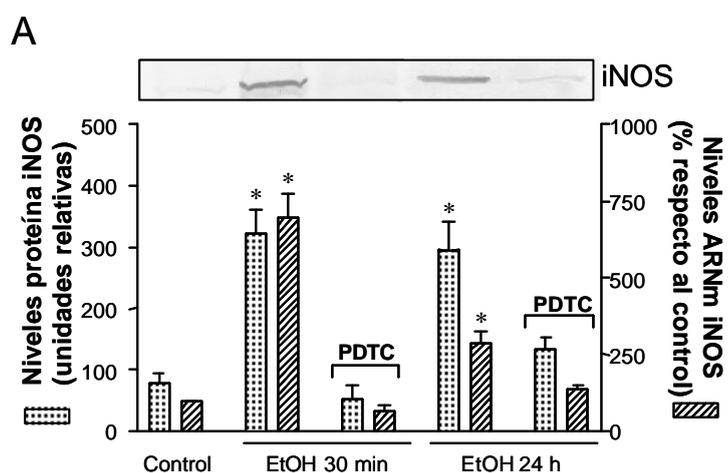


Figura 14. El tratamiento agudo con etanol induce la activación y traslocación al núcleo de NF-κB en astrocitos en cultivo. Los astrocitos se incubaron con 100 mM de etanol durante 30 min y 24 h. **(A)** La actividad de NF-κB se midió en los extractos nucleares mediante EMSA. Los valores densitométricos de las bandas de NF-κB (media ± SD) obtenidos de 3 experimentos independientes se presentan en la gráfica, además de una autorradiografía representativa. * $p < 0.01$ frente a astrocitos no tratados, en un test one-way ANOVA. **(B)** Los astrocitos se sembraron en cubres de 16 mm y se trataron con etanol (100 mM) durante 30 min y 24 h. Posteriormente, las células se incubaron con anti-p65 NF-κB (rojo) y anti-GFAP (verde), observándose una marcada localización nuclear de NF-κB tras el tratamiento con etanol (barra de calibración=10 μm).

4.3.3. La estimulación de iNOS y COX-2 inducida por el etanol está mediada por una activación de NF- κ B en astrocitos

Para confirmar que la inducción de iNOS y COX-2 causada por el etanol, estaba mediada por una activación de NF- κ B, inhibimos este factor de transcripción, pre-incubando los astrocitos con PDTC o BAY 11-7082 (Ver Material y Métodos), antes de la estimulación con etanol y medimos la expresión de iNOS y COX-2 a 30 min y 24 h de tratamiento con etanol.

Los resultados de la Figura 14.A muestran una inhibición de NF- κ B a los 30 min y 24 h de estimulación con etanol, que se correlacionan con una supresión en la estimulación de iNOS (Figura 15.A) y COX-2 (Figura 15.B), tanto a nivel de proteína como de ARNm.



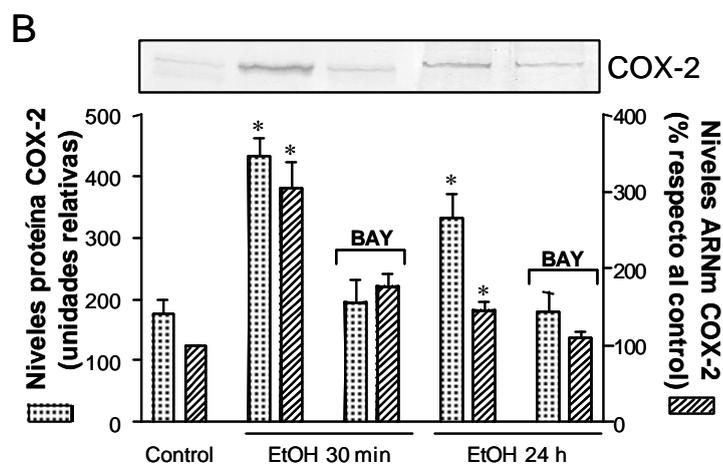


Figura 15. La activación de NF- κ B está implicada en la inducción posterior de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 por parte del etanol en astrocitos en cultivo. Los astrocitos se incubaron con 100 mM de etanol durante 30 min y 24 h. En algunos experimentos, las células se incubaron con PDTC (100 μ M) o BAY 11-7082 (5 μ M), 2 h antes y durante el tratamiento con alcohol. Los niveles de proteína y ARNm de los mediadores inflamatorios iNOS (A) y COX-2 (B) se evaluaron mediante inmunotransferencia y RT-PCR, respectivamente. Las gráficas representan las cuantificaciones densitométricas (media \pm SD) de 3 experimentos diferentes, tanto de inmunotransferencia como de RT-PCR para iNOS y COX-2. * $p < 0.02$ frente a células control en un test one-way ANOVA.

4.4. LOS RECEPTORES TLR4/IL-1RI ESTÁN IMPLICADOS EN LA INDUCCIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y MUERTE CELULAR CAUSADAS POR EL ETANOL EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.

4.4.1. El etanol induce una activación rápida de la cascada de señalización intracelular asociada a TLR4/IL-1RI en astrocitos.

Resultados experimentales de diferentes grupos han demostrado que la estimulación de los receptores TLR4 e IL-1RI por la unión de sus ligandos específicos, tales como LPS e IL-1 β respectivamente, induce una rápida respuesta, activando vías de señalización intracelular comunes, que incluyen la activación de MAP quinasas y factores de transcripción, que conllevan a un aumento en la producción de mediadores inflamatorios (IL-1 β , TNF- α , iNOS y COX-2) (Berglof et al., 2003; Marcus et al., 2003).

Por tanto, para determinar si el etanol era capaz de inducir una rápida respuesta, y activar la cascada de señalización y mediadores inflamatorios asociados a TLR4 e IL-1RI, los astrocitos se trataron con 50 mM de etanol y se analizó la fosforilación de IRAK, ERK1/2 p38 MAPK y SAPK/JNK a diferentes tiempos (0, 10, 30 min; 1, 3, 12 y 24 h). El tratamiento con etanol indujo una rápida activación de las quinasas IRAK, ERK1/2, p38 MAPK y SAPK/JNK (Figura 16). Es interesante resaltar que el máximo de fosforilación de todas estas quinasas, ocurrió a los 10 min de tratamiento con alcohol. Esta rápida respuesta coincide con la obtenida cuando los astrocitos se estimulan con LPS o IL-1 β (Ver Sección 4.5), ligandos específicos de los receptores TLR4 e IL-1RI.

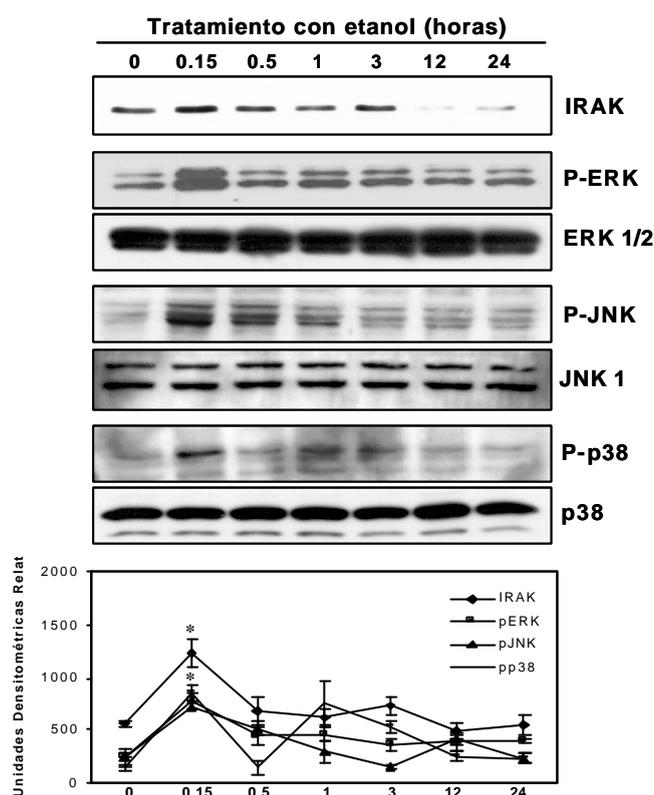


Figura 16. El tratamiento con etanol induce la fosforilación de IRAK, ERK1/2, p38 y JNK de manera tiempo-dependiente, con un máximo a 10 min, en astrocitos en cultivo. Los niveles de fosforilación de las quinasas IRAK, ERK, p38 y JNK se determinaron mediante inmunotransferencia, en astrocitos en cultivo tratados con 50 mM de etanol durante 0, 10, 30 min, 1, 3, 12 y 24 h. Posteriormente las membranas se reprobaron, y se midieron los niveles totales de ERK1/2, p38 y JNK. Los valores son media \pm SD de 7 experimentos independientes. * $p < 0.02$ para todas las quinasas frente a la muestra control, en un test one-way ANOVA.

Posteriormente, quisimos analizar si otras concentraciones de etanol o incluso, otros tipos de alcoholes podían activar también la cascada de señalización IRAK/MAPK. Para ello, se incubaron los astrocitos durante 10 min a diferentes concentraciones de etanol (2, 8, 10, 20, 40, 50, 100 y 200 mM), y se analizó la fosforilación de IRAK y ERK1/2 mediante inmunotransferencia. Sorprendentemente, el etanol a bajas concentraciones (10 mM) causa una activación similar de IRAK y P-ERK, a la provocada por 50 mM (Figura 17.A).

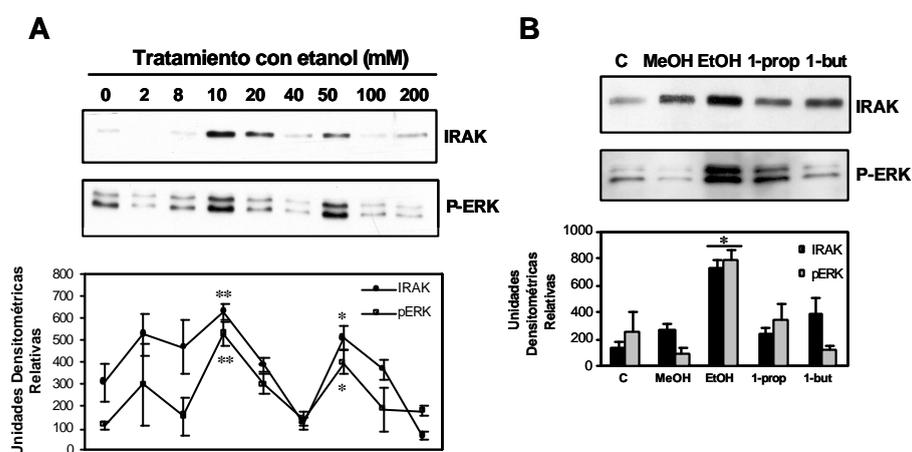


Figura 17. El tratamiento con etanol, en comparación con otros alcoholes de cadena corta y lineal, es el único que induce la señalización de IRAK / ERK en astrocitos en cultivo. **(A)** Los astrocitos se incubaron con diferentes concentraciones de etanol (2, 8, 10, 20, 40, 50, 100 y 200 mM) durante 10 min. Los niveles de fosforilación de las quinasas IRAK y ERK1/2 se determinaron mediante inmunotransferencia. Los valores son media \pm SD de 8 experimentos independientes. ** $p < 0.002$, * $p < 0.01$ (IRAK y P-ERK frente a la muestra control en un test one-way ANOVA). **(B)** Las células se trataron con 10 mM de metanol, etanol, 1-propanol y 1-butanol durante 10 min. Los niveles de IRAK y P-ERK se ensayaron mediante inmunotransferencia. Los valores son media \pm SD de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ frente a células control.

También examinamos el efecto de diferentes alcoholes de cadena lineal y corta a la concentración de 10 mM, en la estimulación de la vía IRAK/ERK. Observamos que, aunque a una concentración de 10 mM, el metanol, propanol o butanol inducen un ligero aumento en la actividad de IRAK, el etanol causa un mayor efecto sobre la fosforilación de ambas quinasas, IRAK y P-ERK (Figura 17.B). Estos resultados indican que aunque otros alcoholes son capaces de inducir una pequeña activación en la fosforilación de IRAK, el efecto del etanol es mucho más efectivo en la estimulación de la cascada de señalización IRAK/ERK.

No se observaron cambios significativos de los niveles totales de ERK1/2, p38 y JNK (Figura 16).

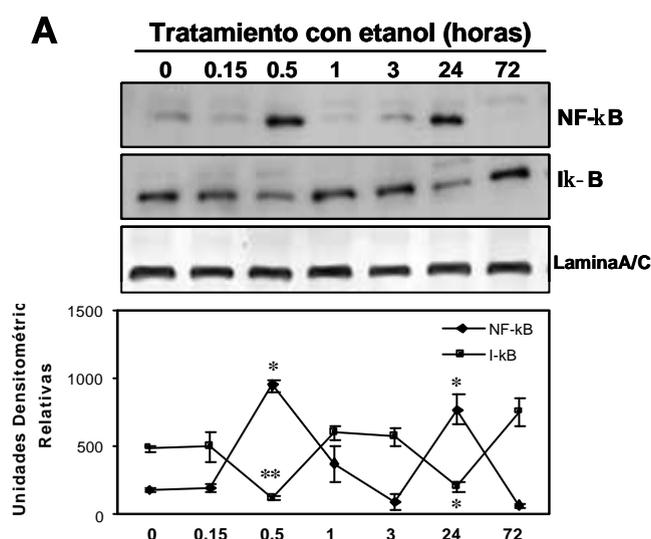
4.4.2. El tratamiento agudo de etanol incrementa los niveles de NF- κ B, y causa muerte celular por apoptosis en astrocitos

Como se ha mencionado anteriormente, la estimulación de los receptores TLR4 e IL-1RI, conlleva a la activación de MAPK y NF- κ B, así como a la producción de mediadores inflamatorios, tales como COX-2 e iNOS (Berglof et al., 2003; Marcus et al., 2003).

Por ello, nuestro próximo objetivo fue valorar si la activación de la vía IRAK/MAPK inducida por el etanol, podía conducir a la estimulación de NF- κ B, y a un aumento en la expresión de iNOS y COX-2. Los experimentos realizados, tanto a 100mM como a 50 mM de etanol, indicaron que la máxima activación de NF- κ B se produce a los 30 min de tratamiento, induciéndose también de forma tardía a las 24 h, lo cual correspondía con la degradación de κ B- α en el citoplasma a los mismos tiempos de tratamiento (Figura

18.A). Referente a la expresión de iNOS y COX-2, aunque se detectó a los 10 min de tratamiento con etanol, el nivel máximo de estas dos proteínas se observó a 30 min y 24 h (Ver Figura 13). No se observaron cambios en los niveles de laminaA/C (proteína de la membrana nuclear y marcadora de núcleos) como control de carga.

Por otra parte, para determinar si la activación de la respuesta de señalización de TLR4/IL-1RI estaba asociada con daño celular, se analizó la posible muerte celular por apoptosis, utilizando el kit Cell death detection ELISA (Ver Sección 3.9), a diferentes tiempos del tratamiento con etanol. Se observó un incremento significativo en la apoptosis a las 3 y 24 h de tratamiento con etanol (Figura 18.B).



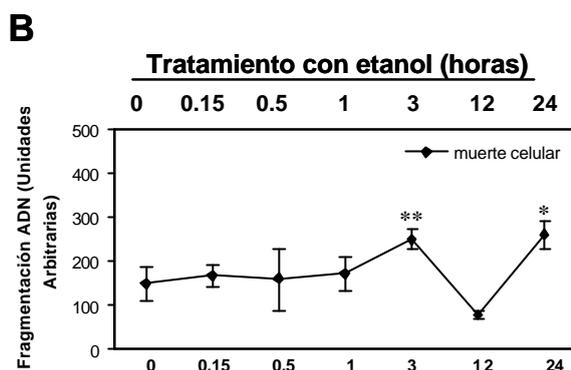


Figura 18. La exposición aguda de etanol induce un incremento en la expresión de NF- κ B y en la muerte por apoptosis, de manera tiempo-dependiente en astrocitos en cultivo. **(A)** Los astrocitos en cultivo tratados con 50 mM de etanol durante 0, 10, 30 min, 1, 3, 24 y 72 h, se sometieron a un fraccionamiento subcelular (ver Material y Métodos, Sección 3.4.3) para su análisis por inmunotransferencia. Las fracciones nucleares y citoplásmicas se ensayaron con anti-p65-NF- κ B y anti-I κ B- α , respectivamente. Las membranas se reprobaron para determinar los niveles de Lamina A/C. Los valores son media \pm SD de 3 experimentos independientes. ** $p < 0.001$, * $p < 0.04$ frente a la muestra control en un test one-way ANOVA. **(B)** Los niveles de fragmentación de ADN se evaluaron mediante el kit Cell death detection ELISA en lisados obtenidos de astrocitos tratados o no con etanol, durante los tiempos anteriormente indicados. Los valores son media \pm SD de 4 experimentos independientes. ** $p < 0.01$, * $p < 0.04$ frente a astrocitos control, en un test one-way ANOVA.

Estos resultados sugieren que el etanol a 50 mM, induce una rápida estimulación (10 min) de ciertas quinasas, desencadenando la activación (a los 30 min) de genes de respuesta rápida implicados en la inflamación, y estos eventos pueden subyacer al daño y muerte de los astrocitos que se observa a las 3 y 24 h de tratamiento con etanol.

Sin embargo, una pregunta que nos planteamos fue, si bajas concentraciones de etanol, que también activan las quinasas IRAK y ERK1/2, pueden causar muerte celular por apoptosis. Nuestros resultados demuestran que concentraciones de 10 mM de etanol no dan lugar a muerte del astrocito, en ninguno de los tiempos analizados (0.15, 0.5, 1, 3, 12 y 24 h) (datos no mostrados).

Para analizar con mayor profundidad estos efectos del etanol, determinamos los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β , y la citoquina anti-inflamatoria IL-10, en el sobrenadante de las células expuestas a 10 y 50 mM, a los diferentes tiempos de exposición. De acuerdo con nuestros anteriores resultados, los niveles de IL-1 β incrementaron a los 30 min (80 ± 2.5 pg/ml en situación control vs. 344.2 ± 31 pg/ml tras el tratamiento), 3 h (vs. 129.2 ± 15.3 pg/ml etanol), y 24 h (vs. 280 ± 12.5 pg/ml etanol) de exposición a 50 mM de etanol. Cuando las células se trataron con etanol a 10 mM, el aumento en los niveles de IL-1 β , se observó a los 30 min (80 ± 2.5 pg/ml en situación control vs. 133 ± 21 pg/ml etanol), 12 h (vs. 214.2 ± 5.6 pg/ml etanol) y 24 h ($295,8 \pm 21$ pg/ml etanol) de exposición. Sin embargo, los resultados más llamativos fueron con la IL-10, ya que sólo detectamos esta citoquina anti-inflamatoria en el medio de astrocitos expuestos a 10 mM de etanol, pero no en el medio de las células expuestas a 50 mM. Específicamente, se detectaron incrementos de IL-10 a los tiempos de 1 h (2.5 ± 0.2 pg/ml en situación control vs. 32 pg/ml etanol), 12 h (vs. 89 ± 9.5 pg/ml etanol) y 24 h (vs. 25 ± 3.1 pg/ml etanol) de exposición a 10 mM de etanol.

Estos resultados demuestran que el etanol es capaz de activar la cascada de señalización de los receptores TLR4 e IL-1RI, que puede dar

lugar a un aumento en los mediadores y citoquinas pro-inflamatorias que pueden conllevar a daño celular. Sin embargo, bajas dosis de etanol puede inducir, además, una liberación de citoquinas anti-inflamatorias que podrían proteger contra los anteriores efectos inflamatorios.

4.4.3. El bloqueo de los receptores TLR4 e IL-1RI previene la activación de MAP quinasas, mediadores inflamatorios y muerte celular inducida por el etanol en astrocitos en cultivo.

Los resultados anteriores apoyan la idea de que el etanol induce las mismas cascadas de señalización intracelular, que cuando las células se estimulan con LPS o IL-1 β , sugiriendo una posible activación de los receptores TLR4 e IL-1RI por parte del etanol. Para estudiar esta posibilidad de forma más directa, los astrocitos se pre-incubaron durante 30 min con anticuerpos bloqueantes de los receptores TLR4 e IL-1RI, antes y durante el tratamiento con 50 mM de etanol, y se analizó la estimulación de las quinasas y el aumento de los mediadores inflamatorios.

Tanto la activación de IRAK/MAPKs, iNOS y COX-2, así como la muerte celular por apoptosis se analizaron a los diferentes tiempos de inducción máxima. El bloqueo de TLR4 e IL-1RI inhibió completamente la activación a 10 min de IRAK/MAPKs (Figura 19), así como el incremento en la expresión de iNOS y COX-2 a 30 min (Figura 20.A), y la muerte celular por apoptosis a las 3h (Figura 20.B) de estimulación con etanol.

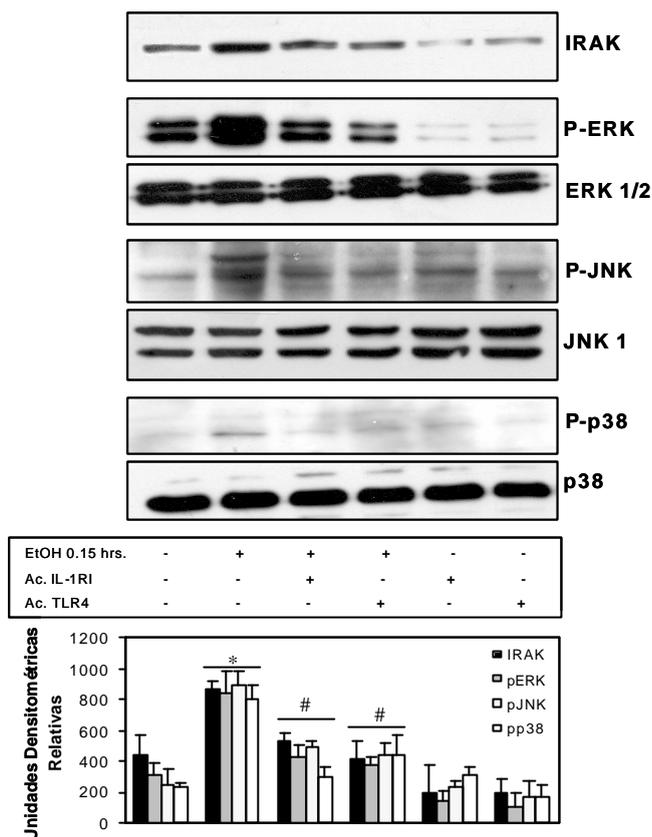


Figura 19. La inducción de IRAK, P-ERK, P-p38 y P-JNK por el tratamiento agudo de etanol es inhibida por el bloqueo de los receptores IL-1RI y TLR4 en astrocitos en cultivo. Los niveles de fosforilación de las quinasas IRAK, ERK, p38 y JNK se determinaron mediante inmunotransferencia, en astrocitos en cultivo tratados con 50 mM de etanol durante 10 min. En algunos experimentos, las células se pre-incubaron con los anticuerpos bloqueantes anti-IL-1RI (10 μ g/ml) o anti-TLR4 (10 μ g/ml) 30 min antes y durante el tratamiento con etanol. Posteriormente las membranas se reprobaron, y se midieron los niveles totales de ERK1/2, p38 y JNK. Los valores son media \pm SD de 8 experimentos independientes. * $p < 0.04$ frente a la muestra control; # $p < 0.05$ (frente a astrocitos tratados con etanol), en un test one-way ANOVA.

