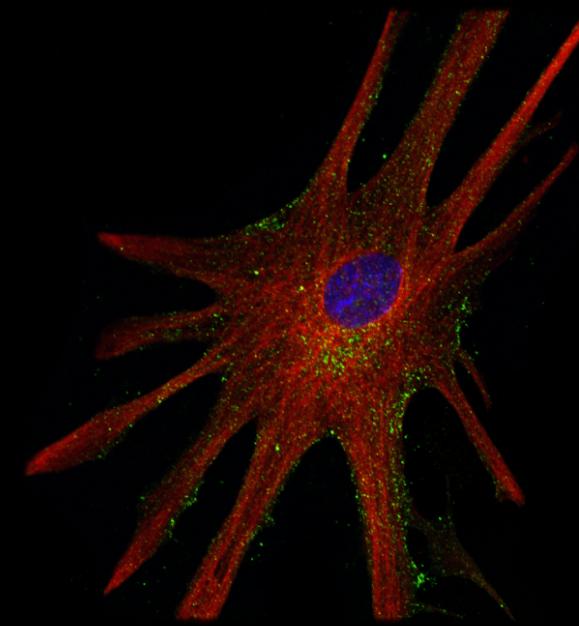


UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



IMPORTANCIA DE LOS MECANISMOS
DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA
NEURODEGENERACIÓN CAUSADA POR EL ABUSO
DE ALCOHOL: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4



Tesis Doctoral
Antoni Pla Rodríguez
Febrero de 2014

Antoni Pla Rodríguez

Febrero 2014

El alcohol es un compuesto neurotóxico y su abuso puede causar daño cerebral y neurodegeneración. Sin embargo, los procesos neuropatológicos que producen estos efectos no se conocen con exactitud. Nuestro grupo demostró por primera vez que el etanol induce gliosis, neuroinflamación, daño cerebral y neurodegeneración mediante la activación del sistema inmune innato en cerebro a través de los receptores TLR4 de las células gliales. Además, evidencias recientes apuntan a que el alcohol altera los procesos de degradación de proteínas en patologías como la hepatopatía alcohólica, pero se desconoce si estos procesos proteolíticos también participan en el daño cerebral inducido por el consumo de alcohol. Mediante esta tesis, pretendemos evaluar la relación de los dos principales complejos proteolíticos, el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de la autofagia, con el daño producido por el alcohol en el cerebro, así como la implicación de los receptores TLR4 en este proceso. Para ello, usaremos ratones WT y TLR4^{-/-} tratados crónicamente con etanol en agua durante cinco meses y los compararemos con los respectivos controles mediante técnicas como el western blot, PCR cuantitativa, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o citometría. Del mismo modo, trabajaremos también con cultivos primarios de células gliales para evaluar el efecto del alcohol en dosis agudas *in vitro*. Nuestra hipótesis de partida es que al activar la señalización por TLR4, el etanol causa inflamación en el cerebro, estrés oxidativo y acumulación de proteínas por disfunción de los sistemas proteolíticos. Esta acumulación de agregados proteicos podría a su vez estimular la activación de los receptores TLR4, amplificando los efectos del etanol en la producción de daño cerebral y neurodegeneración.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



IMPORTANCIA DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA NEURODEGENERACIÓN CAUSADA POR EL ABUSO DE ALCOHOL: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4

TESIS DOCTORAL:
ANTONI PLA RODRÍGUEZ

DIRECTORA:
CONSUELO GUERRI SIRERA

CODIRECTORA:
MARÍA PASCUAL MORA

TUTOR:
RAMÓN SERRANO SALOM

VALENCIA, FEBRERO DE 2014



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

CONSUELO GUERRI SIRERA, Dra. en Ciencias Biológicas e Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Laboratorio de Patología Celular.

CERTIFICO:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por **Antoni Pla Rodríguez** que lleva por título “**Importancia de los mecanismos de degradación de proteínas en la neurodegeneración causada por el abuso de alcohol: papel de los receptores TLR4**” ha sido realizada bajo mi dirección y la codirección de la Dra. María Pascual Mora, y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscribe en Valencia, a 26 de diciembre de 2013

Fdo.: Dra. Consuelo Guerri Sirera

Dra. María Pascual Mora

Audentes fortuna iuvat

AGRADECIMIENTOS

Todo el mundo se enfrenta en mayor o menor medida a obstáculos y contratiempos durante el doctorado, y esta tesis no ha sido una excepción. Por ello, quiero dar las gracias a todas y cada una de las personas que me han ayudado en este proceso. Sin vosotros, esta tesis habría sido imposible.

En primer lugar, quiero agradecer a Chelo todo lo que ha hecho por mí. Acudí a Chelo en un momento difícil, y desde el principio me ayudó en todo lo que pudo. Recuerdo cuando entré a su despacho por primera vez para explicarle mi situación y preguntarle si podría trabajar en su grupo. Prácticamente no me dejó ni hablar, y a los cinco minutos ya me había preparado un montón de *papers* para que empezara a leer cuanto antes. Es una persona que le pone mucho entusiasmo a todo lo que hace, y que sabe transmitir ese entusiasmo a la gente de su alrededor. Todo el mundo que la conozca se habrá dado cuenta de que no sólo es una gran científica, sino también una gran persona.

También quiero dar las gracias a mis tutores, y lo digo en plural porque no quiero olvidarme de Domingo Baretino. Tanto él como Ramón Serrano aceptaron en seguida ayudarme en este proyecto, y desde el principio me ofrecieron todo su apoyo para lo que necesitara.

En especial, quiero dar las gracias a María, que tiene gran parte de la culpa de que esta tesis haya salido adelante. Ella ha sido la que me ha guiado más de cerca durante todo este proceso, no sólo en el diseño

experimental, sino también sentándose en la bancada cuando ha sido necesario. Ha estado dispuesta a ayudarme en todo lo que ha podido desde el primer día, y durante todo este tiempo hemos vivido momentos muy divertidos, tanto pipeteando como en la pista de pádel.

Por supuesto, también me gustaría agradecer a los que han compartido el día a día de esta tesis de forma más directa: mis compañeros, sobre todo a mis “tetes” Jorge y Ful, con los que he pasado grandes momentos no sólo en el laboratorio, sino también fuera de él. Creo que puedo decir que me llevo dos buenos amigos con los que espero no perder el contacto estemos donde estemos. A las chicas del i05, Majo, Anabel y Silvia, y a nuestras vecinas del i58, Rosa y Mariam. Y a todos los que en algún momento han pasado por este laboratorio: Jorge Oliver, Juan, Sara, Maya y María Gómez. Tampoco quiero olvidarme de nuestra chica de prácticas, la coleccionista de coca-colas Clara Mar; ni de la gente de Servicios, en especial de nuestro particular “Hell Angel” del confocal, Alberto. En resumen, con todos ellos he compartido muchos buenos momentos y gracias a eso voy a tener siempre un muy buen recuerdo de mi paso por el CIPF.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a los que pase lo que pase siempre están ahí, mi familia: en especial a mis padres, mi hermana y Marta. Ellos son los verdaderos responsables de que haya llegado hasta aquí y pueda estar escribiendo estos agradecimientos. A mis padres, porque desde que era pequeño me han enseñado a intentar superarme y a dar siempre lo mejor de mí mismo, en todos los aspectos. A mi hermana Mireia, la doctora Pla, porque día a día me ha demostrado que con esfuerzo y dedicación hay pocas cosas que no

se puedan conseguir. Y finalmente a Marta, porque ella es la que desde hace ya casi siete años comparte conmigo los buenos momentos y me apoya en los malos; con ella a mi lado todo es más fácil. Sé que no lo suelo decir muy a menudo, pero para que quede escrito para siempre: os quiero mucho a todos.

Resumen en castellano

El alcohol es un compuesto neurotóxico y su abuso puede causar daño cerebral y neurodegeneración. Sin embargo, los procesos neuropatológicos que producen estos efectos no se conocen con exactitud. Nuestro grupo demostró por primera vez que el etanol induce gliosis, neuroinflamación, daño cerebral y neurodegeneración mediante la activación del sistema inmune innato en cerebro a través de los receptores TLR4 de las células gliales. Además, evidencias recientes apuntan a que el alcohol altera los procesos de degradación de proteínas en patologías como la hepatopatía alcohólica, pero se desconoce si estos procesos proteolíticos también participan en el daño cerebral inducido por el consumo de alcohol. Mediante esta tesis, pretendemos evaluar la relación de los dos principales complejos proteolíticos, el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de la autofagia, con el daño producido por el alcohol en el cerebro, así como la implicación de los receptores TLR4 en este proceso. Para ello, usaremos ratones WT y TLR4^{-/-} tratados crónicamente con etanol en agua durante 5 meses y los compararemos con los respectivos controles mediante técnicas como el western blot, PCR cuantitativa, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o citometría. Del mismo modo, trabajaremos también con cultivos primarios de células gliales para evaluar el efecto del alcohol en dosis agudas *in vitro*. Nuestra hipótesis de partida es que al activar la señalización por TLR4, el etanol causa inflamación en el cerebro, estrés oxidativo y acumulación de proteínas por disfunción de los sistemas proteolíticos. Esta acumulación de agregados proteicos podría a su vez estimular la activación de los receptores TLR4, amplificando los efectos del etanol en la producción de daño cerebral y neurodegeneración.

Resumen en valenciano

L'alcohol és un compost neurotòxic i el seu abús pot causar dany cerebral i neurodegeneració. No obstant això, els processos neuropatològics que produeixen aquests efectes no es coneixen amb exactitud. El nostre grup va demostrar per primera vegada que l'etanol induïx gliosi, neuroinflamació, dany cerebral i neurodegeneració mitjançant l'activació del sistema immunitari innat en cervell a través dels receptors TLR4 de les cèl·lules glials. A més, evidències recents apunten que l'alcohol altera els processos de degradació de proteïnes en patologies com l'hepatopatia alcohòlica, però es desconeix si aquests processos proteolítics també participen en el dany cerebral induït pel consum d'alcohol. Mitjançant aquesta tesi, pretenem avaluar la relació dels dos principals complexos proteolítics, el sistema ubicuitina-proteasoma i la via de l'autofàgia, amb el dany produït per l'alcohol en el cervell, així com la implicació dels receptors TLR4 en aquest procés. Per a això, farem servir ratolins WT i TLR4^{-/-} tractats crònicament amb etanol diluït en aigua durant 5 mesos i els compararem amb els respectius controls mitjançant tècniques com el western blot, PCR quantitativa, immunofluorescència, immunohistoquímica o citometria. De la mateixa manera, treballarem també amb cultius primaris de cèl·lules glials per avaluar l'efecte de l'alcohol en dosis agudes *in vitro*. La nostra hipòtesi de partida és que l'activació de la senyalització del receptor TLR4 per l'etanol causa inflamació al cervell, estrès oxidatiu i acumulació de proteïnes per disfunció dels sistemes proteolítics. Aquesta acumulació d'agregats proteics podria al seu torn estimular l'activació dels receptors TLR4, amplificant els efectes de l'etanol en la producció de dany cerebral i neurodegeneració.

Resumen en inglés

Alcohol is a neurotoxic compound and its abuse can cause brain damage and neurodegeneration. However, the neuropathological processes that produce these effects are not completely understood. Our group demonstrated for the first time that ethanol induces gliosis, neuroinflammation, brain damage and neurodegeneration by activating the brain innate immune system through the TLR4 receptor of glial cells. In addition, recent evidence suggests that alcohol alters the protein degradation processes in several pathologies such as alcoholic liver disease, but whether these proteolytic processes are also involved in ethanol-induced brain damage remains elusive. Therefore, we aim to evaluate the relationship between the two main proteolytic complexes, the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosome pathway, and the ethanol-induced brain damage, as well as the involvement of TLR4 receptors in these processes. To that end, we will use WT and TLR4^{-/-} mice chronically treated with ethanol in water for 5 months and we will compare them with their respective controls using techniques such as western blot, quantitative PCR, immunofluorescence, immunohistochemistry and cytometry. Similarly, we will also work with primary cultures of glial cells to evaluate the effect of an acute dose of alcohol *in vitro*. Our hypothesis is that by activating TLR4 signaling, ethanol causes neuroinflammation, oxidative stress and protein accumulation through a proteolytic systems dysfunction. This accumulation of protein aggregates may in turn stimulate the activation of the TLR4 receptor, amplifying the effects of ethanol in the production of brain damage and neurodegeneration.

ABREVIATURAS

ADH: Alcohol deshidrogenasa

AMC: Autofagia mediada por chaperonas

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

AP-1: Proteína activadora 1

ATG: Gen / proteína relacionado con la autofagia (“Autophagy-related”)

BHE: Barrera hematoencefálica

BSA: Albúmina de suero bovino

CL: Cuerpo de Lewis

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CPA: Célula presentadora de antígeno

CYP2E1: Citocromo P450 2E1

DAMP: Patrón molecular asociado a daño (“Danger-associated molecular pattern”)

DD: Dominio de muerte

DMEM: Medio “Dulbecco’s modified Eagle”

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

DUB: Enzima deubicultinadora

EA: Enfermedad de Alzheimer

EH: Enfermedad de Huntington

EP: Enfermedad de Parkinson

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HRP: Peroxidasa de rábano

IFN: Interferón

IL-1R: Receptor de Interleuquina 1

IL-1 β : Interleuquina 1 β

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IRF: Factor regulador del interferón

IVIS: Sistema de imagen *in vivo*

kDa: Kilodalton

KO: "Knockout"

LC3: Cadena ligera 3 de las proteínas asociadas a microtúbulos 1A/1B

LPS: Lipopolisacárido

LRR: Repeticiones ricas en leucina

mA: Miliamperio

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero ("Mammalian target of rapamycin")

MyD88: Gen de diferenciación de mielina de respuesta primaria (88)

NF- κ B: Factor nuclear κ B

NO: Óxido nítrico

ODC: Ornitina decarboxilasa

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos ("Pathogen-associated molecular pattern")

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PE: Fosfatidiletanolamina

PF: Paraformaldehído

PGPH: Peptidil glutamil péptido hidrolasa

PRR: Receptores de reconocimiento de patrón

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RE: Retículo endoplasmático

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies reactivas del nitrógeno

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SBB: Negro Sudan B

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

SNC: Sistema nervioso central

SUP: Sistema ubiquitina-proteasoma

T: Tween

TBK1: Quinasa de unión a TANK 1

TBS: Solución Tris salina tamponada

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β

TIR: Receptor de Toll/interleuquina 1

TIRAP: Molécula adaptadora de TIR

TLR: Receptor tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TRAF6: Factor asociado a receptor de TNF 6

TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF

TRIF: Adaptador que contiene dominio TIR inductor de IFN- β

Uds.: Unidades

WT: Fenotipo silvestre (“Wild type”)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alcohol y daño cerebral: papel de la neuroinflamación.....	3
1.2. Sistema neuroinmune	6
1.2.1. Receptores tipo Toll	10
1.2.2. Vías de señalización de los TLRs	13
1.2.3. TLR4, alcohol y neurodegeneración	16
1.3. Mecanismos de degradación de proteínas	20
1.3.1. Sistema ubiquitina-proteasoma	22
1.3.2. Sistema ubiquitina-proteasoma y neurodegeneración	28
1.3.3. Vía de la autofagia-lisosoma	34
1.3.4. Vía de la autofagia-lisosoma y neurodegeneración	40
1.4. Alcohol y proteólisis	43
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. Animales de experimentación.....	53
3.2. Cultivos	53
3.2.1. Cultivo primario de astrocitos	54
3.2.2. Cultivo primario de células microgliales.....	54
3.3. Tratamientos	55
3.3.1. Administración crónica de etanol <i>in vivo</i>	55
3.3.2. Inhibición del proteasoma y estimulación de la autofagia <i>in vivo</i> ..	56

3.3.3. Tratamiento <i>in vitro</i> de astrocitos y microglía con etanol	57
3.4. Determinación de proteínas: inmunotransferencia.....	58
3.4.1. Obtención del lisado celular y de tejido.....	58
3.4.2. Electroforesis.....	59
3.4.3. Inmunotransferencia y detección de proteínas	59
3.5. Análisis de la expresión génica.....	62
3.5.1. Extracción y aislamiento del RNA.....	62
3.5.2. Transcripción reversa y PCR cuantitativa	62
3.6. Medida de la actividad del proteasoma.....	63
3.7. Análisis de citoquinas y especies reactivas del oxígeno.....	64
3.8. Imagen óptica <i>in vivo</i> (IVIS)	65
3.9. Técnicas de microscopía.....	65
3.9.1. Preparación y fijación del tejido cerebral	65
3.9.2. Inmunohistoquímica en tejido cerebral	66
3.9.3. Microscopía confocal	67
3.9.4. Microscopía electrónica de transmisión	68
3.10. Citometría.....	70
3.10.1. Análisis de la masa lisosomal	70
3.10.2. Cálculo del pH en los lisosomas.....	70
3.11. Métodos estadísticos	71
4. RESULTADOS	73
4.1. El consumo crónico de etanol afecta a la proteólisis intracelular y causa una acumulación de proteínas en corteza cerebral.....	75
4.1.1. Papel de TLR4 en la acumulación de proteínas ubiquitinadas	75
4.1.2. El consumo crónico de alcohol afecta al sistema ubiquitina-proteasoma	77

4.1.3. El etanol aumenta los niveles de las actividades tipo quimotripsina y tripsina.....	80
4.1.4. El etanol causa alteraciones en la vía de la autofagia-lisosoma	81
4.1.5. El tratamiento crónico con etanol produce un aumento del volumen de las vacuolas autofágicas	85
4.1.6. Estudio <i>in vivo</i> de la expresión de β 5i y LC3 en cerebro	87
4.1.7. El consumo crónico de etanol genera estrés oxidativo.....	92
4.1.8. Administración <i>in vivo</i> de bortezomib y rapamicina a ratones alcoholizados	93
4.2. El etanol altera la proteólisis en células gliales en cultivo primario	97
4.2.1. El etanol no afecta a la acumulación de proteínas ubiquitinadas en cultivo de astrocitos	97
4.2.2. El inmunoproteasoma se activa en células gliales incubadas con etanol	99
4.2.3. La administración <i>in vitro</i> de etanol estimula la autofagia en células gliales.....	102
4.2.4. El número de vacuolas autofágicas aumenta en astrocitos en cultivo tras la incubación con etanol.....	107
4.2.5. El etanol produce un aumento de la masa y el pH lisosomales en células gliales.....	108
5. DISCUSIÓN	113
5.1. Acumulación de proteínas ubiquitinadas y neurodegeneración.....	116
5.2. Importancia del proteasoma constitutivo e inducible en la neuroinflamación y neurodegeneración.....	120
5.3. Papel de la autofagia en la neurodegeneración.....	124
5.3.1. El alcohol puede inhibir o aumentar la autofagia	128

6. CONCLUSIONES	135
7. BIBLIOGRAFÍA	141
8. ANEXOS	173

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Alcohol y daño cerebral: papel de la neuroinflamación

El alcohol (etanol) es un compuesto neurotóxico y su abuso puede producir daño en diferentes tejidos y órganos, entre los que destacan el hígado y el cerebro por su mayor sensibilidad. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2011), el consumo de alcohol es el tercer factor de riesgo más importante para la aparición de enfermedades y otras discapacidades. Es el principal causante de 60 tipos de enfermedades y componente causal en otras 200 patologías, y provoca alrededor del 4% de todas las muertes anuales en el mundo (WHO, 2011).

El cerebro es uno de los principales órganos afectados por el consumo de alcohol. Contiene aproximadamente cien mil millones de células nerviosas o neuronas, pero además, por cada una de estas neuronas existen 10 células gliales o, en su conjunto, glía. La glía se divide en microglía, que es la encargada de mediar en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (SNC); y macroglía, compuesta por oligodendrocitos que forman la vaina de mielina que envuelve los axones neuronales y por astrocitos, que son las células gliales más abundantes y cumplen funciones fisiológicas esenciales para el mantenimiento de la función neuronal.

El consumo abusivo de alcohol resulta en alteraciones significativas de la estructura, fisiología y función cerebral (Crews *et al.*, 2005; de la Monte, 1988). Diversos estudios en individuos alcohólicos postmortem demuestran que el alcohol genera una reducción de la masa cerebral (Harper and Kril, 1993; Kril and Halliday, 1999) y que esta reducción es

mayor cuanto mayor es la cantidad de alcohol ingerida a lo largo de la vida. La pérdida de masa cerebral se debe a una combinación de la pérdida tanto de neuronas como células gliales, y a una reducción en su tamaño, complejidad sináptica y ramificación neuronal. Los lóbulos frontales, que se encargan de la integración del comportamiento, intelecto y emoción, parecen ser especialmente sensibles a los efectos del alcohol (Jernigan *et al.*, 1991; Oscar-Berman and Hutner, 1993). Estos muestran la mayor reducción en masa a favor del agrandamiento de los ventrículos cerebrales. Esta pérdida se atribuye a una disminución de la materia blanca, compuesta por las fibras nerviosas mielínicas (Alexander-Kaufman *et al.*, 2006; de la Monte, 1988; Harper and Matsumoto, 2005), no sólo en los lóbulos frontales (Alexander-Kaufman *et al.*, 2006; Sullivan and Pfefferbaum, 2005), sino también en el tálamo, cuerpo calloso (CC) y cerebelo (Rosenbloom *et al.*, 2003). Además, también hay una reducción de la materia gris, constituida principalmente por neuronas, sobre todo en regiones específicas de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de cerebros de alcohólicos (Harper *et al.*, 2003; Harper and Matsumoto, 2005). Se han observado también alteraciones y muerte celular de las células gliales en cortex prefrontal e hipocampo (Ikegami *et al.*, 2003; Korbo, 1999; Kril *et al.*, 1997; Miguel-Hidalgo *et al.*, 2002), así como una reducción en la expresión de distintos genes relacionados con el proceso de mielinización (Lewohl *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006), que podrían estar implicados en dicha pérdida.