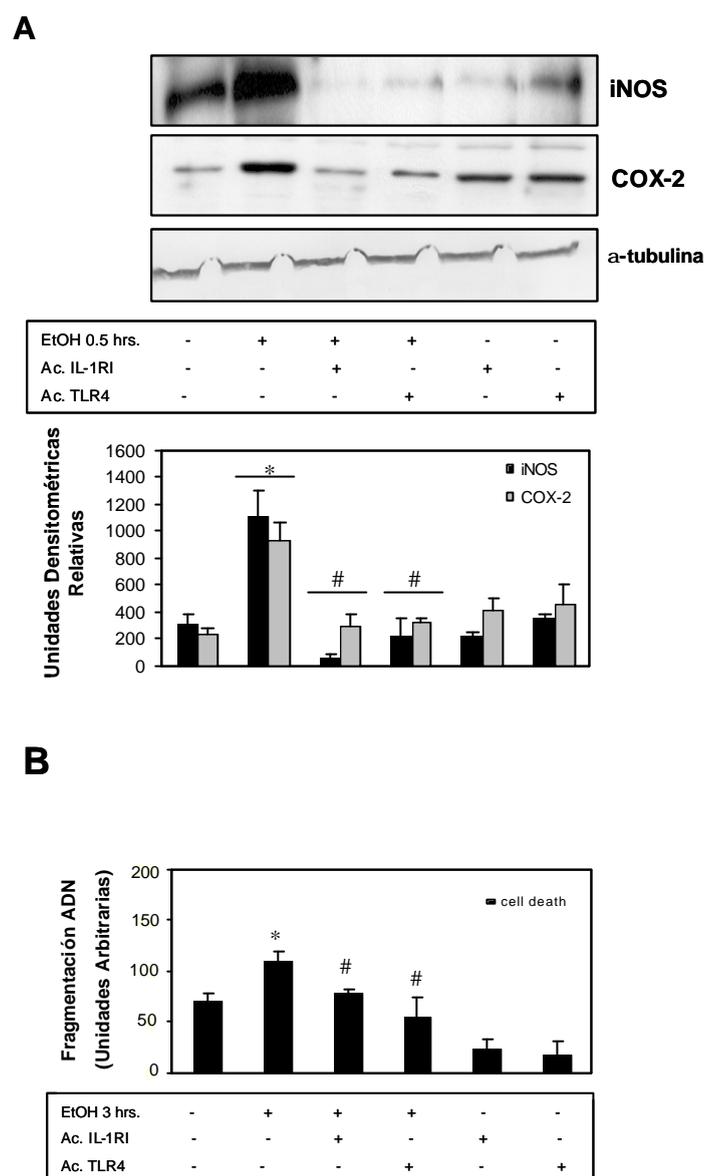


Figura 20. El bloqueo de los receptores IL-1RI y TLR4 inhibe el incremento en la expresión de iNOS y COX-2, y previene la muerte por apoptosis inducidos por la exposición aguda de etanol en astrocitos. (A) Los astrocitos en cultivo se trataron con 50 mM de etanol durante 30 min. En algunos experimentos, las células se pre-incubaron con los

anticuerpos bloqueantes anti-IL-1RI (10 $\mu\text{g/ml}$) o anti-TLR4 (10 $\mu\text{g/ml}$) 30 min antes y durante el tratamiento con etanol. Los extractos celulares se analizaron para iNOS y COX-2 mediante inmunotransferencia. Las membranas se reprobaron para determinar los niveles de α -tubulina, mostrando una carga proteica similar. Los valores son media \pm SD de 7 experimentos independientes. * $p < 0.04$ frente a la muestra control; # $p < 0.01$ frente a células tratadas con etanol, en un test two-way ANOVA. **(B)** Los niveles de fragmentación de ADN se evaluaron mediante el kit Cell death detection ELISA en lisados obtenidos de astrocitos tratados con etanol durante 3 h, pre-incubados o no con los anticuerpos anti-IL-1RI y anti-TLR4. Los valores son media \pm SD de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$ frente a astrocitos control, # $p < 0.03$ frente a células tratadas con etanol, en un test one-way ANOVA.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el aumento de mediadores inflamatorios y muerte celular inducidos por el etanol está mediado por una activación de los receptores TLR4 e IL-1RI, y que el etanol actúa directa o indirectamente sobre estos receptores.

Otras de las aproximaciones que estamos realizando, es el bloqueo en la función de los receptores TLR4 e IL-1RI, mediante el uso de ARNs silenciadores (ARNsi). El problema al que nos enfrentamos es la dificultad de transfección que tienen los astrocitos. Resultados preliminares indican que en astrocitos transfectados, en donde la expresión génica de IL-1RI está disminuída (ya que la eficiencia de transfección, y por tanto de silenciamiento, es muy baja), la activación de IRAK y P-ERK es mucho menor que en las células no transfectadas, tras un tratamiento con etanol a 10 mM durante 10 y 30 min (Figura 21). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el etanol puede causar una respuesta inflamatoria, a través de la activación de TLR4 e IL-1RI.

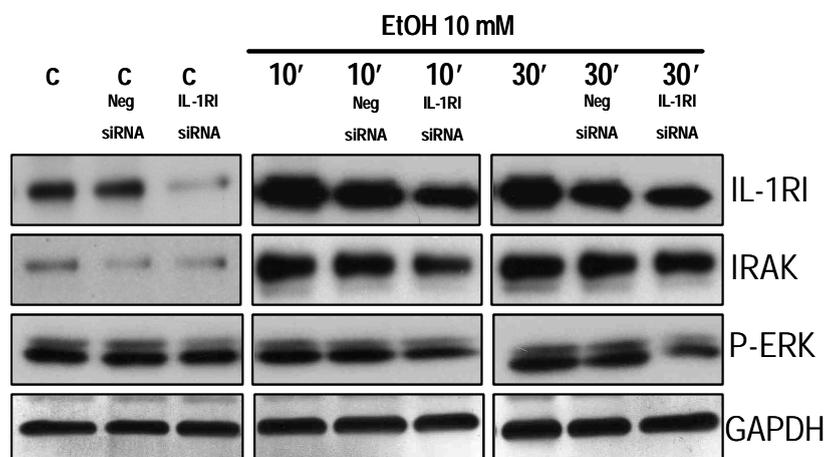


Figura 21. La disminución en la expresión génica de IL-1RI mediante ARN silenciador, provoca un descenso en la inducción de IRAK y P-ERK tras el tratamiento de etanol a 10 mM en astrocitos en cultivo. Tras 11 días de cultivo, astrocitos sembrados a 40000 cél / 30 mm² fueron transfectados mediante siPORT NeoFX (Ambion, Inc.) con ARNsi IL-1RI de rata (sense: CCGACAAAUGCACGGAGUAtt, antisense: UACUCCGUGCAUUUGUCGGtc) o con Silencer Negative control #1 siRNA (Ambion, Inc.), ambos a 30 nM, durante 72h. Transcurrido este tiempo, los astrocitos se trataron con etanol 10 mM durante 10 y 30 min. Las células se lisaron y se analizaron por inmunotransferencia, usando anticuerpos anti-IL-1RI, -IRAK, -P-ERK y -GAPDH.

4.4.4. Los anticuerpos bloqueantes anti-TLR4 y anti-IL-1RI inhiben la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 producida por el etanol en astrocitos

Como ya hemos comentado, la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, está implicada en los procesos que conllevan a una respuesta inflamatoria (Marks-Konczalik et al., 1998; Martin and Wesche, 2002; Means et al., 2000). Nuestros resultados anteriores, demostraban que el consumo crónico de alcohol causaba una activación de ambos factores de transcripción, tanto en corteza cerebral de ratas alcohólicas, como en astrocitos tratados con etanol de forma crónica y aguda. Por tanto, nos cuestionamos si la activación de NF- κ B y AP-1 también estaba regulada por una activación de los receptores TLR4 e IL-1RI. Para contestar a esta pregunta, los astrocitos de nuevo se pre-trataron con los bloqueantes anti-TLR4 y anti-IL-1RI, antes y durante el tratamiento con 50 mM etanol 30 min, y se analizaron NF- κ B y AP-1 mediante EMSA (Ver Sección 3.5.3. Material y Métodos).

Nuestros resultados demostraron que la activación y unión al ADN de NF- κ B y AP-1 se producía a los 30 min de tratamiento con etanol, y que el bloqueo de los receptores TLR4 e IL-1RI prevenía dicha activación (Figura 22.A, y B), sugiriendo la implicación de TLR4 e IL-1RI en la activación de estos factores de transcripción.

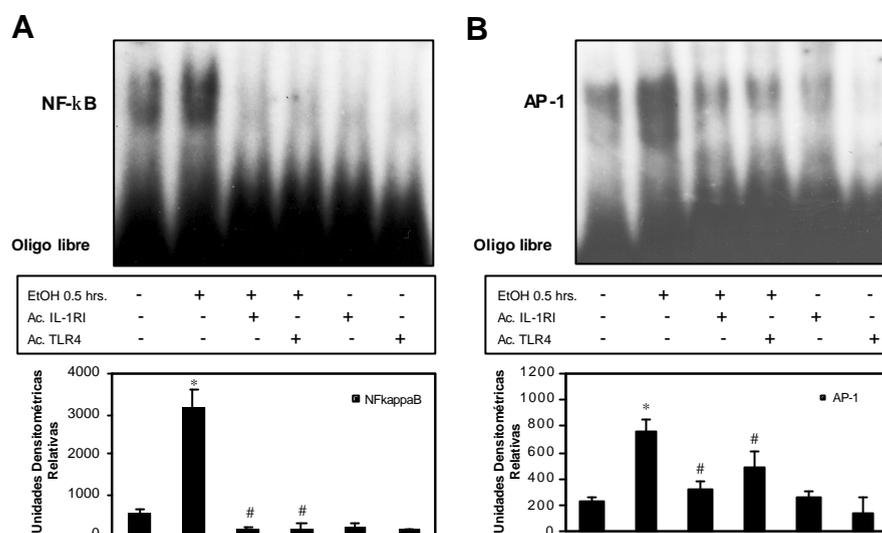


Figura 22. El tratamiento agudo de etanol activa la unión al ADN de NF-κB y AP-1 a través de los receptores IL-1RI y TLR4 en astrocitos en cultivo. La actividad de NF-κB (A) y AP-1 (B) se ensayó en extractos de proteína nuclear de astrocitos en cultivo tratados o no con 50 mM de etanol durante 30 min, mediante EMSA, usando γ -³²P-oligonucleótidos consenso de NF-κB y AP-1 (ver Material y Métodos, Sección 3.5.3). Los valores densitométricos de las bandas de NF-κB y AP-1 procedentes de 4 experimentos diferentes se muestran en la gráfica. * $p < 0.03$ frente a astrocitos no tratados; # $p < 0.02$ frente a astrocitos tratados con etanol, en un test one-way ANOVA.

4.5. EL ETANOL FACILITA EL RECLUTAMIENTO DE LOS RECEPTORES TLR4/IL-1RI EN LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA (*LIPID RAFTS*), CONLLEVANDO A UN AUMENTO EN SU RESPUESTA Y SEÑALIZACIÓN, EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

4.5.1. Uso de flotilina-1 y caveolina-1 como marcadores de *lipid rafts* en astrocitos en cultivo primario.

Numerosos trabajos de los últimos años, sugieren que los receptores TLRs, tras su estimulación, sufren un reclutamiento que tiene lugar en unos microdominios de membrana, denominados *lipid rafts* (Olsson and Sundler, 2006; Triantafilou et al., 2002; Triantafilou et al., 2004; Triantafilou and Triantafilou, 2005). Estos microdominios de membrana que, entre otras funciones, intervienen de forma activa en la transducción de señales, parecen facilitar la agregación de receptores específicos tras su estimulación (Pike, 2003; Simons and Toomre, 2000). Actualmente se han propuesto dos tipos de *lipid rafts* con respecto a la transducción de señales: 1) *lipid rafts planos*, ricos en flotilina-1, no poseen caveolina-1, y por tanto no son capaces de invaginar en caveolas para la señalización intracelular; y 2) *caveolas*, que son pequeñas invaginaciones ricas en caveolina-1 y capaces de generar vesículas caveolares en el citoplasma (Le Roy and Wrana, 2005; Rajendran and Simons, 2005).

Para estudiar con mayor profundidad la activación de los receptores TLR4 e IL-1RI por el etanol, aislamos *lipid rafts* de astrocitos control y estimulados con etanol. Los *lipid rafts* se aislaron mediante centrifugación de gradientes de sucrosa (ver Sección 3.10). Tras separar distintas fracciones se caracterizaron utilizando los marcadores caveolina-1 y flotilina-1. En

nuestras condiciones experimentales, las fracciones comprendidas entre las densidades 15-25% de sacarosa (fracciones 3-5) fueron las más enriquecidas en caveolas (caveolina-1), mientras que la flotilina-1 se distribuyó en casi todas las fracciones del gradiente (fracciones 2-8 y precipitado). Hay que considerar, que la flotilina-1 se ha encontrado en diferentes compartimentos celulares, que no son considerados *lipid rafts* (Kokubo et al., 2003; Lopez-Casas and del Mazo, 2003; Reuter et al., 2004).

La estimulación de los astrocitos con LPS (50 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) o etanol a 10 mM, no alteró de forma significativa, ni la localización ni la cantidad de flotilina-1, en ninguno de los tiempos de inducción ensayados (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min). Sin embargo, tras la estimulación, se observó un aumento en la cantidad de caveolina-1 en las fracciones 3-5, sugiriendo que las caveolas sufren cierta agregación, tras la activación de los receptores TLR4 o IL-1RI (Figura 23, 24, 25). Al mismo tiempo, cuando las células se trataron con etanol 50 mM, observamos alteraciones tanto en la localización como en la cantidad de flotilina-1 y de caveolina-1 en las diferentes fracciones ensayadas (Figura 26). Este efecto podría ser debido a que concentraciones relativamente altas de etanol, como es el caso de 50 mM, podrían estar desestabilizando la estructura de estos microdominios de membrana, ya que se ha demostrado que altas concentraciones de etanol (> 100 mM) pueden disgregar y perturbar la estructura de los *lipid rafts* (Dai et al., 2005).

4.5.2. El etanol induce el reclutamiento y traslocación de los receptores TLR4 e IL-1RI en los *lipid rafts* en astrocitos en cultivo.

A continuación, intentamos dilucidar el posible papel de los *lipid rafts* en los efectos del etanol sobre los receptores TLR4 e IL-1RI y su señalización, ya que algunos trabajos recientes sugerían que el etanol podía influir en los procesos iniciales de la señalización de los receptores TLRs, afectando su agregación y reclutamiento en los *lipid rafts* (Dai et al., 2005; Dolganiuc et al., 2006).

Para este objetivo, tras el aislamiento de *lipid rafts* procedentes de astrocitos tratados con LPS (50 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml), etanol 10 mM o 50 mM, a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min), se determinaron los diferentes niveles de TLR4 e IL-1RI mediante inmunotransferencia, en las fracciones del gradiente.

Los resultados mostrados en las Figuras 23, 25 y 27, revelan que la estimulación tanto con LPS, como con etanol 10 mM, conlleva a un rápido desplazamiento (5 min) de los receptores TLR4, desde las fracciones ricas en flotilina-1, a las enriquecidas en caveolina-1. Este desplazamiento de TLR4 se observa también a los 10 min de LPS (15 min con etanol 10 mM) y especialmente a los 30 min tras la estimulación. Estos resultados sugieren que la estimulación de los receptores TLR4, causa la translocación del mismo a los *lipid rafts* capaces de formar caveolas y desencadenar la señalización de este receptor.

Por otra parte, la estimulación de los astrocitos con IL-1 β o con etanol 10 mM también produjo una traslocación de IL-1RI a los *lipid rafts* ricos en caveolina-1 (Figuras 24, 25 y 28), sugiriendo que el etanol a la

concentración 10 mM, induce una agregación y reclutamiento de TLR4 e IL-1RI en los *lipid rafts* similar a sus ligandos específicos.

En el caso del tratamiento con etanol 50 mM se observó una disminución en la traslocación de TLR4 e IL-1RI en los *lipid rafts caveolae* (Figura 26), tal y como se esperaba tras la desestructuración de flotilina y caveolina-1 vista anteriormente (Sección 4.5.1). De hecho, altas concentraciones de etanol (> 100 mM) suprimen el reclutamiento de TLR4 en los *lipid rafts* y su señalización (Dai et al., 2005).

4.5.3. Tanto el tratamiento con LPS, como con etanol, induce una señalización del receptor TLR4 independiente de MyD88 en astrocitos en cultivo primario.

Una de las proteínas adaptadoras para la consecución de la señalización de los receptores TLRs es MyD88 (ver Introducción). Tanto LPS como IL-1 β , al unirse a sus receptores TLR4 e IL-1RI, respectivamente, inducen dos vías diferentes: 1) la vía dependiente de MyD88, que conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias con una rápida activación de NF- κ B y MAPK; y 2) la vía independiente de MyD88, asociada con una inducción de genes relacionados a IFN, como la proteína TRIF, que desencadena una activación de NF- κ B y MAPK más tardía (Gohda et al., 2004; Takeda and Akira, 2004; Wesche et al., 1997). Tras el fraccionamiento obtenido en el aislamiento de *lipid rafts*, observamos que, tanto el tratamiento con LPS como con etanol (10 y 50 mM) durante 5 y 30 min, incrementaron la expresión de MyD88 en la fracción del precipitado (ptd., fracción de membranas y restos celulares), pero en ningún caso se traslocaba a los *lipid rafts* (Figura 23, 25, 26). En cambio, el tratamiento con IL-1 β , tanto a 5 como

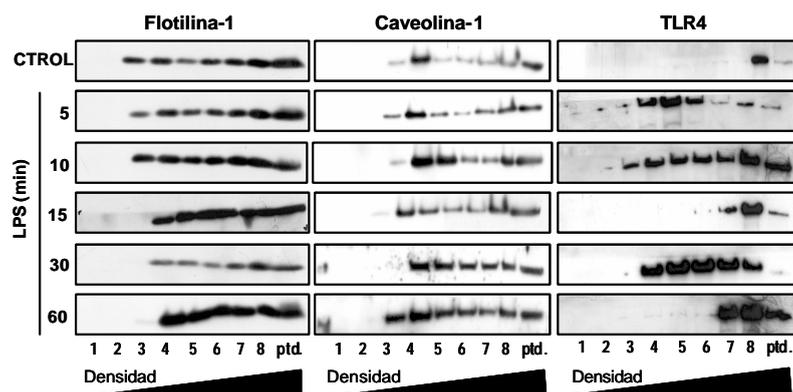
a 30 min, provocó un reclutamiento de MyD88 a las fracciones menos densas y ricas en caveolina-1 (Figura 24). Por tanto, aunque el tratamiento con LPS o etanol no induce una traslocación de MyD88 a los *lipid rafts*, si que se observó un aumento de MyD88 en las fracciones de membrana (precipitado), sugiriendo que MyD88 está implicada en la señalización de LPS o etanol, pero que en ese caso, otras proteínas adaptadoras podrían estar jugando un papel más significativo que MyD88. Los resultados también sugieren que la señalización inducida por IL-1 β sería en gran parte ejecutada, por la vía MyD88 dependiente, y por tanto el efecto del etanol se asemeja más al tratamiento con LPS, en cuanto al desencadenamiento de una señalización intracelular se refiere.

4.5.4. El etanol induce el reclutamiento y activación de las quinasas IRAK y P-ERK en los *lipid rafts* en astrocitos en cultivo

Actualmente se están realizando numerosas investigaciones para esclarecer la implicación de los *lipid rafts* en la señalización celular, ya que estos microdominios podrían proporcionar eficientemente una distribución espacial de los componentes de la transducción en la membrana plasmática y lograr una eficaz iniciación y prolongación de la señalización (Dykstra et al., 2003). Esto puede ser debido a dos razones: 1) que en los microdominios se concentran diversas proteínas adaptadoras esenciales para la propagación fluída de la activación de la cascada de señalización ó, 2) por la capacidad de agregación de estos microdominios y de moverse lateralmente en la membrana (Alonso and Millan, 2001; Matko and Szollosi, 2002).

Por tanto, quisimos estudiar si la cascada de señalización asociada a TLR4 e IL-1RI se iniciaba gracias al reclutamiento de IRAK y P-ERK en los *lipid rafts*.

Nuestros resultados demuestran que tras la estimulación de los astrocitos con LPS, IL-1 β , como con etanol a 10 y 50 mM, durante 5, 10 (15 min con respecto a la estimulación con etanol) y 30 min, se genera una activación y traslocación de IRAK y P-ERK a las fracciones ricas en caveolina-1 (*lipid rafts caveolae*) (Figura 23-28). Estos resultados sugieren que los *lipid rafts*, además de estar implicados en la iniciación de la activación de los receptores TLR4 e IL-1RI, también juegan un papel esencial en la posterior consecución de la señal intracelular inducida por el etanol.



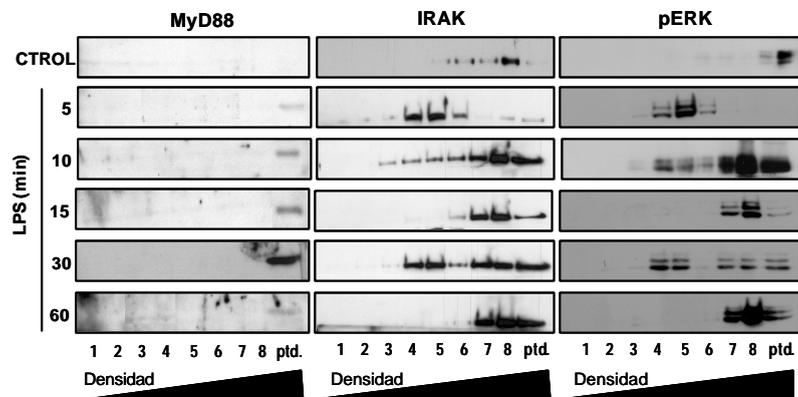


Figura 23. El tratamiento con LPS induce el reclutamiento de TLR4, IRAK y P-ERK en los *lipid rafts caveolae*. Los astrocitos fueron estimulados con LPS (50 ng/ml) durante 5, 10, 15, 30 min y 1 h, y posteriormente se aislaron *lipid rafts* mediante centrifugación de gradientes de sucrosa (Sección 3.10). Alícuotas exactas de cada fracción (80 μ l) se cargaron en geles de 8-12% acrilamida, y se determinaron los niveles de flotilina-1, caveolina-1, TLR4, MyD88, IRAK y P-ERK mediante inmunotransferencia. La flotilina-1 aparece enriquecida en las fracciones 2-ptd., mientras que la caveolina-1 se encuentra en las fracciones 3-5. En la figura se muestra una membrana representativa de cada uno de los experimentos realizados (n=4).

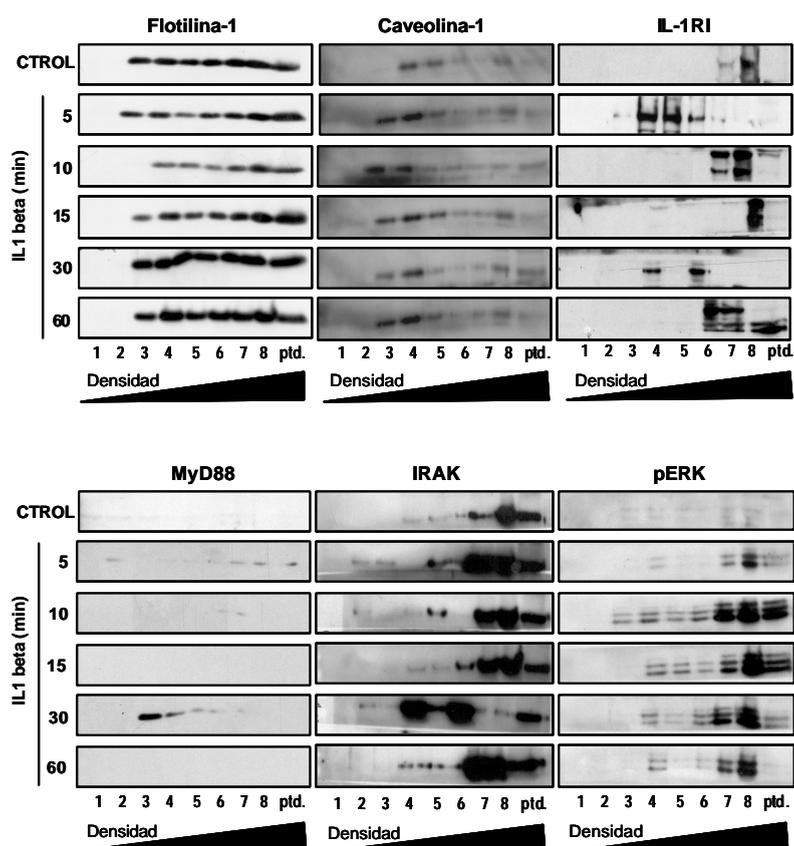


Figura 24. El tratamiento con IL-1 β induce la traslocación de IL-1RI, MyD88, IRAK y P-ERK hacia fracciones ricas en caveolas. Los astrocitos fueron estimulados con IL-1 β (10 ng/ml) durante 5, 10, 15, 30 min y 1 h, y posteriormente se aislaron *lipid rafts* mediante centrifugación de gradientes de sucrosa. Alícuotas exactas de cada fracción (80 μ l) se cargaron en geles de 812% acrilamida, y se determinaron los niveles de flotilina-1, caveolina-1, IL-1RI, MyD88, IRAK y P-ERK mediante inmunotransferencia. En la figura se muestra una membrana representativa de cada uno de los experimentos realizados (n=3).

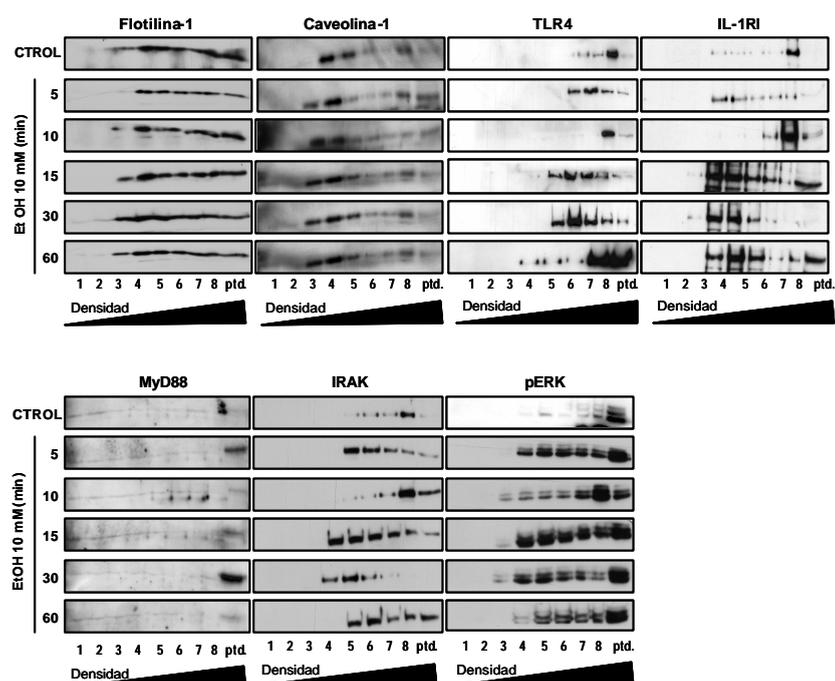


Figura 25. El tratamiento con etanol a una concentración de 10 mM induce la traslocación de TLR4, IL-1RI, IRAK y P-ERK hacia fracciones ricas en caveolas. Los astrocitos fueron estimulados con etanol (10 mM) durante 5, 10, 15, 30 min y 1 h, y posteriormente se aislaron *lipid rafts* mediante centrifugación de gradientes de sucrosa. Alícuotas exactas de cada fracción (80 μ l) se cargaron en geles de 8-12% acrilamida, y se determinaron los niveles de flotilina-1, caveolina-1, TLR4, IL-1RI, MyD88, IRAK y P-ERK mediante inmunotransferencia. En la figura se muestra una membrana representativa de cada uno de los experimentos realizados (n=4).

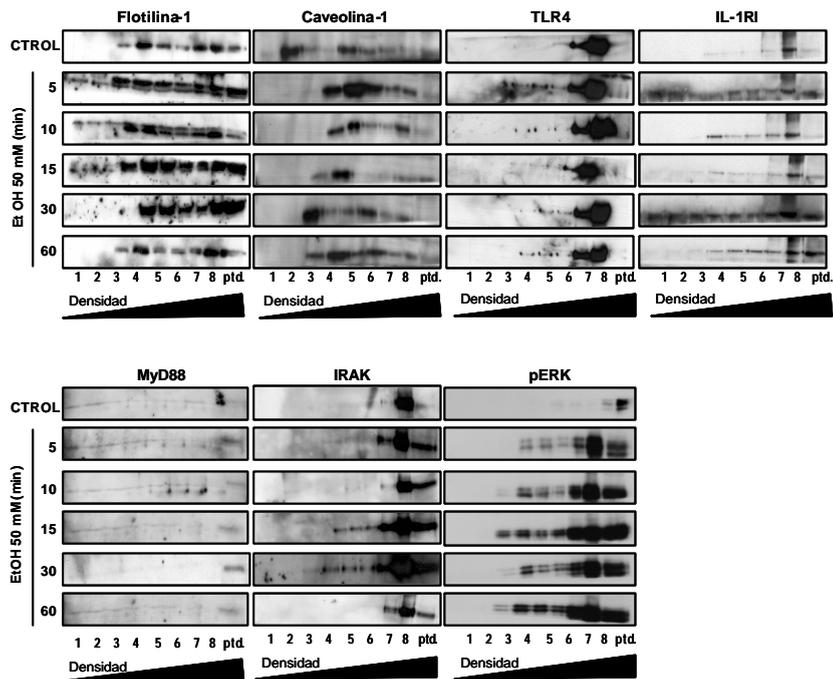


Figura 26. El tratamiento con etanol a una concentración de 50 mM desestructura los *lipid rafts* y provoca una disminución en la traslocación de TLR4, IL-1RI, IRAK y P-ERK hacia estos microdominios. Los astrocitos fueron estimulados con etanol (50 mM) durante 5, 10, 15, 30 min y 1 h, y posteriormente se aislaron *lipid rafts* mediante centrifugación de gradientes de sucrosa. Alícuotas exactas de cada fracción (80 μ l) se cargaron en geles de 8-12% acrilamida, y se determinaron los niveles de flotilina-1, caveolina-1, TLR4, IL-1RI, MyD88, IRAK y P-ERK mediante inmunotransferencia. En la figura se muestra una membrana representativa de cada uno de los experimentos realizados (n=4).

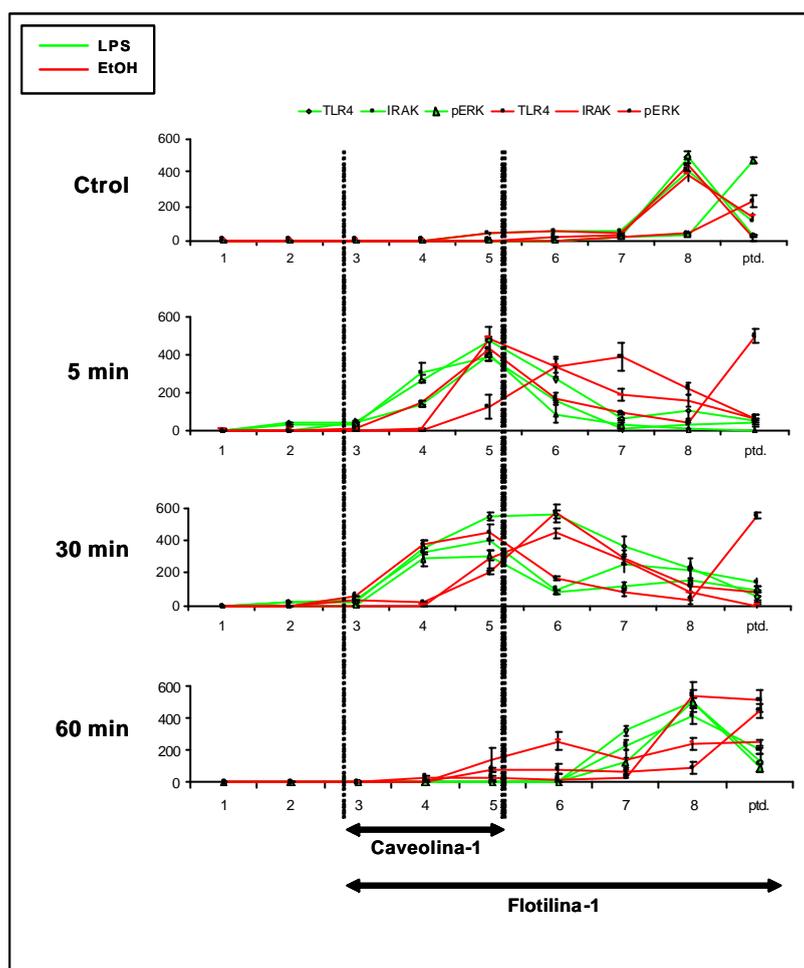


Figura 27. Tanto el tratamiento con LPS como con etanol 10 mM induce un movimiento hacia fracciones ricas en caveolina-1 de TLR4, IRAK y P-ERK. Las gráficas muestran las diferentes cuantificaciones densitométricas procedentes de las figuras 23 y 25, a los tiempos con diferencias significativas en cuanto al desplazamiento de TLR4, IRAK y P-ERK a las regiones ricas en caveolina-1 se refiere. Tanto TLR4, IRAK y PERK se encuentran desplazados a los 5 y 30 min de tratamiento con LPS y etanol, restaurándose casi en su totalidad tras 1 hora de tratamiento (n=4).

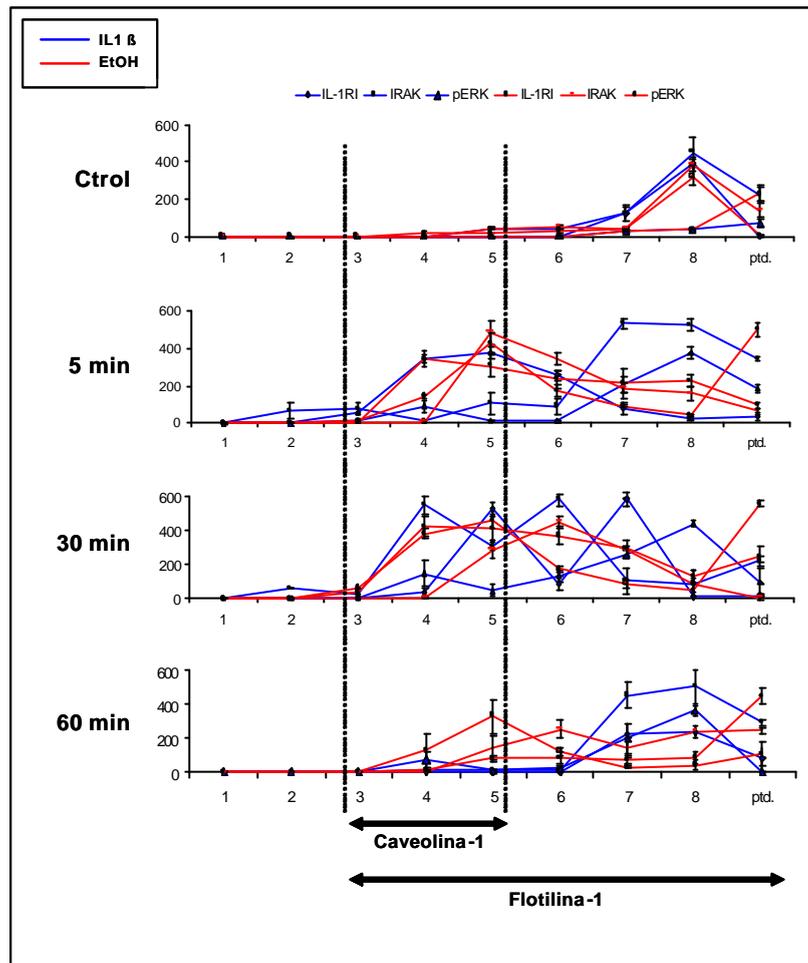


Figura 28. Tanto el tratamiento con IL-1 β como con etanol 10 mM induce un movimiento hacia fracciones ricas en caveolina-1 de IL-1RI, IRAK y P-ERK. Las gráficas muestran las diferentes cuantificaciones densitométricas procedentes de las figuras 24 y 25, a los tiempos donde se aprecian diferencias significativas obvias en cuanto al desplazamiento de IL-1RI, IRAK y P-ERK a las regiones ricas en caveolina-1 se refiere. Tanto IL-1RI, IRAK y P-ERK se encuentran desplazados a los 5 y 30 min de tratamiento con IL-1 β y etanol, restaurándose casi en su totalidad tras 1 hora de tratamiento (n=3).

4.6. EL ETANOL INDUCE LA INTERNALIZACIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR IL-1RI A TRAVÉS DE LA FUSIÓN DE VESÍCULAS CAVEOLARES Y CAVEOSOMAS, A LA MEMBRANA DE ENDOSOMAS DE GRAN TAMAÑO DEPENDIENTES DE CLATRINA.

Hemos demostrado que el etanol es capaz de activar la cascada de señalización intracelular, tanto de TLR4 como de IL-1RI, a través de su interacción con los microdominios de membrana *lipid rafts*. Pero nos preguntábamos si el mecanismo de tráfico intracelular de esta señal inflamatoria, es decir internalización, clasificación en endosomas y posterior degradación en lisosomas de IL-1RI, tal y como ocurre tras la unión de la citoquina IL-1 β (Brissoni et al., 2006), se producía también, tras el tratamiento con etanol.

Para resolver este objetivo, se realizaron análisis por microscopía confocal (Leica TCS-AOBS-SP2) de inmunofluorescencias obtenidas de astrocitos sembrados en cubres de 16 mm, y tratados con etanol (10 y 50 mM) o IL-1 β (10 ng/ml) durante 5, 10 y 30 min, teñidos con la subunidad B de la toxina colérica (CT-B) conjugada a Alexa Fluor 488 (verde) y anti-IL-1RI, seguido de anti-rabbit conjugado con rodamina (rojo) (ver Material y métodos, Sección 3.6), en ausencia total de Tritón X-100.

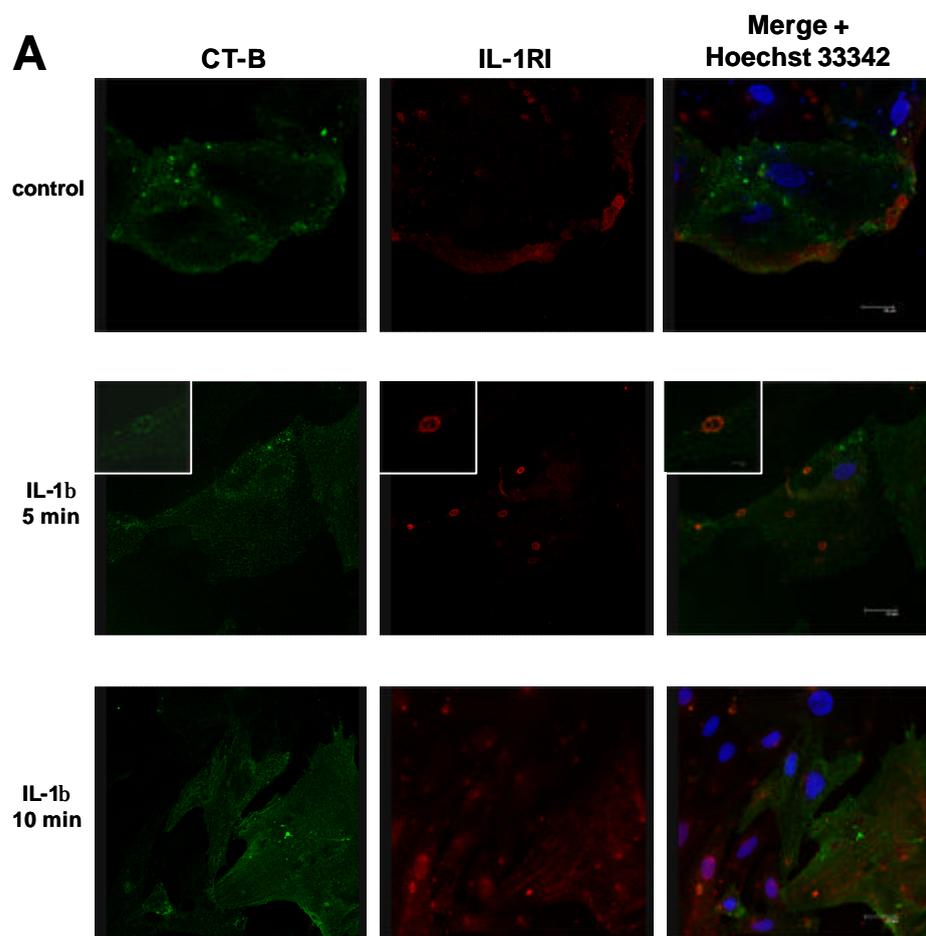
La toxina colérica se ha usado desde siempre, como marcador de la endocitosis caveolar, ya que la subunidad B de esta toxina se une al GM₁ gangliósido que está enriquecido en la membrana de las caveolas (Schnitzer et al., 1996; Tran et al., 1987) y además también se ha encontrado en los endosomas positivos a la tinción EEA1 (marcador de endosomas tempranos) (Parton and Richards, 2003).

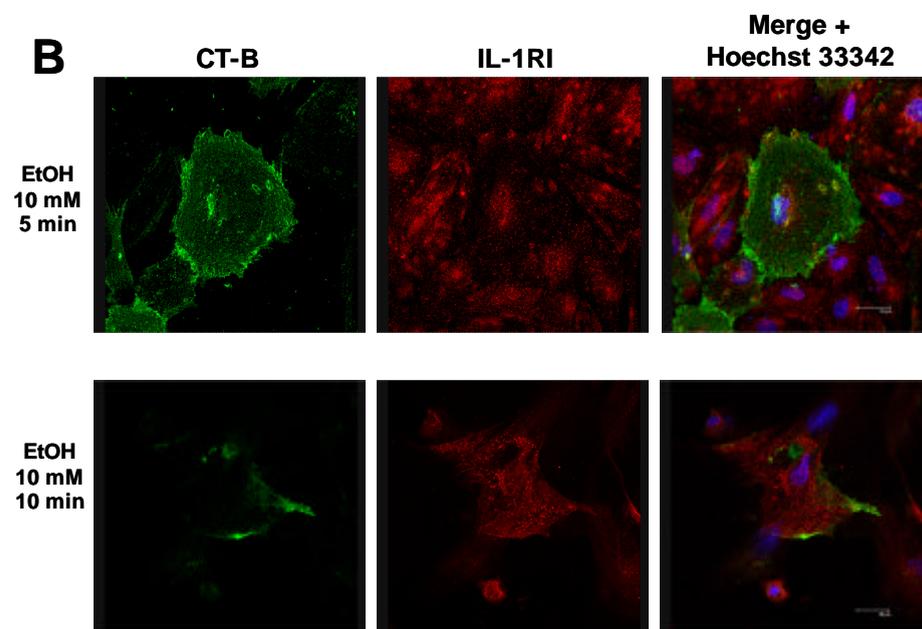
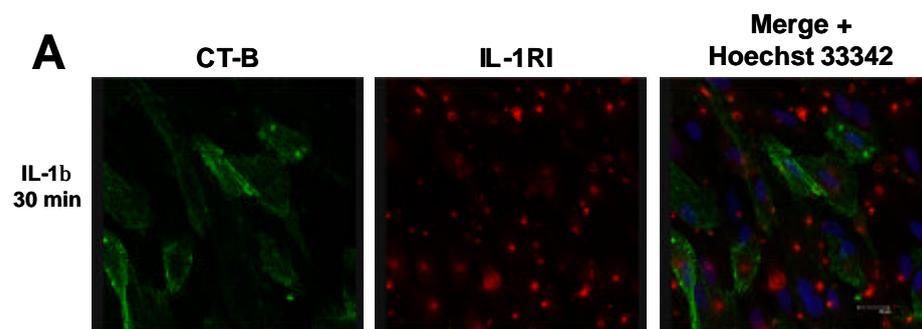
Nuestros resultados demuestran una distribución de CT-B e IL-1RI en membrana plasmática y localizada también en citoplasma y zona perinuclear en la situación no estimulada. Pero, curiosamente, tanto el tratamiento a 5 como a 30 min de IL-1 β o etanol (10 mM), produce una redistribución de CT-B e IL-1RI desde la membrana plasmática y citosol, a estructuras definidas en forma de anillo de gran tamaño en el citoplasma (6-8 μ m) (Figura 29), semejantes a endosomas tempranos aberrantes causados por determinados tratamientos (Carozzi et al., 2000; Pelkmans et al., 2004).

La formación de estas estructuras aberrantes, se ve incrementada en número e intensidad a los 30 min de inducción con etanol, y además se observa, también a este tiempo, una tinción de TRITC en el núcleo, lo que sugiere que IL-1RI se transporta al núcleo, mientras que la CT-B (caveolas) se mantiene en citoplasma (Figura 29). Este efecto se encuentra más acusado a los 30 min de inducción con etanol a una concentración de 50 mM, en comparación a 10 mM.

En contraposición, a los 10 min de inducción con IL-1 β o etanol 10 mM, se observa una disminución en la intensidad, pero sobretodo, en la cantidad de estas estructuras anillares de gran tamaño.

Aunque el tratamiento con etanol e IL-1 β genere este tipo de estructuras anillares de gran tamaño en el citoplasma, donde conviven tanto las caveolas como IL-1RI, no hemos observado colocalización entre ambas, sólo hemos detectado una gran proximidad entre ellas. Estos resultados sugieren que las caveolas, tal y como hemos comentado anteriormente, son como plataformas de señalización que sirven para ensamblar los componentes requeridos, facilitando su interacción y apoyando su señalización (Magee et al., 2002; Pike, 2003).