Todos estos cambios morfológicos y estructurales van acompañados también de cambios funcionales. Estudios clínicos y experimentales demuestran que existen déficits neuropsicológicos en alcohólicos, especialmente en los que sufren el síndrome de Wernicke-

Korsakoff (Oscar-Berman and Hutner, 1993). Parece ser que las funciones más afectadas son las relacionadas con la parte de la corteza prefrontal, como cambios en la personalidad, disfunciones emocionales y en la capacidad de concentración, y en general todas las tareas relacionadas con la función cognitiva. Además, incluso en casos menos graves de alcoholismo también se aprecia una reducción de la capacidad de aprendizaje, memoria, procesamiento de información y afectaciones motoras (Oscar-Berman and Hutner, 1993; Parsons, 1993).

A pesar de una amplia investigación sobre los efectos del etanol en cerebro, todavía se desconocen los mecanismos moleculares responsables del daño que induce el alcohol en el cerebro. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos y factores concurrentes que podrían contribuir a dicha neurodegeneración, entre ellos: 1) la participación de eventos excitotóxicos y la generación de glutamato (Crews and Chandler, 1993; Lovinger, 1993) y óxido nítrico (NO) (Chandler *et al.*, 1997; Lancaster, 1992), 2) la activación glial y el edema cerebral (Collins *et al.*, 1998), y 3) el estrés oxidativo causado por la producción de radicales libres. No obstante, evidencias recientes sugieren la implicación de mecanismos inflamatorios en el daño producido por el alcohol en el cerebro (Valles *et al.*, 2004). Estos estudios demuestran que el tratamiento crónico con alcohol no sólo aumenta los niveles de citoquinas (IL-1 β , TNF- α) y otros mediadores inflamatorios (iNOS, COX-2), sino que también activa vías de señalización tradicionalmente asociadas con inflamación (MAPKs, NF- κ B, AP-1) en cerebro de rata y en astrocitos en cultivo. Todos estos eventos inflamatorios están además asociados con un aumento en la muerte celular (Valles *et al.*, 2004). Si integramos los tres mecanismos propuestos

anteriormente e incluimos las nuevas evidencias de la importancia de los procesos inflamatorios, quedaría un modelo en el que la activación de las células gliales y en general del sistema inmune innato inducida por el etanol podría desencadenar la producción de compuestos tóxicos como especies reactivas del oxígeno (ROS) u óxido nítrico (Blanco *et al.*, 2004), citoquinas inflamatorias y glutamato, que podrían contribuir a la aparición de daño cerebral de forma similar a lo que ocurre en otras patologías del cerebro y enfermedades neurodegenerativas (Giovannini *et al.*, 2003; Hunot and Hirsch, 2003; Owens, 2003).

A pesar de que los mecanismos moleculares por los cuales el alcohol induce la producción de estos mediadores inflamatorios no están del todo esclarecidos, datos de nuestro laboratorio apuntan a que el etanol podría activar la respuesta inmune innata y la señalización por los receptores tipo Toll (TLR), lo que se traduciría en la activación de NF- κ B y la consiguiente producción de mediadores inflamatorios (Blanco *et al.*, 2005; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009; Valles *et al.*, 2004).

1.2 Sistema neuroinmune

El SNC se ha considerado tradicionalmente como un tejido inmunológicamente privilegiado, ya que carece de vasos linfáticos, está desprovisto de células dendríticas y las células del parénquima no expresan moléculas presentadoras de antígeno (complejo mayor de histocompatibilidad, CMH I y II) de forma constitutiva (Vergara, 2011), pero sobre todo porque está protegido por una “barrera hematoencefálica” (BHE) que lo aísla de la periferia. La BHE, formada por células endoteliales,

previene bajo condiciones normales la entrada al parénquima cerebral de leucocitos, anticuerpos, factores de complemento y citoquinas, así como células presentadoras de antígeno (CPA) como las células dendríticas, células B, o macrófagos (Neumann, 2001; Schultzberg *et al.*, 2007).

Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el SNC está íntimamente ligado al sistema inmunitario a diferentes niveles (Neumann, 2001). El SNC no sólo es inmunocompetente, sino que además tiene la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario periférico a través de la liberación de neurotransmisores como la dopamina, el glutamato o la acetilcolina (Franco *et al.*, 2007; Levite, 2008; Pacheco *et al.*, 2009). Por tanto, el SNC puede modular la respuesta inmune y de esta forma limitar el daño tisular producido por la inflamación (Aloisi, 2001; Vergara, 2011).

Hasta hace poco, el estudio del SNC se había centrado únicamente en las neuronas (Chavarria and Alcocer-Varela, 2004; John *et al.*, 2003; Wrona, 2006), ya que se creía que éstas eran las células funcionales y otros tipos celulares, como las células gliales, simplemente contribuían a “alimentarlas” y darles soporte. Sin embargo, en la actualidad se sabe que las células gliales tienen un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del SNC (Chavarria and Alcocer-Varela, 2004) y son células esenciales en procesos como la reparación tisular (Wurmser *et al.*, 2004), neurotransmisión (Araque and Perea, 2004), vascularización, así como en la inflamación, neuroprotección y en general en la respuesta inmune innata (Aschner, 1998; Aschner *et al.*, 2002; Dong and Benveniste, 2001; Hanisch, 2002).

El sistema inmune innato constituye el primer mecanismo de defensa del que dispone el organismo para defenderse ante una infección

foránea. Éste responde de una forma genérica y sin especificidad, lo que lo diferencia del sistema inmune adaptativo, y suele desencadenar una respuesta de tipo inflamatorio por parte de las células del sistema inmunitario, como los macrófagos y las células gliales (Griffiths *et al.*, 2007).

Entre las células gliales, la microglía y los astrocitos son los principales encargados de las funciones inmunológicas en el cerebro, y tienen un papel fundamental en los procesos inflamatorios. La microglía constituye un 12% del total de células en el SNC. Se trata de células de pequeño tamaño que se encuentran diseminadas por todo el SNC y que hacen las veces de macrófagos del parénquima cerebral. En condiciones fisiológicas, se encuentran en un estado de reposo, estado que se asocia con la producción de citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos (Streit *et al.*, 2004). Sin embargo, la microglía se estimula rápidamente en presencia de daño tisular o infección. En estos casos, se produce un cambio en su morfología (de un estado basal arbustivo pasan a uno ameboides) y adquieren una gran cantidad de funciones que incluyen la fagocitosis, la sobreexpresión de moléculas de superficie celular, la producción y secreción de mediadores inflamatorios (Hanisch, 2002), e incluso la capacidad para actuar como CPAs. Todo ello sirve para promover una respuesta inflamatoria que si se alarga en el tiempo puede ser la responsable del daño neuronal, como se ha observado en múltiples enfermedades neurodegenerativas (Glass *et al.*, 2010).