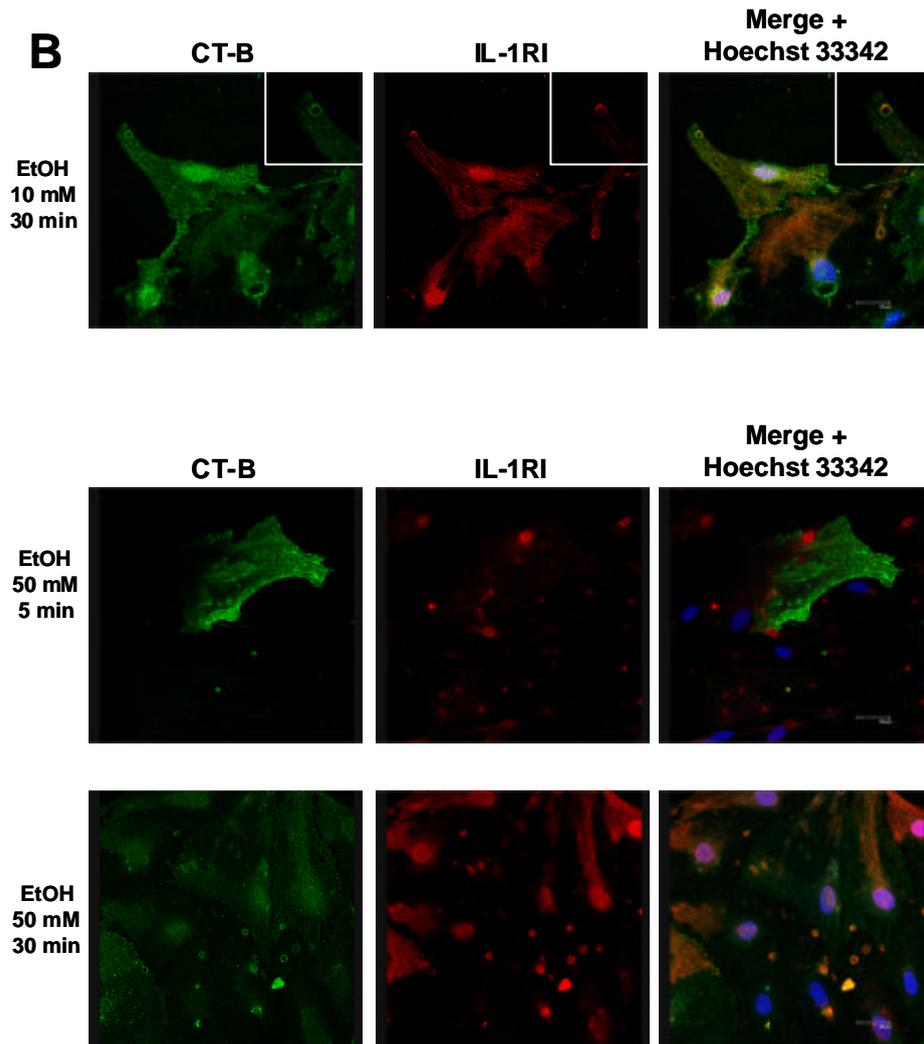


Figura 29. El tratamiento con IL-1 β o etanol provoca la endocitosis de IL-1RI a través de la asociación de vesículas caveolares a endosomas de gran tamaño. Los astrocitos se sembraron en cubres de 16 mm y se trataron con IL-1 β (A) o etanol (10 y 50 mM) (B) durante 5, 10 y 30 min. Posteriormente, las células se incubaron con CT-B (toxina colérica B) (verde) y anti-IL-1RI (rojo), y Hoechst 33342 (azul) (barra de calibración=30 y 10 μ m).

5. DISCUSIÓN

Capítulo 5: DISCUSIÓN

5.1. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL INDUCE DAÑO HEPÁTICO: PAPEL DE LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A LPS e IL-1b EN HEPATOCITOS

La relación entre el consumo de alcohol y enfermedad hepática está claramente establecida. El espectro de la enfermedad hepática alcohólica varía desde la presencia de un proceso benigno de hígado graso, sin inflamación ni fibrosis, hasta el desarrollo de formas más severas de enfermedad como la hepatitis alcohólica, la formación de fibrosis, y finalmente la progresión a cirrosis con sus complicaciones de insuficiencia hepática y riesgo de hepatocarcinoma. Sin embargo, la incidencia de daño hepático severo en alcohólicos, como la cirrosis, es relativamente baja (15-20%), lo que hace pensar que existen factores asociados (genéticos, ambientales, nutritivos) que contribuyen al daño hepático relacionado con la ingesta de alcohol.

De hecho, se sabe que el etanol es un hepatóxico y su consumo causa graves alteraciones a nivel bioquímico, fisiológico y funcional en el hepatocito (Blondell et al., 1996; Lands, 1995; Tsukamoto and Lu, 2001). Sin embargo, a pesar de los numerosos avances realizados en la última década, no están totalmente esclarecidos los mecanismos que participan en la progresión y en el daño que ocurren en la hepatopatía alcohólica y que pueden conducir a la cirrosis. Entre los mecanismos propuestos, y que se consideran con mayor relevancia se incluyen: aumento de radicales libres y estrés oxidativo (Arteel, 2003), consecuencias de la producción de acetaldehído (Lieber, 2004), e inducción de procesos inflamatorios que

causarían daño en el parénquima hepático y muerte del hepatocito (Bode and Bode, 2005; Tsukamoto and Lu, 2001). Referente a este último mecanismo, diferentes estudios han demostrado un aumento en los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias en individuos con hepatopatía alcohólica y con cirrosis alcohólica (Bunout et al., 1996; Khoruts et al., 1991; McClain et al., 1999; Valles et al., 2003).

En general, durante los procesos inflamatorios las dos citoquinas que inician la cascada de la respuesta inflamatoria actuando de forma sinérgica son el TNF- α y la IL-1 β , (Dinarelo, 2000). En alcohólicos con hepatitis y cirrosis alcohólica, se ha observado una sobreproducción de estas dos citoquinas pro-inflamatorias (Khoruts et al., 1991; Shimada et al., 1993), que parecen jugar un papel esencial en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica (Kishore et al., 2002; McClain et al., 1999). El mecanismo que subyace a la liberación de citoquinas, se desconoce, aunque diversos estudios han demostrado que el consumo de alcohol induce tanto proliferación bacteriana intestinal como la liberación de la endotoxina LPS al torrente circulatorio, lo que podría explicar el aumento de esta toxina en el plasma de alcohólicos (Bode et al., 1987; Fukui et al., 1991). Se ha sugerido que el aumento en los niveles de LPS jugaría un papel esencial en el desarrollo del daño hepático asociado al consumo de alcohol (Bode and Bode, 2005), ya que el LPS es capaz de exacerbar la liberación de citoquinas pro-inflamatorias e incrementar la activación de la respuesta inflamatoria y daño hepático (Adachi et al., 1995; Nanji et al., 1993).

La mayoría de estudios sugieren que el etanol de forma directa o indirecta, a través de la liberación del LPS, estimularía a las células de Kupffer, o macrófagos residentes en el hígado, que serían los responsables

de la liberación de TNF- α al parénquima hepático y al suero, siendo esta citoquina la principal implicada en el daño inflamatorio asociado al consumo de alcohol (Bode and Bode, 2005). Sin embargo, pocos estudios habían considerado el posible papel de la IL-1 β como citoquina esencial, junto al TNF- α , en el proceso inflamatorio asociado a la hepatopatía alcohólica. Al mismo tiempo, nadie había considerado la posibilidad de que el hepatocito, pudiera estimularse por el etanol, y/o por el LPS, y liberar citoquinas. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que el etanol es capaz de estimular la liberación de las citoquinas IL-1 β e IL-10 en los hepatocitos, no afectándose los niveles de TNF- α . Igualmente, nuestros resultados demostraron que la endotoxina LPS potencia la liberación de IL-1 β inducida por el alcohol. Considerando que los hepatocitos son las células más abundantes en el parénquima hepático, representando un 85% del volumen hepático (Tsukamoto and Lu, 2001), la liberación de IL-1 β por los hepatocitos podría contribuir, tanto a los incrementos en los niveles plasmáticos de esta citoquina, como contribuir al daño hepático inducido por el etanol a través de la inducción de su cascada de señalización, que puede conllevar a la producción de más citoquinas.

Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el posible efecto del consumo crónico de alcohol sobre la cascada de señalización intracelular asociada a la IL-1 β , así como los posibles cambios en el nivel de su receptor, IL-1RI. Nuestros resultados demuestran que el consumo crónico de alcohol causa un aumento en los niveles de expresión del receptor IL-1RI en hígado y en hepatocitos en cultivo. El aumento de expresión de IL-1RI se asoció a una activación de las quinasas IRAK y ERK1/2, así como del factor de

transcripción NF- κ B, cascada de señalización asociada a IL-1 β (Huang et al., 1997; MacGillivray et al., 2000; Singh et al., 1999).

Algunos trabajos experimentales han demostrado un aumento en la susceptibilidad al LPS y a IL-1 β para el desarrollo del daño hepático inducido por el consumo crónico de alcohol (Honchel et al., 1992; Koteish et al., 2002; Mathurin et al., 2000). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demuestran que los hepatocitos procedentes de ratas alcohólicas poseen una mayor respuesta inflamatoria cuando se tratan con LPS o con IL-1 β , en comparación a los hepatocitos procedentes de animales control. Estos resultados sugieren que el consumo de alcohol, no sólo sensibiliza a las células de Kupffer, tal y como se había demostrado (Enomoto et al., 1998; Yamashina et al., 2005; Yamashina et al., 2000), sino que los hepatocitos también pueden sensibilizarse tras el tratamiento con LPS e IL-1 β , generando un incremento de la señal inflamatoria y daño celular asociadas a la hepatopatía alcohólica.

Aunque los mecanismos implicados en el aumento de la sensibilidad al LPS e IL-1 β tras el consumo crónico de alcohol no están totalmente esclarecidos, algunos estudios sugieren que esta sensibilización se debe a una sobre-activación de la proteína quinasa ERK1/2 de las células de Kupffer (Cao et al., 2002; Kishore et al., 2002). De forma similar, nuestros resultados mostraron un aumento muy marcado en la fosforilación de ERK1/2 en hepatocitos procedentes de ratas alcohólicas tratados con LPS e IL-1 β . Además, observamos una notable activación de ERK1/2,, lo que podía explicar el posterior incremento en la unión al ADN de NF- κ B en hepatocitos procedentes de ratas alcohólicas, ya que la inhibición de ERK1/2, por el PD-

98059, eliminó la inducción de este factor de transcripción por la estimulación de IL-1 β , tanto en hepatocitos control como de ratas alcohólicas. Estos resultados sugieren que la inducción de la MAP quinasa ERK1/2 y posterior activación del factor de transcripción NF- κ B, intervendrían en el proceso de sensibilización de los hepatocitos al LPS o IL-1 β , potenciando la muerte celular y daño hepático inducido por el alcohol, ya que podrían intervenir en el aumento de la liberación de mediadores tóxicos, tales como IL-1 β , TNF- α (Kishore et al., 2002) y NF- κ B (Uesugi et al., 2001a; Yamashina et al., 2005).

Otro aspecto interesante de este estudio fue el hallazgo que demostraba que el etanol era capaz de estimular la producción de IL-10 en hepatocitos, aunque los niveles de su receptor IL-10R no se veían afectados, ni en hígado ni en hepatocitos procedentes de ratas alcohólicas. Puestos que la citoquina IL-10 es un potente anti-inflamatorio, y puede contrarrestar los efectos de las demás citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α e IL-1 β (Louis et al., 2003) y del LPS (Hill et al., 2002), estos resultados sugieren que el consumo de alcohol podría perturbar el balance de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en hepatocitos (Jarvelainen et al., 1999; Le Moine et al., 1999), disminuyendo la respuesta protectora de IL-10 y acentuando el daño hepático y la sensibilización al LPS inducidos por el alcohol.

En conclusión, aunque existen numerosas evidencias que indican la implicación principal de las células de Kupffer en el daño hepático inducido por el alcohol, nuestros resultados demuestran que el consumo crónico de alcohol también incrementa la producción de IL-1 β y su respuesta inflamatoria en el hepatocito. También demostramos que el etanol es capaz

de sensibilizar a los hepatocitos frente a citoquinas inflamatorias y endotoxinas, exacerbando el daño inflamatorio ocasionado en el hígado (Valles et al., 2003).

El interés principal de estos resultados reside en el papel de los hepatocitos, no considerados como célula macrófago, como diana del alcohol en la consecución del daño inflamatorio en el hígado. Además, en contraposición a la gran importancia que se ha atribuido al TNF- α en la patogénesis de la enfermedad alcohólica hepática (Mathurin et al., 2000; Szuster-Ciesielska et al., 2000; Thurman, 1998; Yamashina et al., 2000; Yee et al., 2000), nuestros resultados demuestran que, la citoquina IL-1 β junto con el LPS, pueden jugar un papel esencial en la respuesta inflamatoria en el hepatocito desencadenada por el etanol.

5.2. EL ETANOL INDUCE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y MUERTE CELULAR EN CORTEZA CEREBRAL Y EN ASTROCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

Durante los últimos años han aparecido numerosas investigaciones que resaltan el papel esencial que desempeña la citoquina IL-1 β , como molécula clave en las interacciones que ocurren a nivel cerebral durante la respuesta inmune y especialmente, en la neuroinflamación (Touzani et al., 1999) asociada con ciertas formas de neurodegeneración (Rothwell and Luheshi, 2000). La inmensa mayoría de estos trabajos apuntan a la acción de la IL-1 β como un potente activador de los astrocitos humanos (John et al., 2004; John et al., 2001), implicando esa respuesta en el mecanismo de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de

Parkinson, Alzheimer, etc (Giovannini et al., 2003; Hunot and Hirsch, 2003; Mrak and Griffin, 2005). Como ocurría con los hepatocitos, los astrocitos, clásicamente, han sido considerados como elementos no excitables, cuya principal función era de soporte del tejido nervioso, y la activación de la microglía, las células fagocíticas del cerebro, se asociaba con el daño o inflamación del SNC.

Es por ello, y por el interés de nuestro laboratorio en las funciones de las células astrogiales como diana en los efectos neurotóxicos del etanol, tanto en cerebro adulto como durante su desarrollo (Pascual et al., 2001), por lo que nos planteamos abordar la hipótesis de que los astrocitos juegan un importante papel en las funciones inmunológicas en el cerebro, y que la IL-1 β es esencial en la respuesta inflamatoria de estas células. Al mismo tiempo, nos planteamos contestar a la pregunta, de si el etanol, al igual que ocurre en hígado, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria asociada a la IL-1 β en astrocitos y en cerebro, y si esta respuesta es responsable de la neurotoxicidad y daño cerebral observada en pacientes alcohólicos.

5.2.1. Etanol y daño cerebral: papel de los mediadores inflamatorios.

El cerebro es uno de los principales órgano diana con respecto a los efectos del alcohol, ya que causa una gran variedad de alteraciones en la estructura, fisiología y funciones de este órgano. Los alcohólicos presentan una reducción del tamaño cerebral, en comparación a los individuos no alcohólicos, y el grado de atrofia del cerebro se correlaciona con la cantidad de alcohol consumido (Kril and Halliday, 1999). Numerosas evidencias experimentales han demostrado que el consumo crónico de alcohol induce

neurotoxicidad y daño cerebral, pudiendo causar neurodegeneración en el cerebro humano (Fadda and Rossetti, 1998; Harper et al., 2003; Kril et al., 1997). Las alteraciones neuropatológicas que se observan son pérdida neuronal y reducción de la materia blanca (Kril et al., 1997), junto con una reducción en el número de astrocitos y muerte de éstos (Korbo, 1999; Kril et al., 1997; Miguel-Hidalgo et al., 2002). Datos recientes han demostrado, además, que la ingesta de elevadas cantidades de alcohol durante un corto periodo de tiempo, de forma intermitente, en donde se alcanzan altos niveles de alcohol en cerebro, es especialmente perjudicial para este órgano, y puede causar neurodegeneración en animales experimentales (Collins et al., 1998; Crews et al., 2000; Obernier et al., 2002).

Los procesos neuropatológicos implicados en la neurotoxicidad y neurodegeneración inducida por el etanol, al igual que ocurre en el hígado, no están bien esclarecidos, aunque se han postulado algunos mecanismos y factores que podrían contribuir en esta neurotoxicidad. Así, se ha sugerido la participación de procesos excitotóxicos y la generación de óxido nítrico (Lancaster, 1992), otros han demostrado que durante la neurodegeneración se produce un "hinchazón" de las células gliales (*glial swelling*), conduciendo a un edema cerebral (Collins et al., 1998), y finalmente otros grupos, incluyendo el nuestro (Montoliu et al., 1994), han postulado la participación de un estrés oxidativo debido a un aumento de radicales libres (Sun et al., 2001). Hay que considerar, que la producción de radicales libres (Vallett et al., 1997) y de especies reactivas de oxígeno (Montoliu et al., 1994), son producidas, principalmente, por el sistema de citocromos P-450, y específicamente por la isoforma CYP2E1. Trabajos de nuestro laboratorio indican que el CYP2E1, además de estar en el hígado, se expresa en

cerebro, en donde se induce tras el consumo crónico de alcohol (Montoliu et al., 1995). Un aumento de radicales libres podría activar al NF- κ B en cerebro (Sun et al., 2001). Es interesante resaltar el hecho, de que el CYP2E1 también se expresa en astrocitos y se induce tras la exposición al etanol (Montoliu et al., 1995), sugiriendo que la activación de las células gliales contribuiría a la generación de radicales libres por parte del etanol en el cerebro.

Estudios experimentales y en humanos de los últimos años han sugerido el papel del proceso inflamatorio en la patogénesis de diversos trastornos neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, demencia asociada al SIDA y Esclerosis Múltiple (Giovannini et al., 2003; Hunot and Hirsch, 2003; Owens, 2003). Una de las características principales de la neuroinflamación es la activación de las células gliales, especialmente la microglia y la astrogliia, las cuales son capaces de producir compuestos pro-inflamatorios y neurotóxicos, incluyendo citoquinas y ROS, como superóxido, óxido nítrico (NO) y otros compuestos implicados en inflamación (COX-2, prostaglandinas) (Hirsch et al., 2003). Las células gliales, y en particular los astrocitos, responden activamente al daño cerebral y juegan un papel dual, por una parte liberan factores tróficos para ayudar al crecimiento axonal, y por otra son capaces de expresar y liberar mediadores inflamatorios amplificando los efectos de la respuesta inflamatoria (Minagar et al., 2002).

Basados en los anteriores hallazgos, resultados en humanos que demuestran reducción y muerte de las células astrogliales en cerebros de alcohólicos (Korbo, 1999; Kril et al., 1997; Miguel-Hidalgo et al., 2002), y resultados previos de nuestro laboratorio que demostraban que el etanol era

capaz de causar muerte en astrocitos en cultivo (Pascual et al., 2003), nos planteamos la hipótesis de que el etanol podía potenciar los mecanismos inflamatorios, aumentando la liberación y respuesta de citoquinas pro-inflamatorias, lo que conllevaría a una exagerada respuesta inflamatoria, muerte celular y daño tisular. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento crónico de etanol, no sólo incrementa los niveles de citoquinas (IL-1 β) y de mediadores inflamatorios (iNOS y COX-2) en corteza cerebral y en astrocitos en cultivo, sino que activa cascadas de señalización asociadas a los receptores TLRs (IL-1RI y TLR4), clásicamente asociadas con inflamación. Específicamente, observamos una activación de las MAP quinasas y de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Además, estos eventos inflamatorios se asociaron con un aumento de la muerte celular (Valles et al., 2004). Estos resultados sugieren que la activación de las células gliales por el etanol, además de incrementar la producción de compuestos tóxicos, como son ROS (Montoliu et al., 1994) y NO (Blanco et al., 2004), inducen un aumento de citoquinas y mediadores inflamatorios que pueden contribuir al daño cerebral, de forma similar a lo que ocurre en algunos trastornos neurológicos y en enfermedades neurodegenerativas (Giovannini et al., 2003; Hunot and Hirsch, 2003; Owens, 2003), sugiriendo la implicación de la inflamación en el daño cerebral inducido por el alcohol.

Actualmente, las evidencias que poseemos de que el etanol es capaz de inducir mediadores inflamatorios en el cerebro, proceden principalmente, de estudios realizados en células neurales en cultivo. Así, algunos estudios han demostrado que el alcohol es capaz de alterar la producción de NO y la expresión de iNOS y COX-2 en diferentes sistemas celulares, en ausencia o presencia estímulos adicionales, como otras citoquinas o LPS. Por ejemplo,

el etanol potencia la expresión de iNOS inducida por citoquinas en células de glioma C6 (Syapin et al., 2001), en células de la barrera hematoencefálica (células RBE4) (Naassila et al., 1996) y en neuronas embrionarias corticales (Mori and Natsuki, 1996). La estimulación en la producción de NO y la expresión de iNOS también se ha descrito, incluso en ausencia de otros estímulos, tal y como se demuestra en lisados de cerebro procedentes de cultivos de células cerebrales (Shih et al., 2001), así como en modelos experimentales de exposición prenatal al alcohol (Dizon et al., 2004).

El incremento en la expresión de COX-2 también se ha observado tras la administración aguda (Knapp and Crews, 1999) y crónica (Knapp and Crews, 1999; Simonyi et al., 2002) de alcohol en cerebro de rata, así como en astrocitos expuestos al etanol (Luo et al., 2001). En este último trabajo se demuestra que el etanol aumenta los niveles de COX-2 en astrocitos, pero no en neuronas.

De acuerdo con los anteriores datos, nuestros resultados indican que el etanol induce una rápida inducción de COX-2 e iNOS, que tiene lugar a los 30 min y a las 24 h del tratamiento (Blanco et al., 2004). Nuestros datos también demuestran que la activación del factor de transcripción NF- κ B es crítica para la inducción de iNOS y COX-2 por el etanol, ya que la inhibición de la actividad de NF- κ B, mediante PDTC o BAY 11-7082, suprime la expresión de iNOS y COX-2, sugiriendo una regulación transcripcional de estos mediadores inflamatorios por el NF- κ B (Blanco et al., 2004). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en fibroblastos humanos estimulados con IL-1 β , en los que se observa una inducción rápida de los genes de respuesta inmediata iNOS y COX-2, que está regulada a nivel transcripcional por NF- κ B, y al mismo tiempo, se induce una activación tardía

de estos mediadores inflamatorios que está mediada a nivel post-transcripcional, tanto por la MAPK p38, como por los niveles de prostaglandinas y citoquinas liberados, mediante mecanismos de retroalimentación negativa y positiva (Faour et al., 2001; Faour et al., 2003). Este último mecanismo podría explicar, tanto el descenso en la expresión de iNOS y COX-2, tras los 30 min de estimulación con etanol (retroalimentación negativa), como el posterior ascenso de su expresión a las 24 h de tratamiento (retroalimentación positiva).

La repercusión a nivel fisiológico y funcional de los anteriores resultados se demuestra en un reciente trabajo en donde el tratamiento intermitente con alcohol a ratas adolescentes, induce la expresión de iNOS y COX-2, y además incrementa la muerte por apoptosis en corteza, hipocampo y cerebelo. Los resultados también demuestran que la administración de la indometacina, inhibidor de la COX-2, bloquea tanto la inducción de la iNOS y la COX-2, y previene la muerte celular producida por el alcohol (Pascual et al., 2007).

En resumen, nuestros resultados indican que el etanol puede inducir genes de rápida respuesta (iNOS y COX-2), que pueden estar implicados en la generación de radicales libres y otros productos tóxicos, incrementando el estrés oxidativo neuronal, la muerte celular por apoptosis y el daño cerebral. Además, la activación del factor de transcripción NF- κ B sería un componente crítico en la producción de mediadores inflamatorios por el etanol, al menos en células astrogliales.

Aunque los mecanismos por los que el alcohol induce la expresión de mediadores inflamatorios en el cerebro se desconocen, en este trabajo postulamos, que la activación de NF- κ B y posterior aumento en la expresión

de iNOS y COX-2, podrían ser el resultado de la inducción en la señalización de los receptores TLRs por el etanol, tal y como se discute en el siguiente apartado.

5.2.2. El etanol estimula la cascada de señalización y los factores de transcripción asociados a la activación de los receptores TLRs: implicación en el daño inflamatorio cerebral inducido por el alcohol.

Tal y como se ha comentado en la introducción, la estimulación de los receptores TLRs y del sistema innato inmune conlleva a la activación de NF- κ B (ver Esquema 2, Introducción), y a la inducción de numerosos genes de respuesta inmune e inflamatoria (Fubini and Hubbard, 2003), los cuales codifican para citoquinas, enzimas (iNOS y COX-2) (Chen et al., 2005; Hwang et al., 1997; Konstantinopoulos et al., 2006) y moléculas de adhesión.

Diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que, tanto el tratamiento agudo como crónico de etanol, causa una activación de NF- κ B. Por ejemplo, la exposición aguda al etanol (25-100 mM) se ha demostrado que potencia la actividad de NF- κ B inducida por citoquinas en células astrogliales humanas (Davis and Syapin, 2004). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demuestran el tratamiento agudo con etanol genera una potente inducción de este factor de transcripción, que se observa a los 30 min y 24 h de tratamiento (Blanco et al., 2004; Blanco et al., 2005). Al mismo tiempo, la exposición crónica al alcohol también induce una activación de NF- κ B en hígado (Wheeler et al., 2000), cerebro (Ward et al., 1996) y en corteza cerebral, tal y como lo demuestran nuestros resultados (Valles et al., 2004). Además, tanto en astrocitos como en corteza cerebral, la

activación de NF- κ B se acompaña de una disminución significativa de los niveles citoplásmicos de I κ B- α , y de un aumento en los niveles de citoquinas, y de las enzimas iNOS y COX-2. Estos resultados sugieren que NF- κ B está activado de forma sostenida en respuesta al tratamiento crónico de alcohol.