Por su parte, los astrocitos son la población más numerosa del SNC y también son importantes en la respuesta inmune. Entre sus funciones están el control de la homeostasis de agua e iones, la captación de aminoácidos neurotransmisores y la producción de factores de crecimiento

esenciales para el desarrollo de las neuritas (Haberg *et al.*, 2001). Además, contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la BHE (Prat *et al.*, 2001) y modulan la migración de monocitos y linfocitos a través de esta (Weiss and Berman, 1998). Los astrocitos responden fuertemente al daño tisular y parecen tener un papel importante en la regulación de la inflamación en el cerebro (Dietrich *et al.*, 2003). De hecho, el daño cerebral suele ir acompañado de una hipertrofia, proliferación, y expresión génica alterada en astrocitos, proceso que se conoce comúnmente como astrogliosis reactiva (Ridet *et al.*, 1997) y que está íntimamente ligado a la inflamación (Little and O'Callagha, 2001). Existe una clara dualidad en cuanto al papel de la astrogliosis, ya que ésta puede ser beneficiosa para la supervivencia neuronal y glial mediante la producción de neurotrofinas y factores de crecimiento, o tener un efecto negativo al inhibir el crecimiento y migración neuronal y glial (Crews *et al.*, 2004; Sofroniew, 2009).

La astrogliosis parece ser iniciada y modulada por la presencia de citoquinas, especialmente por IL-1 β , TNF- α , IFN- γ y TGF- β . La activación de los astrocitos en respuesta a un proceso neuropatológico induce la producción de más citoquinas e incrementa la expresión del CMH de tipo II, lo que les permite actuar como CPAs (Dong and Benveniste, 2001). Los astrocitos sufren por tanto una reprogramación funcional que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis y la regulación local de la respuesta inmune e inflamatoria (Benveniste, 1998).

Tanto microglía como astrocitos se caracterizan por la expresión de una clase de receptores de membrana que son esenciales en el desarrollo de la respuesta inmune e inflamatoria y que son conocidos como receptores tipo Toll (Mishra *et al.*, 2008).

1.2.1 Receptores tipo Toll

Los receptores tipo Toll (“Toll-like receptors”, TLRs) son una familia de receptores de reconocimiento de patrón (“pattern recognition receptors”, PRRs) identificados en *Drosophila* (Hashimoto *et al.*, 1988) que permiten la identificación de una serie de motivos estructurales conservados en una gran variedad de patógenos (“pathogen associated molecular patterns”, PAMPs) y otras moléculas endógenas producidas durante el daño tisular (“danger associated molecular patterns”, DAMPs) (Medzhitov *et al.*, 1997). Estos receptores son de gran importancia en el sistema inmune innato ya que representan la primera barrera de defensa contra las infecciones. La estimulación de los TLRs por los correspondientes PAMPs o DAMPs inicia cascadas de señalización que producen la activación de factores de transcripción como AP-1 (“activator protein 1”), NF-κB (“nuclear factor-κB”) y factores reguladores del interferón (IRFs). La señalización a través de los TLRs resulta en una gran variedad de respuestas celulares incluyendo la producción de interferones (IFNs), citoquinas proinflamatorias y citoquinas efectoras que dirigen la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, cabe destacar que a pesar de que los TLRs son receptores del sistema inmune innato, también participan en diversos procesos no estrictamente inmunes, tales como el metabolismo óseo (Bar-Shavit, 2008), la neurogénesis (Rolls *et al.*, 2007) y el desarrollo cerebral (Ma *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2006).

Los TLRs forman parte, junto con los receptores de interleukina-1 (IL-1R), de la superfamilia de receptores interleukina-1/Toll-like. Se trata de glicoproteínas transmembrana caracterizadas por un dominio extracelular que contiene repeticiones ricas en leucina (LRRs) y una región citoplásmica

formada por un dominio muy conservado conocido como TIR (“Toll/IL-1 receptor”). Este dominio está formado por alrededor de 200 aminoácidos y consta de tres “cajas” o regiones de homología esenciales para la señalización. En cuanto al dominio extracelular, está formado por 19-25 copias en tándem del motivo LRR, cada cual contiene a su vez 24-29 aminoácidos. Estas repeticiones se estructuran en forma de láminas β y hélices α conectadas por *loops* o bucles. La estructura en la que están dispuestas es esencial, ya que forma una especie de herradura que se cree que influye directamente en el reconocimiento de los ligandos (Fig. 1).

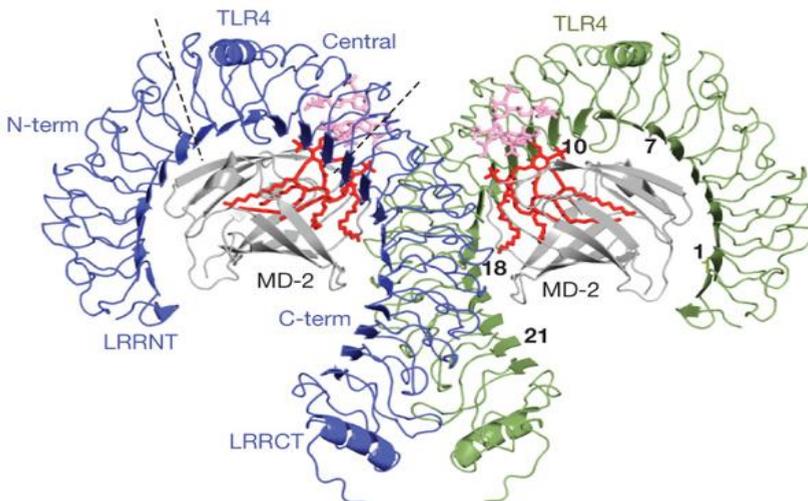


Figura 1. Estructura típica de los receptores TLR4. Estos receptores están formados por tres regiones (N-terminal, central y C-terminal) e interactúan con otras moléculas como MD-2 para reconocer a su ligando LPS (en rojo). Se señalan y numeran las repeticiones ricas en leucina (LRR). (Modificada de www.nature.com).

Los TLRs se expresan en una gran cantidad de tipos celulares, pero sobre todo se expresan altamente en células relacionadas con el sistema

inmune innato, incluyendo macrófagos y células gliales (Glass *et al.*, 2010). Se han caracterizado diez tipos de TLRs en humanos (TLR1 a TLR10) y doce murinos (TLR1 a TLR9 y TLR11 a TLR13, ya que TLR10 es un pseudogén). Todos ellos se localizan en la membrana plasmática, con la excepción de TLR3, TLR7 y TLR9, que se sitúan en el compartimento endosomal (Nishiya and DeFranco, 2004). Además, su patrón de expresión varía entre tejidos y tipos celulares, ya que cada uno tiene afinidad por uno o varios agentes patógenos. Por ejemplo, TLR2 es esencial para el reconocimiento de una gran variedad de PAMPs de bacterias Gram-positivas, incluyendo lipoproteínas, lipomananos o ácidos lipoteicoicos. Por su parte, TLR3 reconoce RNA de doble cadena derivado de virus, mientras que TLR4 se activa predominantemente por lipopolisacárido (LPS), compuesto característico de bacterias Gram-negativas. TLR5 detecta flagelina bacteriana y TLR9 se requiere para la respuesta a DNA CpG sin metilar. TLR7 y TLR8 reconocen pequeñas moléculas sintéticas antivirales (Jurk *et al.*, 2002). Por último, se ha demostrado que TLR11 detecta componentes de varias bacterias como *E. coli* o *Toxoplasma gondii* (Lauw *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004).