La regulación del NF- κ B está controlada en múltiples niveles, incluyendo su localización subcelular. El factor NF- κ B está retenido en el citoplasma en células no estimuladas, y es transportado al núcleo en respuesta a una gran diversidad de estímulos (Mercurio et al., 1999; Mercurio et al., 1997), donde se une específicamente a motivos κ B del ADN y altera la expresión de un gran número de genes pro-inflamatorios (DiDonato et al., 1997). Sin embargo, se sabe que tras la estimulación, la duración de la activación de NF- κ B puede ser transitoria o persistente, dependiendo del estímulo y del tipo celular. Este perfil temporal de NF- κ B puede tener una relevancia clínica importante, ya que mientras una inducción rápida de NF- κ B puede ser beneficiosa para la respuesta inmune contra la infección o el daño (Pascual and Glass, 2006), una activación duradera o persistente puede inducir aumento en mediadores inflamatorios y, de hecho, se ha observado en enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la Esclerosis Múltiple (Moynagh, 2005).

En un estudio reciente, se demuestra que la inducción de NF- κ B es persistente en astrocitos tratados con IL-1 β (Griffin and Moynagh, 2006). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demuestran que el consumo crónico de alcohol activa de forma sostenida al NF- κ B, y esta activación se asocia con niveles elevados de IL-1 β , tanto en cerebro como en astrocitos.

Estos resultados sugieren que los altos niveles de IL-1 β que se asocian con el tratamiento crónico de alcohol, podrían ser los responsables de la persistente activación de NF- κ B, y podrían participar en la inducción prolongada de mediadores inflamatorios y del daño cerebral inducido por el consumo de alcohol.

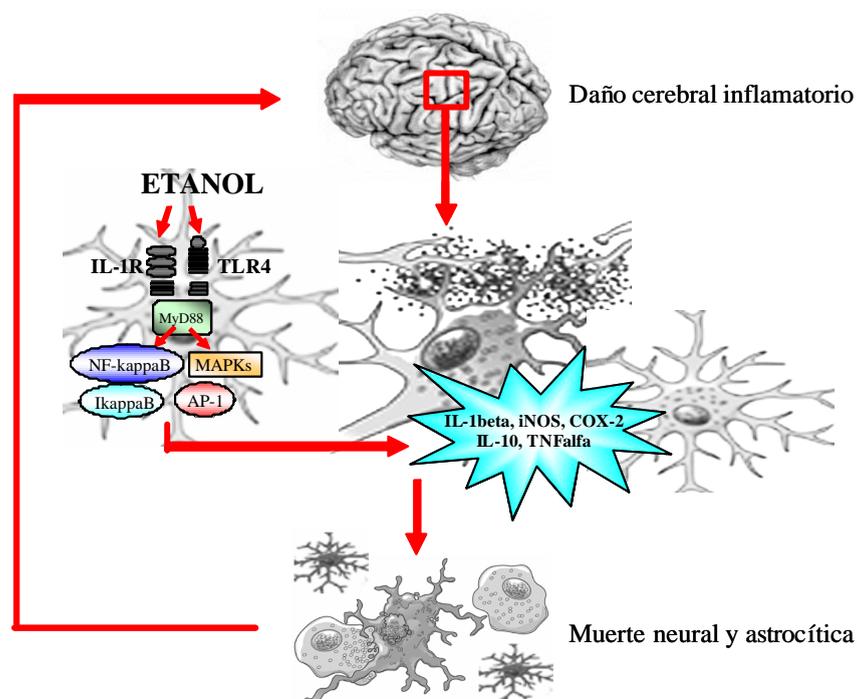
Otro punto importante en el mecanismo de activación del NF- κ B, es a través de su regulación por IKK. Existen numerosas evidencias que demuestran que IKK se activa a través de la fosforilación de otras quinasas en los primeros eslabones de la cascada de señalización de los receptores TLRs. Se ha postulado que la fosforilación de IKK estaría mediada por diferentes quinasas, entre las que se incluyen la NF- κ B-inducing kinase (NIK) y las MAP quinasas (MAPK: ERK1/2, JNK y p38) (Lee et al., 1997; Ling et al., 1998; Nakano et al., 1998) (ver Esquema 1, Introducción). La mayoría de estudios experimentales demuestran la participación de las MAPKs en los procesos inflamatorios (Dong et al., 2002; Lee et al., 1997; Lee and Shukla, 2005; Means et al., 2000; Sugden and Clerk, 1997). Además, la activación de las MAPKs, no sólo incrementa la actividad de NF- κ B, sino que también facilita la unión al ADN y la actividad de otro factor de transcripción, como es activator protein-1 (AP-1).

De hecho, se ha demostrado que el factor AP-1 se activa a través de las MAPKs o de las quinasas activadoras de las MAPK. Estas quinasas se unen a los promotores c-jun y c-fos incrementando su actividad transcripcional, y formando heterodímeros estables de AP-1 (Karin, 1995). Por tanto, la activación de las MAPK pueden ser el eslabón principal para la inducción de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, ya que al igual que ocurre en hígado (Nagy, 2003), el tratamiento crónico con etanol induce en

corteza cerebral y astrocitos una activación de MAPK, que da lugar a una estimulación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, y estos eventos se asocian con un incremento en la inflamación y daño celular (Valles et al., 2004). Finalmente, considerando que la activación de las MAPKs puede mediar el proceso inflamatorio y la liberación de moléculas neurotóxicas, tal y como se describe en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, estas quinasas pueden ser dianas potenciales para la farmacoterapia en el daño agudo cerebral y neuroinflamación inducida por el alcohol.

Uno de los mecanismos claramente aceptado por muchos investigadores en la inducción de neurotoxicidad por el etanol, es la capacidad del etanol de inducir muerte celular por apoptosis (Chen et al., 2006; Fakoya and Caxton-Martins, 2006; Guasch et al., 2003; Minambres et al., 2006; Siler-Marsiglio et al., 2006; Young et al., 2003). Nuestros resultados sugieren que los mediadores inflamatorios podrían causar daño y muerte por apoptosis en corteza cerebral y en astrocitos, ya que la estimulación de la vía MAPK/NF- κ B/AP-1, y posterior incremento en la expresión de mediadores inflamatorios, siempre va acompañada de un aumento en la apoptosis (Blanco et al., 2005; Valles et al., 2004).

Finalmente, aunque la muerte por apoptosis es común en enfermedades neurodegenerativas (Emerit et al., 2004; Takuma et al., 2004) y enfermedades neuroinflamatorias (Walker and Lue, 2005), no podemos excluir la posibilidad de que el etanol pueda causar también muerte por necrosis. De hecho, se ha descrito que la inflamación da lugar a daño y muerte celular por necrosis, posiblemente por defectos en la fagocitosis y eliminación de células apoptóticas y necróticas que se producen en la inflamación y neurodegeneración del SNC (Wyss-Coray and Mucke, 2002).



Esquema 4. Mecanismo potencial del daño cerebral inducido por el etanol. El etanol desencadena la respuesta de señalización inflamatoria (MyD88, MAPKs, NF- κ B y AP-1) y aumenta la producción de mediadores inflamatorios (IL-1 β , iNOS, COX-2, IL-10, TNF- α) mediante la activación de los receptores TLR4 e IL-1RI en células gliales, pudiendo conllevar a una respuesta inflamatoria exacerbada responsable del daño cerebral por un aumento en la muerte neural y astrocítica.

En conclusión, los resultados de este apartado indican que el etanol sería capaz de inducir una activación de la glía, a través de la estimulación de cascadas de señalización intracelular asociadas a los receptores TLRs, conllevando a un aumento en la producción de mediadores inflamatorios y compuestos tóxicos que podrían exacerbar la respuesta inflamatoria y muerte neural y astrocítica, tal y como se ilustra en el Esquema 4.

5.3. ALCOHOL Y NEUROINFLAMACIÓN: ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES TLR4 e IL-1RI Y SU SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR, A TRAVÉS DE SU RECLUTAMIENTO EN LOS MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS*.

5.3.1. Implicación de los receptores TLR4 e IL-1RI en la respuesta inflamatoria inducida por el etanol en astrocitos.

La estimulación de los receptores TLRs se ha implicado con la iniciación de la respuesta innata inmune, ya que desencadena la expresión de genes inflamatorios y en última instancia, el beneficio de la eliminación de agentes infecciosos (Akira and Takeda, 2004). Sin embargo, una superproducción de moléculas inflamatorias, por una inapropiada y sostenida respuesta inflamatoria, puede causar numerosas patologías de origen inflamatorio (Campbell, 2004). Por tanto, la inflamación es un componente importante en el daño asociado a algunas enfermedades autoinmunes (Dalgleish and O'Byrne, 2006; Tedgui and Mallat, 2006).

Diversos estudios clínicos y experimentales revelan que el consumo de alcohol afecta, tanto a la respuesta innata inmune como a la respuesta inflamatoria en numerosos órganos, incluyendo al hígado (MacGregor, 1986;

Nagy, 2003). Sin embargo, nadie había demostrado que el alcohol pudiera también afectar a la respuesta del sistema inmune en el SNC e inducir inflamación y daño en cerebro.

El SNC posee un sistema innato inmune muy bien organizado para defenderse de las infecciones (Marcolini et al., 2002; Rivest, 2003), y lesiones (Owens et al., 2005; Tanga et al., 2005). Las células gliales son las encargadas de generar una respuesta rápida y efectiva para controlar cualquier infección, hasta que las células del sistema inmune adaptativo periférico puedan ser reclutadas (Aloisi, 2001; Mack et al., 2003). De hecho, tanto la microglía como los astrocitos, expresan la mayoría de los receptores TLRs (TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9), así como IL-1RI, asociados al sistema inmune innato (Bowman et al., 2003; Bsibsi et al., 2002; Esen et al., 2004). Estas células energicamente responden contra cualquier estímulo infeccioso o inflamatorio (Carpentier et al., 2005), produciendo y liberando citoquinas pro-inflamatorias (Bowman et al., 2003; Esen et al., 2004) y contribuyendo a la respuesta inflamatoria en el SNC (Dong and Benveniste, 2001; Minagar et al., 2002).

De la gran variedad de receptores que componen la familia TLRs, dos de ellos son absolutamente necesarios para la expresión de un gran número de genes característicos en la inflamación: TLR4 e IL-1RI. Curiosamente, ambos comparten una cascada de señalización intracelular similar, que incluye la vía inflamatoria IRAK/MAPK/NF- κ B/AP-1 (ver Esquema 2, Introducción). El TLR4 es un receptor crítico en la inducción de la respuesta innata inmune y en el daño inflamatorio en el SNC (Laflamme et al., 2003), y el receptor IL-1RI se ha descrito como un mediador esencial, tanto en la regulación de la respuesta defensiva frente a patógenos, como en

el desarrollo de la inflamación en respuesta a un daño agudo o crónico en el cerebro (Andre et al., 2005).

Nuestros resultados muestran que los astrocitos responden al estímulo del etanol, liberando citoquinas y otros mediadores inflamatorios, y contribuyendo al daño inflamatorio observado en el cerebro de ratas alcohólicas. Además, el etanol es capaz de activar vías de señalización, tanto en cerebro como en astrocitos, clásicamente asociadas a la activación de los receptores TLR4/IL-1RI (Blanco et al., 2004; Blanco et al., 2005; Valles et al., 2004). De hecho, demostramos que el tratamiento de los astrocitos con etanol, a concentraciones con relevancia fisiológica (10-50 mM, aproximadamente 0.05-0.2 gr/dl) estimula rápidamente la cascada de señalización de TLR4 e IL-1RI, de manera similar a lo que ocurre cuando estas células son estimuladas con LPS o IL-1 β (Buss et al., 2004; Jang et al., 2003; Wilflingseder et al., 2004; Wu et al., 2003). Específicamente, nuestros resultados demuestran claramente que el etanol (50 mM) induce una rápida respuesta de IRAK, ERK1/2, JNK y p38 a los 10 min, seguida de una activación de NF- κ B y AP-1, y de mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 a los 30 min. Estos eventos conllevan muerte celular por apoptosis que se observa a las 3 h de tratamiento.

Es interesante resaltar que concentraciones muy bajas de alcohol, como son 10mM, aunque inducen la cascada de señalización (IRAK/ERK), no causan apoptosis a ninguno de los tiempos analizados (10, 30 min, 1, 3, 12 y 24 h) (datos no mostrados). Esta discrepancia entre altas y bajas concentraciones de alcohol sobre la apoptosis podría explicarse por el hecho, de que mientras a bajas concentraciones de alcohol (10mM), se liberan tanto citoquinas inflamatorias (IL-1 β), como anti-inflamatorias (IL-10), a

concentraciones moderadas/altas sólo se liberan citoquinas pro-inflamatorias. Esto podría deberse a que el alcohol induce efectos muy diferentes en la producción de citoquinas, dependiendo de la duración del estímulo y de su concentración (Crews et al., 2006; Deaciuc, 1997). De hecho, nuestros resultados muestran que la acción del etanol sobre los *lipid rafts* y la señalización de los receptores TLR4/IL-1RI, es diferente en función de la concentración de etanol ensayada y la duración del tratamiento, lo que podría afectar a la liberación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias.

Estos resultados sugieren que el etanol, dependiendo de la concentración, puede proteger o potenciar el daño inflamatorio, y que ambos efectos se desencadenan a través de la activación por el etanol de los receptores TLR4/IL-1RI (ver Sección 5.3.2).

De hecho, nuestros resultados demuestran, por primera vez, que el bloqueo de los receptores TLR4 o IL-1RI, con anticuerpos específicos, elimina la señal inflamatoria, la activación de la cascada de señalización (IRAK/MAPK/NF- κ B/AP-1), la expresión de mediadores inflamatorios, e incluso se previene la muerte celular por apoptosis inducida por el etanol (50 mM) (Blanco et al., 2005). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la respuesta inflamatoria generada por el etanol en el cerebro, está mediada por una activación de los receptores TLR4 e IL-1RI, al menos en astrocitos. En apoyo a esta hipótesis, el uso de ARN silenciadores que bloquean la síntesis del receptor IL-1RI, elimina la activación de IRAK y ERK1/2 inducida por el etanol.

Un aspecto, en principio contradictorio, en nuestros resultados es que, mientras a una concentración de etanol entre 10-50 mM se induce la señal inflamatoria de TLR4/IL-1RI, a altas concentraciones de alcohol (= 100

mM, 0.4 gr/dl) observamos el efecto contrario, es decir, una inhibición en la respuesta de los receptores TLR4/IL-1RI.

Una pregunta que nos hicimos, fue si la activación de los receptores TLR4/IL-1RI por el etanol se realizaba mediante una interacción directa con estos receptores o a través de sus interacciones con los lípidos de membrana. De hecho, se sabe que el etanol puede interactuar con los lípidos de la membrana plasmática, influenciando la función de proteínas enclavadas en la bicapa lipídica (Peoples et al., 1996). Por tanto, era posible predecir que el etanol, a bajas concentraciones, podía facilitar el reclutamiento de los receptores TLR4 e IL-1RI en ciertos microdominios de la membrana denominados *lipid rafts*, mientras que a altas concentraciones podía causar desestructuración de la membrana, conllevando a una inhibición del reclutamiento en los *lipid rafts* y en su señalización.

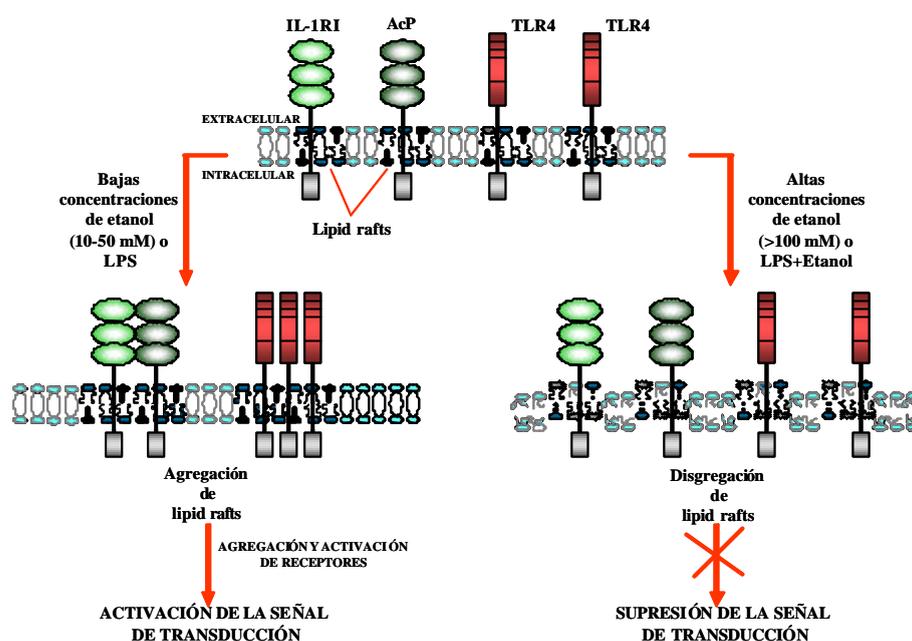
Los *lipid rafts* son microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingomielina, y actualmente están cobrando una gran importancia por su implicación, cada vez más demostrada, en el reclutamiento y agregación de moléculas que intervienen en la señal de transducción intracelular. Además, algunos trabajos indican que en estos microdominios se inicia y activa la respuesta inmune celular (Pike, 2003; Simons and Toomre, 2000). De hecho, se ha demostrado que los receptores TLR2 y TLR4 están localizados en los *lipid rafts*, y su reclutamiento en respuesta a un estímulo de LPS (Triantafilou et al., 2002; Triantafilou et al., 2004), que corrobora el papel importante que desempeñan estos microdominios en la respuesta inmune innata (Olsson and Sundler, 2006; Triantafilou et al., 2002; Triantafilou et al., 2004; Triantafilou and Triantafilou, 2005). Además, la disgregación de los *lipid rafts* mediante agentes capaces de deplecionar el colesterol, conlleva a la inhibición de la

internalización y señalización de los receptores TLRs (Triantafilou et al., 2002).

Con respecto al alcohol, se ha demostrado que altas concentraciones interfieren con la agregación de los *lipid rafts*, generando una supresión de la señalización de TLR4 en macrófagos murinos (Dai et al., 2005; Dolganiuc et al., 2006). Además, diversos estudios demuestran que el etanol suprime la expresión de iNOS inducida por citoquinas (Syapin et al., 2001; Wang and Sun, 2001) y la producción de NO inducida por LPS (Syapin, 1998) en células gliales. Estos resultados sugieren que el etanol, junto a otros estímulos (ej: citoquinas, LPS), puede interferir en el reclutamiento de los receptores TLRs en los *lipid rafts* y causar una inhibición en la transducción de señales asociada a TLRs.

En el Esquema 5, se muestra la hipótesis que planteamos de los efectos del etanol y su interacción con los TLRs/IL-1RI. En este esquema se muestra que, dependiendo de la concentración de etanol, y de la presencia o ausencia de otros estímulos, así como de la composición lipídica y de densidad de *lipid rafts* en los diferentes tipos celulares, la respuesta de los TLRs puede ser diferente. Al mismo tiempo, basados en esta hipótesis, es posible predecir, que la respuesta de estos receptores al etanol, puede ser diferente tras un consumo crónico, ya que existen evidencias de que este tratamiento altera la composición físico-química de las membranas celulares.

Una vez planteada esta hipótesis, nos propusimos demostrarla mediante el aislamiento de estos microdominios de membrana *lipid rafts* (ver Material y métodos, Sección 3.10) en astrocitos tratados con LPS, IL-1 β y etanol a una concentración baja-moderada, como son 10 y 50 mM, tal y como se discute en el apartado siguiente.



Esquema 5. Modelo hipotético de los efectos del etanol sobre los receptores TLR4 e IL-1RI, a través de su interacción con los *lipid rafts*. Tanto el etanol a bajas concentraciones (10-50 mM), como el tratamiento con LPS, facilitarían la agregación y reclutamiento en los *lipid rafts* de los receptores TLR4 e IL-1RI, conllevando a una activación de su señalización intracelular. Contrariamente, altas concentraciones de etanol (> 100 mM) o la combinación de LPS + etanol, puede perturbar los lípidos de membrana, incluyendo los *lipid rafts*, lo que resultaría en una alteración en la agregación de estos receptores, suprimiendo la activación de TLR4 e IL-1RI y su posterior señal de transducción.

5.3.2. Papel de los microdominios de membrana *lipid rafts* en el efecto del alcohol sobre los receptores TLR4 e IL-1RI y su señalización.

Los análisis bioquímicos y purificación de diferentes proteínas procedentes de *lipid rafts* de diversos tipos celulares, han mostrado una sorprendente concentración de moléculas de señalización contenidas dentro de estos microdominios de membrana (Zajchowski and Robbins, 2002). La existencia de diferentes clases de *lipid rafts* (Pike, 2003) y su organización lateral confiere una gran ventaja para la consecución de la señalización (Harder and Engelhardt, 2004), ya que los diversos tipos de proteínas o componentes de la señalización pueden estar confinados en diferentes microdominios de membrana. Por tanto, los *lipid rafts* pueden ser vistos como plataformas de señalización que sirven para ensamblar y colocalizar los componentes requeridos, facilitando su interacción y señalización (Magee et al., 2002; Pike, 2003; Simons and Ikonen, 1997). Así, receptores, proteínas adaptadoras, enzimas efectoras y sustratos estarían colocalizados en un solo microdominio. Para formar esta plataforma que sea capaz de soportar tales procesos celulares de señalización y poder organizar los ensamblajes del conjunto de proteínas, los *lipid rafts* están formados por diferentes proteínas de andamiaje que estabilizan estas interacciones, como son, entre otras, la caveolina-1 y la flotilina-1 (Harder and van Meer, 2003).

Referente al aislamiento de los *lipid rafts*, en un principio, se les denominaron membranas resistentes a detergentes (DRM), ya que la única técnica conocida para aislar estos microdominios, era la utilización del detergente no-iónico Tritón X-100 a una temperatura inferior a 8°C (Edidin, 2001; Heerklotz, 2002). Pero actualmente se sabe que la solubilización con detergentes genera reajustes no-fisiológicos de la membrana, y pueden

solubilizarse y separarse proteínas, que en la célula intacta, estarían unidas a *lipid rafts* (Munro, 2003). Además, la inclusión de detergentes produce una pérdida de proteínas asociadas a caveolina-1 (Chang et al., 1994). Para preservar estas interacciones, se han desarrollado nuevos métodos de aislamiento de *lipid rafts* libres de detergentes, como por ejemplo, la extracción con carbonato sódico (Na_2CO_3), que rutinariamente se utilizaba para el análisis de las proteínas firmemente unidas a la membrana y no solubiliza a la caveolina (Dupree et al., 1993; Sargiacomo et al., 1994; Sargiacomo et al., 1993). Por ello, el aislamiento de *lipid rafts* utilizado en este trabajo ha sido la extracción con Na_2CO_3 .