A todo esto hay que añadirle que la especificidad de reconocimiento de PAMPs puede verse alterada por la habilidad de los TLRs para formar heterodímeros. Por ejemplo, se han descrito dímeros de TLR2 y TLR6 que son necesarios para la respuesta a lipoproteínas diaciladas, mientras que TLR2 y TLR1 interaccionan para reconocer lipoproteínas triaciladas (Ozinsky *et al.*, 2000). Además, la especificidad también puede verse influenciada por varias proteínas adaptadores y moléculas accesorias como MD-2 o CD14 en el caso de TLR4 en respuesta a LPS (Miyake, 2003).

1.2.2 Vías de señalización de los TLRs

Los TLRs inician principalmente dos vías de señalización: una ruta MyD88 (“myeloid differentiation primary-response protein 88”)-dependiente que conduce a la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias, y otra ruta MyD88-independiente asociada con la activación del factor regulador de IFN (IRF3) y que conlleva la producción de IFN- β y la expresión de genes inducibles por IFN, así como la proliferación de células dendríticas (Kaisho *et al.*, 2001) (Fig. 2).

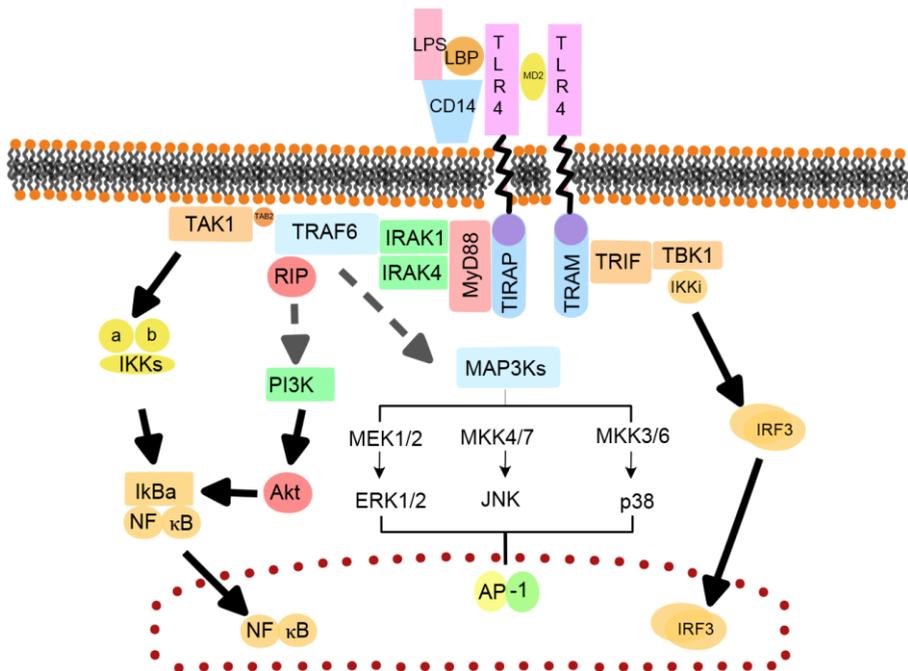


Figura 2. Vías de señalización de los TLRs. Los TLRs son capaces de activar dos vías de señalización: la MyD88-dependiente, que resulta en la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, y la producción de citoquinas inflamatorias; y la MyD88-independiente, que promueve la expresión de genes inducibles por interferón a través de IRF3. (Tomada de wikipedia.org).

La **vía MyD88-dependiente** es común a todos los TLRs con la excepción de TLR3 (Adachi *et al.*, 1998). MyD88 codifica una proteína con un extremo N-terminal que contiene un dominio DD (“death domain”), y un extremo C-terminal formado por un dominio TIR. Por lo tanto, MyD88 cuenta en ambos extremos con secuencias que le permitirán interactuar con otras proteínas y cumplir su función como molécula adaptadora. En presencia del estímulo, los TLRs dimerizan e inducen el reclutamiento de MyD88 al dominio citoplasmático TIR del receptor, donde facilita la asociación de IRAK4 con el complejo a través de interacciones DD. Esta unión favorece la fosforilación por parte de IRAK4 (“IL-1R-associated kinase 4”) de un residuo de IRAK1 que induce su actividad quinasa. IRAK1 entonces se autofosforila en su extremo N-terminal y esta hiperfosforilación permite el reclutamiento de TRAF6 (“tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6”). El complejo IRAK1-TRAF6 se libera del receptor e interactúa en la membrana plasmática con otro complejo formado por TAK1 (“transforming-growth-factor- β -activated kinase”), TAB1 (“TAK1-binding protein 1”) y TAB2 o TAB3. IRAK1 es entonces degradado y el nuevo complejo se fosforila y transloca al citoplasma, donde TAK1 activa a las IKKs (“inhibitor of NF- κ B (I κ B)-kinase complex”), que a su vez fosforilan las I κ Bs. Esta fosforilación produce la ubiquitilación y posterior degradación de I κ B, y la consiguiente liberación de NF- κ B. Finalmente, éste se transloca al núcleo y estimula la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α (“tumoral necrosis factor- α ”), IL-1 o IL-12. La activación de TAK1 también resulta en la activación de la vía de las MAPKs (Akira and Takeda, 2004).

Por otra parte, la **vía MyD88-independiente/TRIF-dependiente** es exclusiva de TLR3 y TLR4 (Akira and Takeda, 2004). El objetivo final de esta

vía de señalización es la producción de IFN- β , la inducción de la expresión de genes inducibles por IFN y la maduración de células dendríticas. La molécula adaptadora en este caso es TRIF (“TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β ”). En su dominio N-terminal, TRIF interactúa con TBK1 (“TANK-binding kinase 1”), cuya activación produce la fosforilación de IRF3, su dimerización y translocación al núcleo para la producción de IFN- β . Además, se ha demostrado que esta vía también está implicada en la producción de una segunda oleada de citoquinas proinflamatorias a través de una “activación tardía” (en contraposición a la respuesta temprana de la vía MyD88-dependiente) de NF- κ B (Hoebe *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003a). De nuevo mediante su extremo N-terminal, TRIF interactúa a través de una secuencia consenso P-X-E-X-X-(D/E/F/W/Y) con TRAF6 (Ye *et al.*, 2002). Pero además, mediante su extremo C-terminal, TRIF interactúa con una proteína llamada RIP1 (receptor-interacting protein 1) (Meylan *et al.*, 2004). Estas dos proteínas, TRAF6 y RIP1, son capaces de producir la activación de NF- κ B de una forma similar a la que se da en la vía MyD88-dependiente (Jin and Lee, 2008) y la consiguiente expresión de citoquinas.

Por último, es necesario indicar que en algunos casos se requiere la presencia de una serie de moléculas adaptadoras adicionales. Por ejemplo, TIRAP (molécula adaptadora de TIR) es esencial para la vía MyD88-dependiente en TLR2 y TLR4 pero no en otros como TLR3, TLR7 y TLR9 (Horng *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002), mientras que TRAM (molécula adaptadora relacionada con TRIF) es necesaria en la vía MyD88-independiente/TRIF-dependiente en TLR4 pero no en TLR3 (Yamamoto *et al.*, 2003b).