Referente a la acción del etanol sobre los *lipid rafts*, aunque desde hace muchos años se sabe que el etanol puede interaccionar con los lípidos de la membrana (Chiou et al., 1990), estudios más recientes indican que el etanol no actúa inespecíficamente sobre lípidos, si no que afecta a ciertos microdominios de las membranas (Peoples et al., 1996). Si estos microdominios corresponden a los *lipid rafts*, el movimiento de proteínas dentro y fuera de estos microdominios o entre las diferentes subpoblaciones de *lipid rafts*, se podría ver afectada por el etanol. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue demostrar que el efecto del etanol a concentraciones, 10-50 mM, sobre la activación y posterior señalización de los receptores TLR4/IL-1RI, podría ser debido a una interacción del etanol con los *lipid rafts*, ya que a altas concentraciones, el etanol es capaz de interferir en la agregación de los *lipid rafts*, generando una supresión de la señalización de TLR4 en macrófagos murinos (Dai et al., 2005; Dolganiuc et al., 2006). Además, se ha demostrado que pequeñas alteraciones en la estructura de estos microdominios, como puede ocurrir con concentraciones bajas de alcohol,

puede conllevar a la iniciación de cascadas de señalización intracelular (Simons and Toomre, 2000).

Para analizar si la inducción de TLR4 e IL-1RI por el alcohol era similar a la que ocurre con sus ligandos específicos, LPS e IL-1 β respectivamente, aislamos *lipid rafts* de astrocitos estimulados con etanol o LPS o IL-1 β . Estudios recientes habían demostrado el papel de los *lipid rafts*, tanto en la señal inflamatoria inducida por LPS (Olsson and Sundler, 2006; Triantafilou et al., 2002), como la generada por IL-1 β (Chen et al., 2003; Veluthakal et al., 2005).

Nuestros resultados demuestran, que tras el tratamiento tanto con LPS o IL-1 β , como con etanol 10 mM, aunque no modifica aparentemente la localización ni la cantidad de flotilina-1, si que afecta a la cantidad y la localización de la caveolina-1 en las diferentes fracciones del gradiente, concentrándose en fracciones 3-5 de sucrosa, en comparación con la situación no estimulada. Este resultado se podría explicar por el hecho de que la caveolina-1 puede influenciar la señalización, bien interaccionando con los receptores que inician la señal intracelular, o bien reclutando los múltiples componentes de la cascada de señalización, incluyendo proteínas adaptadoras, quinasas, etc (Allen et al., 2007; Engelman et al., 1998; Pelkmans and Helenius, 2002; Rajendran and Simons, 2005). Mientras que la flotilina-1, aunque también interviene en funciones de transducción de señales, se ha encontrado en otros compartimentos celulares que no son considerados *lipid rafts* (Kokubo et al., 2003; Lopez-Casas and del Mazo, 2003; Reuter et al., 2004). Contrariamente, la estimulación con etanol 50 mM altera la localización y cantidad, tanto de flotilina-1 como de caveolina-1. Este efecto podría ser debido a que concentraciones "moderadas" de etanol, como

es el caso de 50 mM, podrían estar desestabilizando la estructura de estos microdominios de membrana, tal y como ocurre con altas concentraciones de etanol (Dai et al., 2005).

En segundo lugar, nos propusimos investigar si los receptores TLR4 e IL-1RI se traslocaban a los *lipid rafts* caveolae (ricos en caveolina-1) tras la estimulación con LPS, IL-1 β o etanol 10 y 50 mM, lo cual nos indicaría que la activación de estos receptores se realizaría en estos microdominios idóneos para la consecución de la señal inflamatoria de ambos. Observamos que la estimulación con LPS, induce un reclutamiento del receptor TLR4 a las fracciones enriquecidas en caveolina-1. Esta traslocación depende del tiempo, la máxima traslocación ocurre a los 5, 10 y 30 min, mientras que a 15 min y 1 h, existe una regresión de TLR4 hacia fuera de las caveolas, prácticamente como en situación control. De la misma manera, la estimulación de los astrocitos con IL-1 β , produjo picos de inducción del receptor IL-1RI, a 5 y 30 min, produciéndose un alejamiento de IL-1RI con respecto a los *lipid rafts* caveolae, a los 10, 15 min y 1 h.

El etanol a una concentración 10 mM, al igual que ocurre con LPS o IL-1 β , provocó una traslocación a los *lipid rafts* ricos en caveolina-1, de TLR4 e IL-1RI, también de forma rápida (5 min). Pero a diferencia del IL-1 β y LPS, el segundo pico de inducción, tanto del TLR4 como del IL-1RI, se produjo a los 15 min y se mantenía en las fracciones de los *lipid rafts* caveolae hasta los 60min. Estos resultados apoyan la idea de que el etanol, al igual que el LPS o IL-1 β , inducen una activación y traslocación rápida (5min) de los receptores TLR4 e IL-1RI a las fracciones ricas en caveolas. Sin embargo, los picos de activación no son exactamente los mismos que los que ocurren entre ligando-receptor, sugiriendo que el etanol actuaría mediante otro

mecanismo, como es el de facilitar la agregación de los receptores en los *lipid rafts* caveolae, permitiendo su dimerización y activación, y generando la misma cascada de señalización que los propios ligandos, pero con un mecanismo y tiempos de inducción diferentes. En el caso del tratamiento con 50 mM de etanol, al producir una desestructuración de estos microdominios de membrana, se observa una disminución en el reclutamiento de ambos receptores, sugiriendo de nuevo que el alcohol puede inhibir o activar la señal inflamatoria de los receptores TLRs, en función de su concentración, por el efecto que produce en la estructura de los *lipid rafts*.

Nuestros resultados también demuestran que las moléculas implicadas en la señalización de los receptores TLRs, tales como IRAK y P-ERK, son reclutadas a los *lipid rafts* tras el tratamiento con LPS, IL-1 β o etanol 10 mM. En el caso de estas quinasas, existe mucha similitud entre los tres tratamientos, ya que se aprecia una activación y traslocación sostenida en todos los tiempos ensayados, con una iniciación de la regresión de IRAK y P-ERK hacia fuera de las caveolas, que comienza a observarse a los 60 min de tratamiento. Este hecho, puede deberse a que las proteínas reclutadas al complejo primario de señalización de TLR4 e IL-1RI (receptor/proteínas adaptadoras/quinasas fosforiladas) en respuesta a la estimulación con LPS o IL-1 β , se forma en el 1º minuto y se mantiene hasta los 30 min, en donde se disocia del complejo tanto IRAK como P-ERK (Chaudhary et al., 2007; Gutierrez-Venegas et al., 2006; Ng et al., 2001). Si a los 30 min se vuelve a inducir la activación de los receptores, como en este caso, volverá a formarse el complejo de señalización, lo que explicaría que la respuesta de IRAK y P-ERK se mantenga durante el tratamiento con etanol, o con LPS o con IL-1 β .

A la concentración de 50 mM de etanol, se produce una disminución

en la traslocación y activación de IRAK, tal y como se esperaba tras el descenso del reclutamiento de TLR4/IL-1RI en las caveolas, pero sí se observa un desplazamiento y reclutamiento de P-ERK. Este efecto inesperado en la activación de P-ERK, puede explicarse por el hecho de que esta quinasa se ha visto involucrada, además de en procesos responsables de daño celular (Pascual et al., 2003; Thakur et al., 2006), en mecanismos de supervivencia y protección frente a los efectos tóxicos producidos por altas concentraciones de etanol (Villegas et al., 2006). Por tanto, el aumento de ERK1/2 podría deberse a un mecanismo de protección contra la producción de radicales libres y estrés oxidativo inducidos por el etanol (Montoliu et al., 1995; Montoliu et al., 1994; Sun et al., 2001). De hecho, diversos estudios han demostrado que la activación de ERK1/2 puede conferir una alta protección frente a los efectos deletéreos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Niwa et al., 2003; Wang et al., 1998), y el mecanismo común implicado en este proceso involucra a los *lipid rafts* como punto esencial en la consecución de la señal de transducción pro-supervivencia mediado por P-ERK (Yang et al., 2006a). Por ello, un aumento en el reclutamiento de P-ERK a los *lipid rafts*, con una dosis moderada de alcohol 50 mM, podría explicar una protección frente al daño inflamatorio.

La cascada de señalización de los receptores TLR4 e IL-1RI se inicia tras la unión del ligando, que provoca la dimerización de los receptores y el consiguiente reclutamiento de proteínas adaptadoras, como MyD88 o proteínas relacionadas con la inducción del IFN- α o - β , como la proteína TRIF, hacia el dominio citoplásmico del receptor (Akira and Takeda, 2004; Doyle et al., 2002; Wesche et al., 1997). Se ha descrito que la activación de los receptores TLRs conlleva una estimulación de la señal a través de vías

dependientes o independientes de MyD88 (Takeda and Akira, 2004). La vía MyD88 dependiente, comprende el reclutamiento de esta proteína adaptadora al receptor, que conlleva al reclutamiento rápido de IRAK y posterior activación de MAPK y factores de transcripción NF- κ B y AP-1, liberando una gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias (ver Esquema 2, Introducción) (Dunne and O'Neill, 2003; Kracht and Saklatvala, 2002; Martin and Wesche, 2002; Yang et al., 2006b). La vía MyD88 independiente se identificó en estudios realizados con ratones deficientes en MyD88, los cuales eran resistentes a la muerte celular, pero seguían manteniendo unos niveles altos de MAPK y NF- κ B (Kawai et al., 1999). La vía MyD88 independiente comienza con el reclutamiento de la proteína TRIF, conllevando a una activación de IRF3 y la producción de IFN- β (Yamamoto et al., 2003), pero la unión de TRIF también genera la unión al complejo de Traf-6 e IRAK, la cual es la responsable principal de la activación de MAPK y NF- κ B (Kaiser and Offermann, 2005). Nuestros resultados demuestran que, aunque el tratamiento con LPS, IL-1 β o etanol genera una traslocación y activación de los receptores TLRs y su señalización, sólo la IL-1 β induce la señal inflamatoria a través de la vía MyD88 dependiente, ya que se observa un reclutamiento de MyD88 en las caveolas, tanto a 5 como a 30 min de estimulación, en nuestras condiciones experimentales. Estos resultados concuerdan con otros estudios que demuestran que la señalización inducida por IL-1 β necesariamente incluye la presencia de MyD88 (Burns et al., 2003), tal y como se demuestra también en células del SNC (Davis et al., 2006; Koedel et al., 2004; Tabarean et al., 2006). Sin embargo, el tratamiento tanto con LPS como con etanol 10 mM, estimula la señal intracelular a través de la

vía MyD88 independiente, ya que en ningún tiempo de tratamiento, se produce una traslocación de esta proteína adaptadora a los *lipid rafts* caveolae, aunque si se observó un aumento de MyD88 en la fracción del precipitado (membrana y restos celulares) a 5 y 30 min de estimulación. Estos resultados sugieren que MyD88 está de alguna manera implicada en la señalización del LPS o etanol, pero en este caso, otras proteínas adaptadoras podrían estar jugando un papel más significativo que MyD88, en cuanto a endocitosis caveolar se refiere. Una posibilidad, es la internalización de rutas de no-caveolares, pero asociadas a los *lipid rafts* (Nichols, 2003). Por tanto, es posible que MyD88, aunque no sea indispensable para la señalización de LPS o etanol, esté implicada de forma secundaria a través de otro mecanismo independiente de caveolas. A una concentración de etanol 50 mM, MyD88 tampoco se recluta en caveolas, aunque se detecta en la fracción de precipitado, pero su incremento se ve disminuído de nuevo, por la alteración producida en los *lipid rafts*.

5.3.3. El etanol induce la internalización y señalización del receptor IL-1RI a través del ensamblaje y tráfico intracelular de vesículas caveolares.

Nuestros resultados demuestran que el etanol es capaz de activar a los receptores TLR4 e IL-1RI, a través de su interacción con los microdominios de membrana *lipid rafts*. Estos resultados sugieren, que tras la activación con etanol, dichos receptores serían internalizados, transportados a los endosomas, y finalmente, a los lisosomas en donde serían degradados. Este proceso general, que ocurre para la mayoría de receptores, también se

ha observado con el IL-1RI tras su activación con IL-1 β . (Brissoni et al., 2006).

Para analizar la endocitosis del IL-1RI, en células estimuladas con IL-1 β o con etanol (10 y 50 mM), se realizaron estudios de inmunofluorescencia (en ausencia de Tritón X-100 para preservar las estructuras), utilizando la toxina colérica como marcador de la endocitosis caveolar, ya que la subunidad B de esta toxina se une al GM₁ gangliósido que está enriquecido en la membrana de las caveolas (Schnitzer et al., 1996; Tran et al., 1987). Además, la toxina colérica también se ha encontrado en los endosomas positivos a la tinción EEA1 (marcador de endosomas tempranos) (Parton and Richards, 2003).

Los resultados obtenidos mediante microscopia confocal demostraron que, tanto la toxina colérica (CT-B) como el IL-1RI se localizan en membrana plasmática, citoplasma y zona perinuclear, en células no estimuladas. Sin embargo, cuando los astrocitos se trataron con IL-1 β o con etanol, se produjo a los 5 y 30 min de tratamiento, una redistribución del CT-B y del IL-1RI concentrándose en estructuras definidas, que tenían forma de anillo, con un tamaño aproximado de 6-8 μ m. El número e intensidad en el marcaje de estas estructuras fue muy elevado a los 30 min de tratamiento, observándose también en este tiempo una localización del IL-1RI en el núcleo, lo que sugiere que IL-1RI se transportaría al núcleo, mientras que la CT-B (unida a GM₁-gangliósido, asociado a caveolina-1) se mantendría en citoplasma, como mero transportador. Aunque se requieren más estudios para caracterizar estas estructuras, pensamos que tanto por el tamaño, como por su expresión en CT-B, pueden ser *endosomas de gran tamaño* que se podrían formar a partir de caveosomas y endosomas tempranos.

Se ha demostrado que las vesículas caveolares, después de su internalización, se fusionan con los caveosomas en el citoplasma, pero también pueden acoplarse con la membrana de endosomas tempranos, no fusionándose completamente, con el fin de preservar su compartimento, reteniendo sus componentes lipídicos y proteicos (Pelkmans et al., 2004). Algunos tratamientos, tales como la exposición al antibiótico Anfotericina B, alteran la membrana (ya que este antibiótico se une al colesterol) e inducen una redistribución y fusión específica de la mayor parte de las caveolas y caveosomas en la membrana de endosomas dependientes de clatrina. Esto produce un aumento del tamaño de los endosomas, tanto tempranos como tardíos, llamados *endosomas o anillos de gran tamaño* en el citoplasma. Uno de los mecanismos que se postulan para este efecto, es que mientras en condiciones normales, las caveolas se fusionan transitoriamente a los endosomas, el tratamiento con un estímulo o droga, podría causar que se acumularan en el endosoma debido a un efecto inhibitorio de su disociación, lo que explicaría el dramático aumento en el tamaño del compartimento endosomal (Carozzi et al., 2000).

Considerando estos datos, sugerimos que tras la inducción con IL-1 β o etanol, se produce una agregación y reclutamiento de IL-1RI en los *lipid rafts*, internalización del receptor y señalización. En este proceso, se produce una fisión de vesículas caveolares en la membrana plasmática, seguido de una fusión de estas caveolas a endosomas de gran tamaño, tal y como observamos por la aparición de la tinción Alexa 488 (caveolas) y TRITC (IL-1RI) en grandes anillos citoplásmicos, lo que sugiere que tanto IL-1 β como el etanol, impiden la salida de las caveolas y por tanto, de IL-1RI, fusionadas a los endosomas.

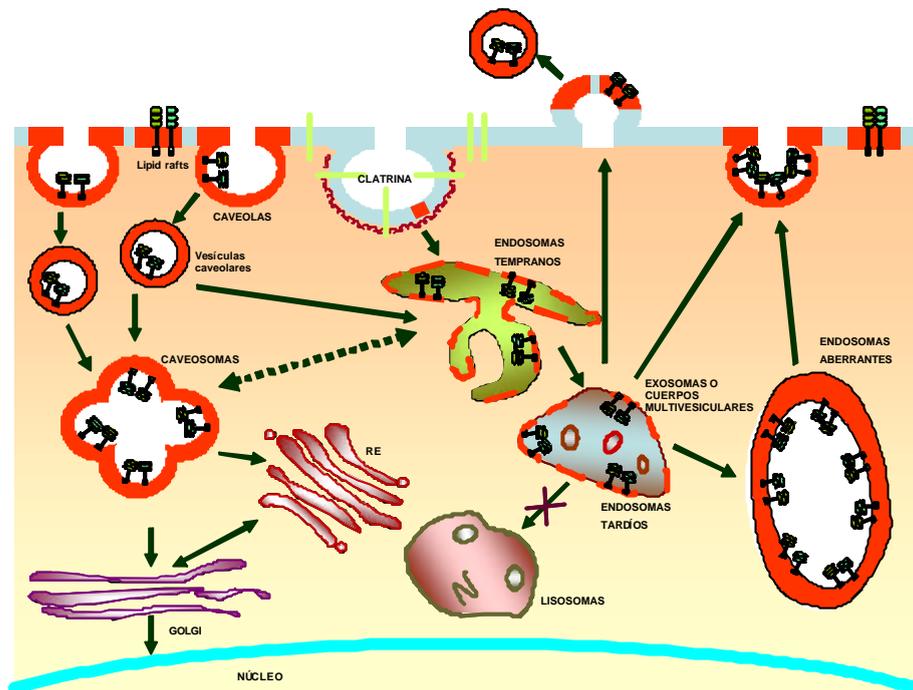
Al mismo tiempo, el hecho de que a los 10 min de tratamiento, se produzca una disminución de IL-1RI en las caveolas y una disminución en su señalización (ver Sección 4.5.2), podría sugerir, que aunque el tratamiento con IL-1 β o etanol, cause la formación de estos endosomas de gran tamaño, se ha demostrado que este efecto puede ser reversible en tratamientos agudos (Carozzi et al., 2000), y por tanto, IL-1RI proseguiría su tráfico normal de degradación, transportándose a los lisosomas para su degradación.

Sin embargo, a los 30 min de inducción, nuevamente observamos un aumento en estructuras en forma de anillo en el citoplasma, y éstas se correlacionan con un incremento en la localización y cantidad de IL-1RI en caveolas. Además, a los 30 min observamos que el IL-1RI-TRITC se localiza en el núcleo. La formación de endosomas de gran tamaño, puede deberse a una disminución de la degradación del IL-1RI por lisosomas, lo que podría causar que el transporte a partir de endosomas se realizara por dos vías alternativas: 1) vía retículo endoplásmico o Golgi, y posterior transporte al núcleo, en donde se originaría la respuesta inflamatoria. De hecho, tras el tratamiento con IL-1 β se observa una localización de IRAK en el núcleo, y posterior generación de la respuesta inflamatoria (Bol et al., 2005), y 2) vía exosomas o cuerpos multivesiculares, los cuales por un mecanismo de fusión con la membrana plasmática, reciclan componentes que estaban en el citoplasma, lo que explicaría el incremento en la localización y cantidad de IL-1RI en caveolas (membrana plasmática) a los 30 min. La formación de exosomas representa un mecanismo para la producción de receptores extracelulares, sobretodo, receptores de citoquinas solubles, como IL-1RI, necesarios también para la liberación por parte de la célula de citoquinas inflamatorias (Keller et al., 2006; Levine, 2004). Por tanto, sugerimos que una

disminución en la degradación podría inducir un acúmulo de IL-1RI en los endosomas, a la espera de su transporte al núcleo o a los exosomas, causando una fusión de caveolas con los endosomas que conllevaría a la formación de endosomas aberrantes de gran tamaño.

Otra observación interesante, es que el tratamiento con etanol 50 mM, tanto a 5 como 30 min, en donde también se observa una formación de estas estructuras endosomales de gran tamaño, la intensidad del marcaje con caveolas y con IL-1RI es más intenso que las observadas con 10mM etanol. La intensidad en el marcado de estas estructuras endosomales podría relacionarse con los experimentos realizados con Anfotericina B en células MDCK. En estos experimentos demuestran que al aumentar la concentración de este tóxico, se incrementa el número de estos endosomas de gran tamaño en el citoplasma (Carozzi et al., 2000). Por tanto, es posible sugerir que al aumentar la concentración de etanol, además de disminuir la degradación de IL-1RI por lisosomas, podría también verse alterado el reciclaje del mismo a membrana plasmática.

Es importante destacar que las estructuras en forma de anillo que observamos en el citoplasma de células estimuladas con etanol o con IL-1 β , que se tiñen con caveolas y con IL-1RI, no colocalizan, sólo hemos detectado una gran proximidad entre ellas, lo que sugiere que las caveolas, tal y como hemos comentado anteriormente, son como plataformas de señalización que sirven para ensamblar los componentes requeridos, facilitando su interacción y apoyando su señalización (Magee et al., 2002; Pike, 2003), pero su única función sería el de soporte físico para el proceso completo de señalización, desde la membrana plasmática hasta el núcleo celular.



Esquema 6. Representación sugerida del posible mecanismo implicado en la formación de endosomas de gran tamaño inducido por el etanol en la señalización de IL-1RI. El tratamiento con etanol o IL-1 β , produciría una disminución en la degradación de IL-1RI por parte de los lisosomas, y las únicas vías disponibles de tráfico del receptor serían transporte al núcleo y liberación a membrana por exosomas, las cuales serían insuficientes, conllevando a un acúmulo de IL-1RI y vesículas caveolares en los endosomas dependientes de clatrina, generando endosomas aberrantes de gran tamaño.

En conclusión, el tratamiento con etanol, al igual que IL-1 β induciría una activación de IL-1RI y su señalización a través de su interacción con los microdominios de membrana *lipid rafts*. El mecanismo que postulamos para la consecución de esta señalización, es la internalización y transporte citoplásmico de este receptor a partir de vesículas caveolares, que se fusionan y acumulan en endosomas tempranos, cada vez de mayor tamaño, por una disminución en la degradación de IL-1RI por lisosomas, además de un aumento de su transporte al núcleo y a los exosomas (ver Esquema 6). Trabajos anteriores corroboran este efecto del alcohol sobre la endocitosis, ya que demuestran que la exposición prenatal al etanol (Renau-Piqueras et al., 1997) y el consumo crónico de alcohol (Torok et al., 1997; Tuma et al., 1991a; Tuma et al., 1991b) produce alteraciones de las vesículas de transporte de proteínas en el hepatocito y además, el etanol induce una acumulación de vesículas y endosomas tardíos, así como de lisosomas, en astrocitos expuestos al etanol (Megias et al., 2000), por tanto, el tráfico de receptores mediado por endocitosis es especialmente sensible al tratamiento con alcohol.

5.3.4. Perspectivas

Los resultados del presente trabajo indican, que el consumo de alcohol activa un alto rango de mediadores inflamatorios y cascadas de señalización en hígado y en cerebro, que están íntimamente asociadas con la respuesta inflamatoria e inmune. Específicamente, la inducción de la respuesta inflamatoria producida por el alcohol, está asociada a la activación de los receptores específicos de IL-1 β y LPS, que son IL-1RI y TLR4, respectivamente. El mecanismo por el que el etanol produciría esta acción sobre los receptores, parece estar mediada por su efecto sobre la estructura de la membrana plasmática, en concreto, sobre microdominios especializados de membrana, como son los *lipid rafts*, causando alteraciones funcionales, tanto en la señal de transducción, como en el transporte de moléculas por endocitosis. Es importante enfatizar que las acciones del alcohol, en cuanto a mecanismos de inflamación y respuesta inmune, son estrictamente tiempo-, dosis- y tipo celular-dependiente, tal y como hemos observado en todo este trabajo. Por lo tanto, debido a la complejidad de las acciones del alcohol, y la falta de información sobre la naturaleza de la inflamación y respuesta inmune en el SNC, es necesario profundizar en estos procesos y realizar estudios para esclarecer los mecanismos por los que el etanol puede estar actuando sobre TLR4 e IL-1RI, tanto en astrocitos como en corteza cerebral. En la búsqueda de respuestas, nuestros principales objetivos se encaminan hacia el uso de tecnologías actuales, tales como las técnicas de silenciamiento de genes, mediante ARN silenciadores (ARNsi), y el uso de ratones *knockout* para TLR4 e IL-1RI. Actualmente, se están poniendo a punto estas dos técnicas, por una parte, en cuanto al silenciamiento de los receptores TLR4 e IL-1RI en astrocitos, se están

analizando diferentes métodos de transfección de ARNsi, con el fin de incrementar la eficacia de transfección de estas células. Y por otra parte, ya disponemos de ratones *knockout* para TLR4, y en breve, procederemos a su genotipado, tras el paso de éstos por la etapa de cuarentena. Además, objetivos más inminentes, son el estudio con mayor profundidad del mecanismo implicado en la formación de endosomas de gran tamaño en el citoplasma, mediante la utilización de diferentes marcadores de orgánulos celulares y análisis en microscopía confocal. Además, pretendemos utilizar agentes potentes que deplecionen el colesterol, para corroborar el efecto del alcohol sobre los microdominios de membrana *lipid rafts*, responsables de la activación y señalización de TLR4 e IL-1RI.

Aunque estos resultados, y los proyectos futuros, puedan contribuir al mejor entendimiento de la neurotoxicidad del alcohol, también podrían proporcionarnos nuevos tratamientos y estrategias de intervención clínica para la restauración del daño inflamatorio inducido por el alcohol en cerebro.

6. CONCLUSIONES

Capítulo 6: CONCLUSIONES

1.- El consumo crónico de alcohol induce daño inflamatorio en el hígado, a través de una sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias, que son liberadas en parte, por el hepatocito, y posterior estimulación de las cascadas de señalización intracelular asociadas a la citoquina pro-inflamatoria IL-1b y a la endotoxina LPS.

2.- El tratamiento prolongado de etanol en la rata induce, tanto en corteza cerebral como en astrocitos corticales en cultivo, un aumento en los niveles de citoquinas y en la expresión de mediadores inflamatorios, tales como iNOS y COX-2. Estos efectos se correlacionan con una estimulación de las cascadas de señalización asociadas a la activación de los receptores TLR4 e IL-1RI, y con un aumento en la muerte neural por apoptosis.

3.- La inducción de mediadores inflamatorios (iNOS y COX-2) producida por el etanol, está regulada a nivel transcripcional, ya que la inhibición del factor de transcripción NF-kB, provoca un bloqueo en la activación de estos mediadores inflamatorios en astrocitos

4.- Demostramos que los receptores TLR4 e IL-1RI están implicados en los efectos inflamatorios producidos por el etanol en astrocitos, ya que cuando bloqueamos a estos receptores con anticuerpos específicos se elimina, tanto la estimulación de su señalización, incluyendo la activación de los factores de transcripción NF-kB y AP-1, como la

liberación de mediadores inflamatorios y la muerte celular por apoptosis.

5.- La estimulación de los astrocitos, tanto con etanol, como con IL-1b o LPS, induce una traslocación de los receptores TLR4 e IL-1RI y de las quinasas que intervienen en su señalización, a zonas de la membrana ricas en caveolina-1, proteína asociada a los *lipid rafts* caveolae. Proponemos, que el etanol, a bajas concentraciones, podría activar a los receptores TLR4 e IL-1RI mediante su interacción con los microdominios de membrana *lipid rafts*, induciendo la agregación y reclutamiento de estos receptores en caveolas, lo que conllevaría a un aumento en su respuesta y señalización.

6.- Estudios mediante microscopia confocal indican que el tratamiento con IL-1b o con etanol induce la internalización y señalización del receptor IL-1RI, a través de la asociación de vesículas caveolares y caveosomas a la membrana de endosomas de gran tamaño dependientes de clatrina.

7.- Los resultados sugieren que el etanol podría causar daño inflamatorio en hígado y en cerebro, mediante la activación de los receptores TLR4 e IL-1RI, y abre nuevas perspectivas terapéuticas en las patologías hepática y cerebral asociadas al consumo de alcohol.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 7: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi, J., Mizoi, Y., Fukunaga, T., Ogawa, Y., Ueno, Y. and Imamichi, H. (1991) Degrees of alcohol intoxication in 117 hospitalized cases. *J Stud Alcohol*, **52**, 448-453.
- Adachi, Y., Moore, L.E., Bradford, B.U., Gao, W. and Thurman, R.G. (1995) Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*, **108**, 218-224.
- Akira, S. and Sato, S. (2003) Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis*, **35**, 555-562.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511.
- Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A. and Rasenick, M.M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 128-140.
- Aloisi, F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*, **36**, 165-179.
- Alonso, M.A. and Millan, J. (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci*, **114**, 3957-3965.
- Andre, R., Lerouet, D., Kimber, I., Pinteaux, E. and Rothwell, N.J. (2005) Regulation of expression of the novel IL-1 receptor family members in the mouse brain. *J Neurochem*, **95**, 324-330.
- Arteel, G.E. (2003) Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. *Gastroenterology*, **124**, 778-790.
- Barbe, E., Damoiseaux, J.G., Dopp, E.A. and Dijkstra, C.D. (1990) Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiology*, **182**, 88-99.
- Benveniste, E.N. (1992) Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol*, **52**, 106-153.
- Benveniste, E.N. (1998) Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*, **9**, 259-275.
- Berglof, E., Andre, R., Renshaw, B.R., Allan, S.M., Lawrence, C.B., Rothwell, N.J. and Pinteaux, E. (2003) IL-1Rrp2 expression and IL-1F9 (IL-1H1) actions in brain cells. *J Neuroimmunol*, **139**, 36-43.
- Blanco, A.M., Pascual, M., Valles, S.L. and Guerri, C. (2004) Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport*, **15**, 681-685.

- Blanco, A.M., Valles, S.L., Pascual, M. and Guerri, C. (2005) Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol*, **175**, 6893-6899.
- Blondell, R.D., Frierson, R.L. and Lippmann, S.B. (1996) Alcoholism. Taking a preventive, public health approach. *Postgrad Med*, **100**, 69-72, 78-80.
- Bode, C. and Bode, J.C. (2005) Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol? *Alcohol Clin Exp Res*, **29**, 166S-171S.
- Bode, C., Kugler, V. and Bode, J.C. (1987) Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol*, **4**, 8-14.
- Bol, G.F., Jurrmann, N. and Brigelius-Flohe, R. (2005) Cellular trafficking of the IL-1RI-associated kinase-1 requires intact kinase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 279-287.
- Bowman, C.C., Rasley, A., Tranguch, S.L. and Marriott, I. (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*, **43**, 281-291.
- Brissoni, B., Agostini, L., Kropf, M., Martinon, F., Swoboda, V., Lippens, S., Everett, H., Aebi, N., Janssens, S., Meylan, E., Felberbaum-Corti, M., Hirling, H., Gruenberg, J., Tschopp, J. and Burns, K. (2006) Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Curr Biol*, **16**, 2265-2270.
- Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C. and Wakeham, D.E. (2001) Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 517-568.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. and van Noort, J.M. (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, **61**, 1013-1021.
- Bunout, D., Munoz, C., Lopez, M., de la Maza, M.P., Schlesinger, L., Hirsch, S. and Pettermann, M. (1996) Interleukin 1 and tumor necrosis factor in obese alcoholics compared with normal-weight patients. *Am J Clin Nutr*, **63**, 373-376.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R. and Tschopp, J. (2003) Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med*, **197**, 263-268.

- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M.L., Hoffmann, E., Resch, K. and Kracht, M. (2004) Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem*, **279**, 55633-55643.
- Campbell, A. (2004) Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Ann N Y Acad Sci*, **1035**, 117-132.
- Cao, Q., Mak, K.M. and Lieber, C.S. (2002) Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases LPS-induced TNF- α generation in Kupffer cells of ethanol-fed rats: respective roles of MAPKs and NF- κ B. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 849-853.
- Cao, Z., Henzel, W.J. and Gao, X. (1996a) IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, **271**, 1128-1131.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D.V. (1996b) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*, **383**, 443-446.
- Carozzi, A.J., Ikonen, E., Lindsay, M.R. and Parton, R.G. (2000) Role of cholesterol in developing T tubules: analogous mechanisms for T tubule and caveolae biogenesis. *Traffic*, **1**, 326-341.
- Carpentier, P.A., Begolka, W.S., Olson, J.K., Elhofy, A., Karpus, W.J. and Miller, S.D. (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, **49**, 360-374.
- Chang, W.J., Ying, Y.S., Rothberg, K.G., Hooper, N.M., Turner, A.J., Gambliel, H.A., De Gunzburg, J., Mumby, S.M., Gilman, A.G. and Anderson, R.G. (1994) Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol*, **126**, 127-138.
- Chaudhary, A., Fresquez, T.M. and Naranjo, M.J. (2007) Tyrosine kinase Syk associates with toll-like receptor 4 and regulates signaling in human monocytic cells. *Immunol Cell Biol*.
- Chen, C.P., Kuhn, P., Chaturvedi, K., Boyadjieva, N. and Sarkar, D.K. (2006) Ethanol induces apoptotic death of developing beta-endorphin neurons via suppression of cyclic adenosine monophosphate production and activation of transforming growth factor-beta1-linked apoptotic signaling. *Mol Pharmacol*, **69**, 706-717.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V.I., Capua, M.R., Takei, K., Butler, M.H., Di Fiore, P.P. and De Camilli, P. (1998) Epsin is an EH-domain-binding

- protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature*, **394**, 793-797.
- Chen, H.Q., Tannous, M., Veluthakal, R., Amin, R. and Kowluru, A. (2003) Novel roles for palmitoylation of Ras in IL-1 beta-induced nitric oxide release and caspase 3 activation in insulin-secreting beta cells. *Biochem Pharmacol*, **66**, 1681-1694.
- Chen, J.C., Ho, F.M., Pei-Dawn Lee, C., Chen, C.P., Jeng, K.C., Hsu, H.B., Lee, S.T., Wen Tung, W. and Lin, W.W. (2005) Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IkappaB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol*, **521**, 9-20.
- Chiou, J.S., Ma, S.M., Kamaya, H. and Ueda, I. (1990) Anesthesia cutoff phenomenon: interfacial hydrogen bonding. *Science*, **248**, 583-585.
- Chow, J.C., Young, D.W., Golenbock, D.T., Christ, W.J. and Gusovsky, F. (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*, **274**, 10689-10692.
- Chowdhury, T.T., Bader, D.L. and Lee, D.A. (2006) Dynamic compression counteracts IL-1beta induced iNOS and COX-2 activity by human chondrocytes cultured in agarose constructs. *Biorheology*, **43**, 413-429.
- Collins, M.A., Zou, J.Y. and Neafsey, E.J. (1998) Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *Faseb J* **12**, 221-230.
- Cook, R.T. (1998) Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 1927-1942.
- Crews, F.T., Bechara, R., Brown, L.A., Guidot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M. and Zou, J. (2006) Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, **30**, 720-730.
- Crews, F.T., Braun, C.J., Hoplight, B., Switzer, R.C., 3rd and Knapp, D.J. (2000) Binge ethanol consumption causes differential brain damage in young adolescent rats compared with adult rats. *Alcohol Clin Exp Res*, **24**, 1712-1723.
- Dai, Q., Zhang, J. and Pruetz, S.B. (2005) Ethanol alters cellular activation and CD14 partitioning in lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 37-42.

- Dalgleish, A.G. and O'Byrne, K. (2006) Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, **130**, 1-38.
- Davis, C.N., Tabarean, I., Gaidarova, S., Behrens, M.M. and Bartfai, T. (2006) IL-1beta induces a MyD88-dependent and ceramide-mediated activation of Src in anterior hypothalamic neurons. *J Neurochem*, **98**, 1379-1389.
- Davis, R.L. and Syapin, P.J. (2004) Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells. *Neurosci Lett*, **371**, 128-132.
- Deaciuc, I.V. (1997) Alcohol and cytokine networks. *Alcohol*, **14**, 421-430.
- Deaciuc, I.V., Nikolova-Karakashian, M., Fortunato, F., Lee, E.Y., Hill, D.B. and McClain, C.J. (2000) Apoptosis and dysregulated ceramide metabolism in a murine model of alcohol-enhanced lipopolysaccharide hepatotoxicity. *Alcohol Clin Exp Res*, **24**, 1557-1565.
- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388**, 548-554.
- Dietrich, P.Y., Walker, P.R. and Saas, P. (2003) Death receptors on reactive astrocytes: a key role in the fine tuning of brain inflammation? *Neurology*, **60**, 548-554.
- Dinareello, C.A. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest*, **118**, 503-508.
- Dizon, M.L., Brown, L.A. and Black, S.M. (2004) Brain nitric oxide synthase levels increase in response to antenatal ethanol exposure. *Alcohol Alcohol*, **39**, 101-105.
- Dolganiuc, A., Bakis, G., Kodys, K., Mandrekar, P. and Szabo, G. (2006) Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcohol Clin Exp Res*, **30**, 76-85.
- Dong, C., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*, **20**, 55-72.
- Dong, Y. and Benveniste, E.N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*, **36**, 180-190.
- Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. and Cheng, G. (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*, **17**, 251-263.
- Dunne, A. and O'Neill, L.A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*, **2003**, re3.

- Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V. and Simons, K. (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J*, **12**, 1597-1605.
- Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H.W., Tzeng, S.J. and Pierce, S.K. (2003) Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*, **21**, 457-481.
- Eddin, M. (2001) Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol*, **11**, 492-496.
- Ehrlich, L.C., Peterson, P.K. and Hu, S. (1999) Interleukin (IL)-1beta-mediated apoptosis of human astrocytes. *Neuroreport*, **10**, 1849-1852.
- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, **58**, 39-46.
- Engelman, J.A., Chu, C., Lin, A., Jo, H., Ikezu, T., Okamoto, T., Kohtz, D.S. and Lisanti, M.P. (1998) Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Lett*, **428**, 205-211.
- Enomoto, N., Ikejima, K., Bradford, B., Rivera, C., Kono, H., Brenner, D.A. and Thurman, R.G. (1998) Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology*, **115**, 443-451.
- Esen, N., Tanga, F.Y., DeLeo, J.A. and Kielian, T. (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J Neurochem*, **88**, 746-758.
- Fadda, F. and Rossetti, Z.L. (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, **56**, 385-431.
- Fakoya, F.A. and Caxton-Martins, E.A. (2006) Neocortical neurodegeneration in young adult Wistar rats prenatally exposed to ethanol. *Neurotoxicol Teratol*, **28**, 229-237.
- Faour, W.H., He, Y., He, Q.W., de Ladurantaye, M., Quintero, M., Mancini, A. and Di Battista, J.A. (2001) Prostaglandin E(2) regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 mRNA through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in interleukin-1 beta-treated human synovial fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 31720-31731.
- Faour, W.H., Mancini, A., He, Q.W. and Di Battista, J.A. (2003) T-cell-derived interleukin-17 regulates the level and stability of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA through restricted activation of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade: role of distal sequences in the 3'-

- untranslated region of COX-2 mRNA. *J Biol Chem*, **278**, 26897-26907.
- Fernandez-Checa, J.C. (2003) Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet. *Ann Hepatol*, **2**, 69-75.
- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2001) Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*, **291**, 1051-1055.
- Fubini, B. and Hubbard, A. (2003) Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1507-1516.
- Fujimoto, L.M., Roth, R., Heuser, J.E. and Schmid, S.L. (2000) Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, **1**, 161-171.
- Fukui, H., Brauner, B., Bode, J.C. and Bode, C. (1991) Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol*, **12**, 162-169.
- Giovannini, M.G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Pepeu, G. and Casamenti, F. (2003) Experimental brain inflammation and neurodegeneration as model of Alzheimer's disease: protective effects of selective COX-2 inhibitors. *Int J Immunopathol Pharmacol*, **16**, 31-40.
- Gohda, J., Matsumura, T. and Inoue, J. (2004) Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol*, **173**, 2913-2917.
- Goral, J., Choudhry, M.A. and Kovacs, E.J. (2004) Acute ethanol exposure inhibits macrophage IL-6 production: role of p38 and ERK1/2 MAPK. *J Leukoc Biol*, **75**, 553-559.
- Griffin, B.D. and Moynagh, P.N. (2006) Persistent interleukin-1beta signaling causes long term activation of NFkappaB in a promoter-specific manner in human glial cells. *J Biol Chem*, **281**, 10316-10326.
- Griffiths, G., Back, R. and Marsh, M. (1989) A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol*, **109**, 2703-2720.
- Guasch, R.M., Tomas, M., Minambres, R., Valles, S., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (2003) RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the

- actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res*, **72**, 487-502.
- Guerri, C. and Renau-Piqueras, J. (1997) Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol Neurobiol*, **15**, 65-81.
- Guerri, C., Saez, R., Sancho-Tello, M., Martin de Aquilera, E. and Renau-Piqueras, J. (1990) Ethanol alters astrocyte development: a study of critical periods using primary cultures. *Neurochem Res*, **15**, 559-565.
- Gutierrez-Venegas, G., Kawasaki-Cardenas, P., Cruz-Arroyo, S.R., Perez-Garzon, M. and Maldonado-Frias, S. (2006) Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide stimulates the phosphorylation of p44 and p42 MAP kinases through CD14 and TLR-4 receptor activation in human gingival fibroblasts. *Life Sci*, **78**, 2577-2583.
- Hanisch, U.K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, **40**, 140-155.
- Harder, T. and Engelhardt, K.R. (2004) Membrane domains in lymphocytes - from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic*, **5**, 265-275.
- Harder, T. and van Meer, G. (2003) Lipid-based membrane domains: physics meets immunology. *Traffic*, **4**, 812-820.
- Harper, C., Dixon, G., Sheedy, D. and Garrick, T. (2003) Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **27**, 951-961.
- Heales, S.J., Bolanos, J.P., Stewart, V.C., Brookes, P.S., Land, J.M. and Clark, J.B. (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*, **1410**, 215-228.
- Heerklotz, H. (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J*, **83**, 2693-2701.
- Hill, D.B., D'Souza, N.B., Lee, E.Y., Burikhanov, R., Deaciuc, I.V. and de Villiers, W.J. (2002) A role for interleukin-10 in alcohol-induced liver sensitization to bacterial lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res*, **26**, 74-82.
- Hirsch, E.C., Breider, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A. and Michel, P.P. (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **991**, 214-228.
- Hoek, J.B. and Pastorino, J.G. (2002) Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*, **27**, 63-68.

- Honchel, R., Ray, M.B., Marsano, L., Cohen, D., Lee, E., Shedlofsky, S. and McClain, C.J. (1992) Tumor necrosis factor in alcohol enhanced endotoxin liver injury. *Alcohol Clin Exp Res*, **16**, 665-669.
- Hua, L.L., Zhao, M.L., Cosenza, M., Kim, M.O., Huang, H., Tanowitz, H.B., Brosnan, C.F. and Lee, S.C. (2002) Role of mitogen-activated protein kinases in inducible nitric oxide synthase and TNF α expression in human fetal astrocytes. *J Neuroimmunol*, **126**, 180-189.
- Huang, J., Gao, X., Li, S. and Cao, Z. (1997) Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12829-12832.
- Hunot, S. and Hirsch, E.C. (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, **53 Suppl 3** S49-58; discussion S58-60.
- Hwang, D., Jang, B.C., Yu, G. and Boudreau, M. (1997) Expression of mitogen-inducible cyclooxygenase induced by lipopolysaccharide: mediation through both mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB signaling pathways in macrophages. *Biochem Pharmacol*, **54**, 87-96.
- Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K. and Nakayama, K.I. (2002) Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem*, **277**, 14355-14358.
- Jang, M.H., Shin, M.C., Kim, Y.J., Kim, C.J., Chung, J.H., Seo, J.C., Kim, E.H., Kim, K.Y., Lee, C.Y. and Kim, K.M. (2003) Protective effect of *Acanthopanax senticosus* against ethanol-induced apoptosis of human neuroblastoma cell line SK-N-MC. *Am J Chin Med*, **31**, 379-388.
- Jarvelainen, H.A., Fang, C., Ingelman-Sundberg, M. and Lindros, K.O. (1999) Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology*, **29**, 1503-1510.
- Jarvelainen, H.A., Orpana, A., Perola, M., Savolainen, V.T., Karhunen, P.J. and Lindros, K.O. (2001) Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene as a risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*, **33**, 1148-1153.
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K. and Li, X. (2002) Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol*, **22**, 7158-7167.

- John, G.R., Chen, L., Riviaccio, M.A., Melendez-Vasquez, C.V., Hartley, A. and Brosnan, C.F. (2004) Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci*, **24**, 2837-2845.
- John, G.R., Lee, S.C., Song, X., Riviaccio, M. and Brosnan, C.F. (2005) IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia*, **49**, 161-176.
- John, G.R., Simpson, J.E., Woodroffe, M.N., Lee, S.C. and Brosnan, C.F. (2001) Extracellular nucleotides differentially regulate interleukin-1beta signaling in primary human astrocytes: implications for inflammatory gene expression. *J Neurosci*, **21**, 4134-4142.
- Jokelainen, K., Reinke, L.A. and Nanji, A.A. (2001) Nf-kappab activation is associated with free radical generation and endotoxemia and precedes pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease. *Cytokine*, **16**, 36-39.
- Kaiser, W.J. and Offermann, M.K. (2005) Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol*, **174**, 4942-4952.
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **270**, 16483-16486.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. and Helenius, A. (1989) Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **109**, 2721-2729.
- Kasamatsu, H. and Nakanishi, A. (1998) How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu Rev Microbiol*, **52**, 627-686.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, **11**, 115-122.
- Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A. and Altevogt, P. (2006) Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*, **107**, 102-108.
- Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C.J., Logan, G. and Allen, J.I. (1991) Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology*, **13**, 267-276.
- Kishore, R., Hill, J.R., McMullen, M.R., Frenkel, J. and Nagy, L.E. (2002) ERK1/2 and Egr-1 contribute to increased TNF-alpha production in rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**, G6-15.

- Knapp, D.J. and Crews, F.T. (1999) Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res*, **23**, 633-643.
- Koedel, U., Rupprecht, T., Angele, B., Heesemann, J., Wagner, H., Pfister, H.W. and Kirschning, C.J. (2004) MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain*, **127**, 1437-1445.
- Kokubo, H., Helms, J.B., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Horikoshi, Y. and Yamaguchi, H. (2003) Ultrastructural localization of flotillin-1 to cholesterol-rich membrane microdomains, rafts, in rat brain tissue. *Brain Res*, **965**, 83-90.
- Kolb, J.P., Paul-Eugene, N., Damais, C., Yamaoka, K., Drapier, J.C. and Dugas, B. (1994) Interleukin-4 stimulates cGMP production by IFN-gamma-activated human monocytes. Involvement of the nitric oxide synthase pathway. *J Biol Chem*, **269**, 9811-9816.
- Konstantinopoulos, P.A., Vantoros, G.P., Sotiropoulou-Bonikou, G., Kominea, A. and Papavassiliou, A.G. (2006) NF-kappaB/PPARgamma and/or AP-1/PPARgamma 'on/off' switches and induction of CBP in colon adenocarcinomas: correlation with COX-2 expression. *Int J Colorectal Dis*.
- Kopp, E. and Medzhitov, R. (2003) Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, **15**, 396-401.
- Korbo, L. (1999) Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, **23**, 164-168.
- Koteish, A., Yang, S., Lin, H., Huang, X. and Diehl, A.M. (2002) Chronic ethanol exposure potentiates lipopolysaccharide liver injury despite inhibiting Jun N-terminal kinase and caspase 3 activation. *J Biol Chem*, **277**, 13037-13044.
- Kracht, M. and Saklatvala, J. (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine*, **20**, 91-106.
- Kril, J.J. and Halliday, G.M. (1999) Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? *Prog Neurobiol*, **58**, 381-387.
- Kril, J.J., Halliday, G.M., Svoboda, M.D. and Cartwright, H. (1997) The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience*, **79**, 983-998.
- Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J. and Finberg, R.W. (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and

- CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, **1**, 398-401.
- Laflamme, N., Echchannaoui, H., Landmann, R. and Rivest, S. (2003) Cooperation between toll-like receptor 2 and 4 in the brain of mice challenged with cell wall components derived from gram-negative and gram-positive bacteria. *Eur J Immunol*, **33**, 1127-1138.
- Lalli, G. and Schiavo, G. (2002) Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75NTR. *J Cell Biol*, **156**, 233-239.
- Lancaster, F.E. (1992) Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, **16**, 539-541.
- Lands, W.E. (1995) Cellular signals in alcohol-induced liver injury: a review. *Alcohol Clin Exp Res*, **19**, 928-938.
- Laude, A.J. and Prior, I.A. (2004) Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol*, **21**, 193-205.
- Le Moine, O., Quertinmont, E., Gulbis, B. and Deviere, J. (1999) Blunted anti-inflammatory response to adenosine in alcoholic cirrhosis. *J Hepatol*, **31**, 457-463.
- Le Roy, C. and Wrana, J.L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 112-126.
- Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J. and Maniatis, T. (1997) Activation of the I κ B kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*, **88**, 213-222.
- Lee, Y.J. and Shukla, S.D. (2005) Pro- and anti-apoptotic roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in ethanol and acetaldehyde exposed rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*, **508**, 31-45.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J. and Vartanian, T. (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8514-8519.
- Levine, S.J. (2004) Mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Immunol*, **173**, 5343-5348.
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E.J. and Wesche, H. (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5567-5572.
- Lieber, C.S. (2004) Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, **34**, 9-19.