1.2.3 TLR4, alcohol y neurodegeneración

El alcohol es capaz de inducir daño cerebral mediante una respuesta inflamatoria continuada, pero hasta hace poco se desconocían los mecanismos moleculares implicados. En este sentido, estudios recientes han demostrado que a concentraciones fisiológicas relevantes, el alcohol es capaz de activar vías de señalización mediadas por TLR4/IL-1RI en cultivos de astrocitos (Blanco *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2005), en microglía y en macrófagos murinos (Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2008; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009). Esto produce una liberación de citoquinas que no sólo se ha detectado en cerebro, sino también en hígado de animales tratados con alcohol o LPS (Qin *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que la activación de este tipo de receptores por parte del etanol podría constituir un mecanismo fundamental en la producción de citoquinas y en la aparición de daño inflamatorio.

De esta forma, a concentraciones fisiológicamente relevantes (10 mM), el etanol facilitaría el reclutamiento de los receptores TLR4/IL-1RI en microdominios citoplasmáticos conocidos como balsas lipídicas (“lipid rafts”) (Blanco and Guerri, 2007), lo que desencadenaría la activación de estos receptores y la producción de citoquinas. Por el contrario, a concentraciones altas (100-200 mM), el etanol provocaría la interrupción de dicho reclutamiento mediante la disrupción de estas balsas lipídicas, inhibiendo la señalización de los receptores. Esto se ha podido demostrar en astrocitos, cuya estimulación con IL-1 β , LPS o etanol desencadena la acumulación de TLR4/IL-1RI en ciertas zonas de la membrana, y el reclutamiento y fosforilación de moléculas señalizadoras como IRAK, ERK, p38 o JNK hacia dichos dominios (Blanco *et al.*, 2008). Como consecuencia

de la estimulación de la señalización por TLR4, se produciría la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, y la consiguiente liberación de citoquinas (Blanco *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005).

En cultivos de microglía, el etanol activa las dos vías de señalización de TLR4, MyD88-dependiente (MAPKs, NF- κ B) y MyD88-independiente (IRF3, STAT1), induciendo la activación de las células microgliales y la producción de mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS, IFN- β) (Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009). Sin embargo, la respuesta inflamatoria inducida por el etanol no se observa cuando se bloquean los receptores TLR4/IL-1RI con anticuerpos específicos (Blanco and Guerri, 2007), ni tampoco en microglía de ratones TLR4^{-/-} (Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009).

En conjunto, todos estos datos sugieren que el etanol actúa como agonista de los receptores TLR4/IL-1RI y activa sus vías de señalización de manera similar a sus ligandos LPS e IL-1 β , lo que provoca la aparición de neuroinflamación y daño neural (Blanco and Guerri, 2007; Blanco *et al.*, 2005). De hecho, numerosos estudios señalan la importancia de la respuesta mediada por TLR4 en procesos neuroinflamatorios, daño cerebral y neurodegeneración (Caso *et al.*, 2007; Lehnardt *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2007). Por ejemplo, la estimulación con LPS *in vitro* de células microgliales resulta tóxica para neuronas y oligodendrocitos, y lo mismo se ha demostrado en cultivos de astrocitos (Bal-Price and Brown, 2001; Lehnardt *et al.*, 2003).

La toxicidad generada por la activación de los receptores TLR4 parece estar mediada por moléculas proinflamatorias y especies reactivas del oxígeno, ya que el bloqueo farmacológico de iNOS, productor de óxido nítrico, es capaz de prevenir la muerte neuronal en presencia de glía

activada (Lehnardt *et al.*, 2006). Además, estos efectos también se producen *in vivo*, donde se ha demostrado que la exposición a LPS causa a través de TLR4 una gran activación de la microglía asociada con muerte de oligodendrocitos, procesos de demielinización y una mayor vulnerabilidad de las neuronas (Lehnardt *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2007). De nuevo, el bloqueo de iNOS es beneficioso y aumenta la supervivencia neuronal, lo que indica que el mecanismo neurodegenerativo *in vivo* es muy similar al que ocurre *in vitro* (Arimoto and Bing, 2003).

Los receptores TLR están cobrando cada vez más relevancia en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la esclerosis múltiple, muchas de las cuales cursan con sobreexpresión de estos receptores (Okun *et al.*, 2009). De hecho, se ha propuesto que su expresión podría variar tanto en condiciones patológicas como con la edad (Letiembre *et al.*, 2007; Letiembre *et al.*, 2009). A pesar de que esta familia de receptores cumple una función vital en la defensa ante agentes patógenos, su activación continuada puede resultar perjudicial debido a la generación de un ambiente inflamatorio, que resulta nocivo para la supervivencia celular de neuronas y células de la glía. Todas estas evidencias no hacen sino volver a poner de manifiesto la importancia de estos receptores no sólo en la respuesta ante agentes infecciosos, sino también en una gran variedad de procesos neurales (Carpentier *et al.*, 2008) (Fig. 3).