- Lieber, C.S. and DeCarli, L.M. (1994) Animal models of chronic ethanol toxicity. *Methods Enzymol*, **233**, 585-594.
- Ling, L., Cao, Z. and Goeddel, D.V. (1998) NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3792-3797.
- Little, A.R. and O'Callaghan, J.P. (2001) Astroglialosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines? *Neurotoxicology*, **22**, 607-618.
- Lopez-Casas, P.P. and del Mazo, J. (2003) Regulation of flotillin-1 in the establishment of NIH-3T3 cell-cell interactions. *FEBS Lett*, **555**, 223-228.
- Louis, H., Le Moine, O., Goldman, M. and Deviere, J. (2003) Modulation of liver injury by interleukin-10. *Acta Gastroenterol Belg*, **66**, 7-14.
- Lucas, S.M., Rothwell, N.J. and Gibson, R.M. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**, S232-240.
- Luo, J., Lindstrom, C.L., Donahue, A. and Miller, M.W. (2001) Differential effects of ethanol on the expression of cyclo-oxygenase in cultured cortical astrocytes and neurons. *J Neurochem*, **76**, 1354-1363.
- MacGillivray, M.K., Cruz, T.F. and McCulloch, C.A. (2000) The recruitment of the interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase (IRAK) into focal adhesion complexes is required for IL-1beta -induced ERK activation. *J Biol Chem*, **275**, 23509-23515.
- MacGregor, R.R. (1986) Alcohol and immune defense. *Jama*, **256**, 1474-1479.
- Mack, C.L., Vanderlugt-Castaneda, C.L., Neville, K.L. and Miller, S.D. (2003) Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, **144**, 68-79.
- Magee, T., Pirinen, N., Adler, J., Pagakis, S.N. and Parmryd, I. (2002) Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. *Biol Res*, **35**, 127-131.
- Marcolini, J., Nguyen, M. and Ericsson, C. (2002) Klebsiella pneumoniae brain abscess in a Taiwanese adult. *J Infect*, **44**, 205-210.
- Marcus, J.S., Karackattu, S.L., Fleegal, M.A. and Sumners, C. (2003) Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB. *Glia*, **41**, 152-160.
- Marks-Konczalik, J., Chu, S.C. and Moss, J. (1998) Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase

- gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J Biol Chem*, **273**, 22201-22208.
- Martin, M.U. and Wesche, H. (2002) Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 265-280.
- Mathurin, P., Deng, Q.G., Keshavarzian, A., Choudhary, S., Holmes, E.W. and Tsukamoto, H. (2000) Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology*, **32**, 1008-1017.
- Matko, J. and Szollosi, J. (2002) Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio-temporally coordinated? *Immunol Lett*, **82**, 3-15.
- McClain, C.J., Barve, S., Deaciuc, I., Kugelmas, M. and Hill, D. (1999) Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis*, **19**, 205-219.
- McClain, C.J. and Cohen, D.A. (1989) Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. *Hepatology*, **9**, 349-351.
- McIntyre, K.W., Stepan, G.J., Kolinsky, K.D., Benjamin, W.R., Plocinski, J.M., Kaffka, K.L., Campen, C.A., Chizzonite, R.A. and Kilian, P.L. (1991) Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. *J Exp Med*, **173**, 931-939.
- Means, T.K., Pavlovich, R.P., Roca, D., Vermeulen, M.W. and Fenton, M.J. (2000) Activation of TNF-alpha transcription utilizes distinct MAP kinase pathways in different macrophage populations. *J Leukoc Biol*, **67**, 885-893.
- Megias, L., Guerri, C., Fornas, E., Azorin, I., Bendala, E., Sancho-Tello, M., Duran, J.M., Tomas, M., Gomez-Lechon, M.J. and Renau-Piqueras, J. (2000) Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. *Int J Dev Biol*, **44**, 209-221.
- Mercurio, F., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Young, D.B., Li, J.W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. and Manning, A.M. (1999) I kappa B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol*, **19**, 1526-1538.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B.L., Li, J., Young, D.B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A. (1997)

- IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, **278**, 860-866.
- Merrill, J.E. and Benveniste, E.N. (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci*, **19**, 331-338.
- Miguel-Hidalgo, J.J., Wei, J., Andrew, M., Overholser, J.C., Jurjus, G., Stockmeier, C.A. and Rajkowska, G. (2002) Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biol Psychiatry*, **52**, 1121-1133.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M. and Eisdorfer, C. (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, **202**, 13-23.
- Minambres, R., Guasch, R.M., Perez-Arago, A. and Guerri, C. (2006) The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci*, **119**, 271-282.
- Minana, J.B., Gomez-Cambronero, L., Lloret, A., Pallardo, F.V., Del Olmo, J., Escudero, A., Rodrigo, J.M., Pelliin, A., Vina, J.R., Vina, J. and Sastre, J. (2002) Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*, **35**, 1205-1214.
- Molina, P.E., McClain, C., Valla, D., Guidot, D., Diehl, A.M., Lang, C.H. and Neuman, M. (2002) Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*, **26**, 120-128.
- Montoliu, C., Sancho-Tello, M., Azorin, I., Burgal, M., Valles, S., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (1995) Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem*, **65**, 2561-2570.
- Montoliu, C., Valles, S., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (1994) Ethanol-induced oxygen radical formation and lipid peroxidation in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *J Neurochem*, **63**, 1855-1862.
- Mori, C. and Natsuki, R. (1996) [Effect of ethanol on expression of nitric oxide synthases in the cerebral culture cells from chick embryo]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **107**, 197-203.
- Moynagh, P.N. (2005) The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat*, **207**, 265-269.
- Mrak, R.E. and Griffin, W.S. (2005) Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **8**, 369-375.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.

- Naassila, M., Roux, F., Beauge, F. and Daoust, M. (1996) Ethanol potentiates lipopolysaccharide- or interleukin-1 beta-induced nitric oxide generation in RBE4 cells. *Eur J Pharmacol*, **313**, 273-277.
- Nagy, L.E. (2003) Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 882-890.
- Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H. and Okumura, K. (1998) Differential regulation of I κ B kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3537-3542.
- Nanji, A.A., Jokelainen, K., Rahemtulla, A., Miao, L., Fogt, F., Matsumoto, H., Tahan, S.R. and Su, G.L. (1999) Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology*, **30**, 934-943.
- Nanji, A.A., Jokelainen, K., Tipoe, G.L., Rahemtulla, A., Thomas, P. and Dannenberg, A.J. (2003) Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **284**, G321-327.
- Nanji, A.A., Khettry, U., Sadrzadeh, S.M. and Yamanaka, T. (1993) Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E₂, leukotriene B₄, and thromboxane B₂. *Am J Pathol*, **142**, 367-373.
- Ng, D.C., Long, C.S. and Bogoyevitch, M.A. (2001) A role for the extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases in interleukin-1 beta-stimulated delayed signal transducer and activator of transcription 3 activation, atrial natriuretic factor expression, and cardiac myocyte morphology. *J Biol Chem*, **276**, 29490-29498.
- Nichols, B.J. (2003) GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits. *Curr Biol*, **13**, 686-690.
- Nichols, B.J., Kenworthy, A.K., Polishchuk, R.S., Lodge, R., Roberts, T.H., Hirschberg, K., Phair, R.D. and Lippincott-Schwartz, J. (2001) Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J Cell Biol*, **153**, 529-541.
- Nichols, B.J. and Lippincott-Schwartz, J. (2001) Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*, **11**, 406-412.
- Niwa, K., Inanami, O., Yamamori, T., Ohta, T., Hamasu, T. and Kuwabara, M. (2003) Redox regulation of PI3K/Akt and p53 in bovine aortic

- endothelial cells exposed to hydrogen peroxide. *Antioxid Redox Signal*, **5**, 713-722.
- O'Banion, M.K. (1999) Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, **13**, 45-82.
- Obernier, J.A., Bouldin, T.W. and Crews, F.T. (2002) Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res*, **26**, 547-557.
- Ohkita, M., Takaoka, M., Shiota, Y., Nojiri, R., Sugii, M. and Matsumura, Y. (2002) A nuclear factor-kappaB inhibitor BAY 11-7082 suppresses endothelin-1 production in cultured vascular endothelial cells. *Jpn J Pharmacol*, **89**, 81-84.
- Olsson, S. and Sundler, R. (2006) The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol*, **43**, 607-612.
- O'Neill, L.A. and Dinarello, C.A. (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*, **21**, 206-209.
- Owens, T. (2003) The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. *Curr Opin Neurol*, **16**, 259-265.
- Owens, T., Babcock, A.A., Millward, J.M. and Toft-Hansen, H. (2005) Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res Brain Res Rev*, **48**, 178-184.
- Parton, R.G. and Richards, A.A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, **4**, 724-738.
- Pascual, G. and Glass, C.K. (2006) Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab*, **17**, 321-327.
- Pascual, M., Blanco, A.M., Cauli, O., Minarro, J. and Guerri, C. (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci*, **25**, 541-550.
- Pascual, M., Climent, E. and Guerri, C. (2001) BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport*, **12**, 2673-2677.
- Pascual, M., Valles, S.L., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (2003) Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *J Neurochem*, **87**, 1535-1545.

- Patel, H.C., Boutin, H. and Allan, S.M. (2003) Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, **992**, 39-47.
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. and Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, **118**, 767-780.
- Pelkmans, L. and Helenius, A. (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic*, **3**, 311-320.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, **3**, 473-483.
- Peoples, R.W., Li, C. and Weight, F.F. (1996) Lipid vs protein theories of alcohol action in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **36**, 185-201.
- Perry, V.H., Cunningham, C. and Boche, D. (2002) Atypical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr Opin Neurol*, **15**, 349-354.
- Pietiainen, V.M., Marjomaki, V., Heino, J. and Hyypia, T. (2005) Viral entry, lipid rafts and caveosomes. *Ann Med*, **37**, 394-403.
- Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, **44**, 655-667.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282**, 2085-2088.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K. and Antel, J.P. (2001) Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*, **36**, 145-155.
- Pruett, S.B., Schwab, C., Zheng, Q. and Fan, R. (2004) Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. *J Immunol*, **173**, 2715-2724.
- Rajendran, L. and Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci*, **118**, 1099-1102.
- Renau-Piqueras, J., Guasch, R., Azorin, I., Segui, J.M. and Guerri, C. (1997) Prenatal alcohol exposure affects galactosyltransferase activity and glycoconjugates in the Golgi apparatus of fetal rat hepatocytes. *Hepatology*, **25**, 343-350.

- Reuter, A., Binkle, U., Stuermer, C.A. and Plattner, H. (2004) PrPc and reggies/flotillins are contained in and released via lipid-rich vesicles in Jurkat T cells. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2092-2099.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A. and Gage, F.H. (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, **20**, 570-577.
- Rivest, S. (2003) Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun*, **17**, 13-19.
- Rothwell, N.J. and Luheshi, G.N. (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*, **23**, 618-625.
- Ruiz, M., Ewig, S., Torres, A., Arancibia, F., Marco, F., Mensa, J., Sanchez, M. and Martinez, J.A. (1999) Severe community-acquired pneumonia. Risk factors and follow-up epidemiology. *Am J Respir Crit Care Med*, **160**, 923-929.
- Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z.L., Casanova, J.E. and Lisanti, M.P. (1994) In vitro phosphorylation of caveolin-rich membrane domains: identification of an associated serine kinase activity as a casein kinase II-like enzyme. *Oncogene*, **9**, 2589-2595.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M.P. (1993) Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol*, **122**, 789-807.
- Schnitzer, J.E., Oh, P. and McIntosh, D.P. (1996) Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science*, **274**, 239-242.
- Shih, C.L., Chi, S.I., Chiu, T.H., Sun, G.Y. and Lin, T.N. (2001) Ethanol effects on nitric oxide production in cerebral pial cultures. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 612-618.
- Shimada, S., Yamauchi, M. and Toda, G. (1993) Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl*, **1B**, 47-51.
- Siler-Marsiglio, K.I., Madorsky, I., Pan, Q., Paiva, M., Neeley, A.W., Shaw, G. and Heaton, M.B. (2006) Effects of acute ethanol exposure on regulatory mechanisms of Bcl-2-associated apoptosis promoter, bad, in neonatal rat cerebellum: differential effects during vulnerable and resistant developmental periods. *Alcohol Clin Exp Res*, **30**, 1031-1038.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.

- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Simonyi, A., Woods, D., Sun, A.Y. and Sun, G.Y. (2002) Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res*, **26**, 352-357.
- Singh, R., Wang, B., Shirvaikar, A., Khan, S., Kamat, S., Schelling, J.R., Konieczkowski, M. and Sedor, J.R. (1999) The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest*, **103**, 1561-1570.
- Stoeck, K., Bodemer, M. and Zerr, I. (2006) Pro- and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuroimmunol*, **172**, 175-181.
- Sugden, P.H. and Clerk, A. (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*, **9**, 337-351.
- Sun, A.Y., Ingelman-Sundberg, M., Neve, E., Matsumoto, H., Nishitani, Y., Minowa, Y., Fukui, Y., Bailey, S.M., Patel, V.B., Cunningham, C.C., Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Popov, P., Malbohan, I., Janebova, M., Nesper, K. and Sun, G.Y. (2001) Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 237S-243S.
- Syapin, P.J. (1998) Alcohol and nitric oxide production by cells of the brain. *Alcohol*, **16**, 159-165.
- Syapin, P.J., Militante, J.D., Garrett, D.K. and Ren, L. (2001) Cytokine-induced iNOS expression in C6 glial cells: transcriptional inhibition by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther*, **298**, 744-752.
- Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefer-Zerszen, M. (2000) Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **48**, 301-307.
- Tabarean, I.V., Korn, H. and Bartfai, T. (2006) Interleukin-1beta induces hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic and anterior hypothalamic neurons. *Neuroscience*, **141**, 1685-1695.
- Takeda, K. and Akira, S. (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, **16**, 3-9.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, **17**, 1-14.
- Takuma, K., Baba, A. and Matsuda, T. (2004) Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*, **72**, 111-127.

- Tanga, F.Y., Nutile-McMenemy, N. and DeLeo, J.A. (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5856-5861.
- Tedgui, A. and Mallat, Z. (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*, **86**, 515-581.
- Thakur, V., Pritchard, M.T., McMullen, M.R., Wang, Q. and Nagy, L.E. (2006) Chronic ethanol feeding increases activation of NADPH oxidase by lipopolysaccharide in rat Kupffer cells: role of increased reactive oxygen in LPS-stimulated ERK1/2 activation and TNF-alpha production. *J Leukoc Biol*, **79**, 1348-1356.
- Thurman, R.G. (1998) II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol*, **275**, G605-611.
- Tilg, H. and Diehl, A.M. (2000) Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, **343**, 1467-1476.
- Torok, N., Marks, D., Hsiao, K., Oswald, B.J. and McNiven, M.A. (1997) Vesicle movement in rat hepatocytes is reduced by ethanol exposure: alterations in microtubule-based motor enzymes. *Gastroenterology*, **113**, 1938-1948.
- Touzani, O., Boutin, H., Chuquet, J. and Rothwell, N. (1999) Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *J Neuroimmunol*, **100**, 203-215.
- Tran, D., Carpentier, J.L., Sawano, F., Gorden, P. and Orci, L. (1987) Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7957-7961.
- Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T. and Triantafilou, K. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*, **115**, 2603-2611.
- Triantafilou, M., Morath, S., Mackie, A., Hartung, T. and Triantafilou, K. (2004) Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci*, **117**, 4007-4014.
- Triantafilou, M. and Triantafilou, K. (2005) The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res*, **11**, 5-11.
- Tsukamoto, H., Lin, M., Ohata, M., Giulivi, C., French, S.W. and Brittenham, G. (1999) Iron primes hepatic macrophages for NF-kappaB activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol*, **277**, G1240-1250.

- Tsukamoto, H. and Lu, S.C. (2001) Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *Faseb J*, **15**, 1335-1349.
- Tuma, D.J., Casey, C.A. and Sorrell, M.F. (1991a) Chronic ethanol-induced impairments in receptor-mediated endocytosis of insulin in rat hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, **15**, 808-813.
- Tuma, D.J., Casey, C.A. and Sorrell, M.F. (1991b) Effects of alcohol on hepatic protein metabolism and trafficking. *Alcohol Alcohol Suppl*, **1**, 297-303.
- Tuma, D.J., Toderò, S.L., Barak-Bernhagen, M. and Sorrell, M.F. (1996) Effects of chronic ethanol administration on the endocytosis of cytokines by rat hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, **20**, 579-583.
- Tuosto, L., Parolini, I., Schroder, S., Sargiacomo, M., Lanzavecchia, A. and Viola, A. (2001) Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol*, **31**, 345-349.
- Uesugi, T., Froh, M., Arteel, G.E., Bradford, B.U., Gabele, E., Wheeler, M.D. and Thurman, R.G. (2001a) Delivery of IkappaB superrepressor gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Hepatology*, **34**, 1149-1157.
- Uesugi, T., Froh, M., Arteel, G.E., Bradford, B.U. and Thurman, R.G. (2001b) Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology*, **34**, 101-108.
- Valles, S.L., Blanco, A.M., Azorin, I., Guasch, R., Pascual, M., Gomez-Lechon, M.J., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (2003) Chronic ethanol consumption enhances interleukin-1-mediated signal transduction in rat liver and in cultured hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, **27**, 1979-1986.
- Valles, S.L., Blanco, A.M., Pascual, M. and Guerri, C. (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol*, **14**, 365-371.
- Vallett, M., Tabatabaie, T., Briscoe, R.J., Baird, T.J., Beatty, W.W., Floyd, R.A. and Gauvin, D.V. (1997) Free radical production during ethanol intoxication, dependence, and withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res*, **21**, 275-285.
- van der Blik, A.M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M. and Schmid, S.L. (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol*, **122**, 553-563.
- Veluthakal, R., Chvyrkova, I., Tannous, M., McDonald, P., Amin, R., Hadden, T., Thurmond, D.C., Quon, M.J. and Kowluru, A. (2005) Essential role

- for membrane lipid rafts in interleukin-1 β -induced nitric oxide release from insulin-secreting cells: potential regulation by caveolin-1+. *Diabetes*, **54**, 2576-2585.
- Villegas, S.N., Njaine, B., Linden, R. and Carri, N.G. (2006) Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol (EtOH) induced B92 glial cell death by both PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Brain Res Bull*, **71**, 116-126.
- Walker, D.G. and Lue, L.F. (2005) Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res*, **81**, 412-425.
- Wang, J.H. and Sun, G.Y. (2001) Ethanol inhibits cytokine-induced iNOS and sPLA2 in immortalized astrocytes: evidence for posttranscriptional site of ethanol action. *J Biomed Sci*, **8**, 126-133.
- Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y. and Holbrook, N.J. (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J*, **333 (Pt 2)**, 291-300.
- Ward, R.J., Zhang, Y., Crichton, R.R., Piret, B., Piette, J. and de Witte, P. (1996) Identification of the nuclear transcription factor NF κ B in rat after in vivo ethanol administration. *FEBS Lett*, **389**, 119-122.
- Weiss, J.M. and Berman, J.W. (1998) Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor β . *J Neuroimmunol*, **91**, 190-197.
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, **7**, 837-847.
- Wheeler, M.D., Kono, H., Rusyn, I., Arteel, G.E., McCarty, D., Samulski, R.J. and Thurman, R.G. (2000) Chronic ethanol increases adeno-associated viral transgene expression in rat liver via oxidant and NF κ B-dependent mechanisms. *Hepatology*, **32**, 1050-1059.
- Wilflingseder, D., Mullauer, B., Schramek, H., Banki, Z., Pruenster, M., Dierich, M.P. and Stoiber, H. (2004) HIV-1-induced migration of monocyte-derived dendritic cells is associated with differential activation of MAPK pathways. *J Immunol*, **173**, 7497-7505.
- Wong, M.L., Bongiorno, P.B., al-Shekhlee, A., Esposito, A., Khatri, P. and Licinio, J. (1996) IL-1 β , IL-1 receptor type I and iNOS gene expression in rat brain vasculature and perivascular areas. *Neuroreport*, **7**, 2445-2448.

- Wu, D., Marko, M., Claycombe, K., Paulson, K.E. and Meydani, S.N. (2003) Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. *J Biol Chem*, **278**, 10983-10992.
- Wu, M., Lee, H., Bellas, R.E., Schauer, S.L., Arsura, M., Katz, D., FitzGerald, M.J., Rothstein, T.L., Sherr, D.H. and Sonenshein, G.E. (1996) Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *Embo J*, **15**, 4682-4690.
- Wyss-Coray, T. and Mucke, L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, **35**, 419-432.
- Yamada, K., Komori, Y., Tanaka, T., Senzaki, K., Nikai, T., Sugihara, H., Kameyama, T. and Nabeshima, T. (1999) Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats. *Neuroscience*, **88**, 281-294.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. and Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, **301**, 640-643.
- Yamashina, S., Takei, Y., Ikejima, K., Enomoto, N., Kitamura, T. and Sato, N. (2005) Ethanol-induced sensitization to endotoxin in Kupffer cells is dependent upon oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res*, **29**, 246S-250S.
- Yamashina, S., Wheeler, M.D., Rusyn, I., Ikejima, K., Sato, N. and Thurman, R.G. (2000) Tolerance and sensitization to endotoxin in Kupffer cells caused by acute ethanol involve interleukin-1 receptor-associated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, **277**, 686-690.
- Yang, B., Oo, T.N. and Rizzo, V. (2006a) Lipid rafts mediate H₂O₂ pro-survival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J*, **20**, 1501-1503.
- Yang, Y., Zhou, H., Li, W., Zhou, M., Zeng, Z., Xiong, W., Wu, M., Huang, H., Zhou, Y., Peng, C., Huang, C., Li, X. and Li, G. (2006b) Lipopolysaccharide (LPS) regulates TLR4 signal transduction in nasopharynx epithelial cell line 5-8F via NF-kappaB and MAPKs signaling pathways. *Mol Immunol*.
- Yee, L.J., Tang, J., Herrera, J., Kaslow, R.A. and van Leeuwen, D.J. (2000) Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun*, **1**, 386-390.

- Young, C., Klocke, B.J., Tenkova, T., Choi, J., Labruyere, J., Qin, Y.Q., Holtzman, D.M., Roth, K.A. and Olney, J.W. (2003) Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ*, **10**, 1148-1155.
- Zajchowski, L.D. and Robbins, S.M. (2002) Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem*, **269**, 737-752.