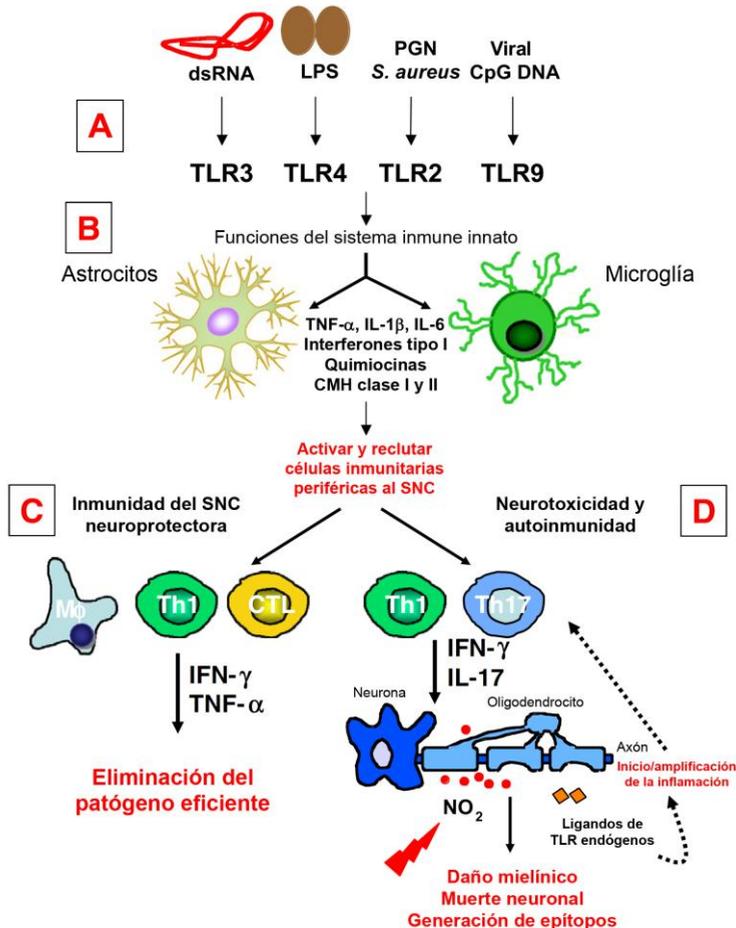


Figura 3. Representación esquemática del papel de los TLRs de las células gliales en la inmunidad y enfermedad del SNC. Las células gliales, astrocitos y microglía, expresan una gran variedad de TLRs. (A) La estimulación con los ligandos específicos de cada receptor promueve las funciones inmunes de los TLRs, que incluyen la secreción de citoquinas proinflamatorias, quimiocinas interferones de tipo I y moléculas del CMH I y II. (B) Esta secreción genera un ambiente inflamatorio que atrae a los leucocitos (macrófagos, células dendríticas y células T CD4+ y CD8+) hacia el SNC. (C) Esto es esencial para eliminar el patógeno de forma eficiente. (D) Sin embargo, evidencias recientes indican que la activación crónica de los TLRs puede ser perjudicial para el huésped, causando neurotoxicidad, y muerte neuronal y de oligodendrocitos. Además, los TLRs también intervienen en el desarrollo de patologías autoinmunes del SNC en ausencia de patógenos. La respuesta inflamatoria causada por un virus o por una lesión conlleva mayor daño tisular. La liberación de epítopos de mielina propaga la inflamación y favorece las respuestas autoinmunes. Los TLRs de las células gliales también pueden ser activados por ligandos endógenos liberados tras daño tisular, que pueden iniciar o amplificar la inflamación en las patologías del SNC. LPS, lipopolisacárido; PGN, peptidoglicano. (Modificada de Carpentier *et al.*, 2008).

Por lo tanto, la activación de TLR4 contribuye a la muerte neuronal y de oligodendrocitos que se da en el SNC durante procesos infecciosos e inflamatorios. No obstante, cabe recordar que la activación de los TLRs tiene normalmente una función protectora contra los agentes patógenos, e incluso existen estudios que indican su participación en funciones neuroregenerativas, como procesos de remielinización ante estímulos tóxicos puntuales (Glezer *et al.*, 2006; van Noort, 2007). Es más bien su sobreactivación o una activación continuada lo que causa daño tisular y neurodegeneración, sobre todo en células con capacidad regenerativa limitada como las del SNC.

Finalmente, muchas patologías neurodegenerativas cursan con la activación de los TLRs, con la consiguiente estimulación de la vía NF- κ B y con un aumento en la liberación de citoquinas y radicales libres. Estos eventos pueden causar modificaciones en ciertas proteínas de cerebro (proteínas aberrantes), que se acumulan al no ser reconocidas por los sistemas proteolíticos y podrían participar y/o contribuir a los mecanismos de neurodegeneración (Koga *et al.*, 2011).

1.3 Mecanismos de degradación de proteínas

La degradación intracelular de proteínas, o proteólisis, tiene un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular, y afecta a procesos celulares esenciales como la regulación del ciclo celular, el control transcripcional, la transducción de señales, la presentación de antígenos y el recambio proteico (Pickart and Cohen, 2004).

Tabla 1. Alteraciones del SUP y de la vía autofágica/lisosomal en diferentes trastornos neurodegenerativos. Las disfunción en la proteólisis celular pueden ser primaria o secundaria a la patología de las enfermedades, que se agrupan en tautopatías, sinucleopatías y trastornos de expansión de poliglutaminas. Los sustratos se pueden acumular como consecuencia de un defecto en el sistema proteolítico (primaria) o la acumulación de sustratos puede inhibir la proteólisis (secundaria). Por ejemplo, la disrupción de la eliminación lisosomal es una característica primaria de las tautopatías (p.e. enfermedad de Alzheimer), mientras que la inhibición del proteasoma por especies oligoméricas es un efecto secundario en la patología de la enfermedad. En las sinucleopatías están implicadas tanto alteraciones del SUP primarias como secundarias, pero sólo secundarias en la vía de la autofagia-lisosoma. Las inclusiones de poliglutamina están causadas primariamente por cambios en las proteínas sustrato; la proteólisis por SUP y autofagia está implicada sólo secundariamente. EA, enfermedad de Alzheimer; DUB, enzima deubiquitinadora; SUP, sistema ubiquitina-proteasoma. (Adaptada de Nijholt *et al.*, 2011b).

	Primarias	Secundarias
Tautopatías	<p>Disrupción en lisosomas: Tamaño anormal de vesículas endocíticas en cerebro de EA Acumulación temprana de vesículas autofágicas en EA Mutaciones en PS1 impiden la acidificación de lisosomas y la activación de catepsina Activación de la respuesta a proteínas desplegadas</p>	<p>Actividad del proteasoma impedida en EA tardía Disminución de la actividad del proteasoma por especies tau oligoméricas</p>
Sinucleopatías	<p>Mutaciones en componentes del SUP que dificultan la selección de sustratos: Mutaciones en DUBs (p.e. UCH-L1) Disminución en la actividad de ligasas E3 (p.e. parkin) Degeneración de la sustancia negra y aparición de cuerpos de inclusión debido a la inhibición del proteasoma</p>	<p>Disfunción del SUP por especies oligoméricas Mutaciones en α-sinucleína aumentan la formación de agregados e inhiben su degradación Vía autofágica/lisosomal sobrecargada Activación de la respuesta a proteínas desplegadas</p>
Inclusiones de poliglutaminas		<p>Disfunción del SUP por especies oligoméricas de proteínas con expansión de poliglutaminas Vía autofágica/lisosomal sobrecargada Activación de la respuesta a proteínas desplegadas</p>

Existen dos maquinarias proteolíticas principales: el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) y la vía de la autofagia-lisosoma. Se han encontrado disfunciones en ambos sistemas proteolíticos en muchas patologías (Paul, 2008; Todde *et al.*, 2009), entre ellas enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (Ciechanover and Brundin, 2003; Rami, 2009). En este sentido, muchas patologías del SNC cursan con una acumulación de proteínas aberrantes o mal plegadas que produce un efecto tóxico, el cual está empezando a ser conocido como “proteotoxicidad” (Balch *et al.*, 2008; Morimoto, 2008). Por lo tanto, no es de extrañar que la proteólisis esté implicada en procesos neurodegenerativos, ya sea de manera directa o indirecta (Tabla 1).

1.3.1 Sistema ubiquitina-proteasoma

La degradación de una proteína a través del sistema ubiquitina-proteasoma (SUP) comprende dos pasos diferenciados y sucesivos: ubiquitinación y degradación. La proteína sustrato se marca primero mediante unión covalente con múltiples moléculas de una pequeña proteína llamada ubiquitina para generar la cadena de poliubiquitina que sirve como etiqueta o “señal de muerte”. A continuación, la proteína marcada es degradada por el complejo del proteasoma 26S, lo que genera la liberación de ubiquitina libre y reusable mediante la acción de enzimas desubiquitinadoras (DUBs) (Glickman and Ciechanover, 2002).

La ubiquitina es una proteína de 8,5 kDa y 76 aminoácidos muy conservada entre especies. Su conjugación a la proteína sustrato se produce a través de un mecanismo en cascada de tres pasos. Inicialmente,

la enzima activadora de ubiquitina (E1) activa a la ubiquitina en una reacción que requiere ATP para generar un producto intermedio E1-S~ubiquitina de alta energía mediante enlace tioester con una cisteína de E1. Una enzima conjugadora de ubiquitina (E2) transfiere después la ubiquitina activada desde E1 vía otro producto intermedio, E2-S~ubiquitina, al sustrato que está unido específicamente a una enzima ligasa ubiquitina-proteína E3. Según el dominio que contenga la enzima E3, este último paso puede ocurrir directamente desde E2 en el caso de las ligasas E3 con dominio RING, o mediante la formación de un complejo intermedio E3-S~ubiquitina si se trata de ligasas con dominio HECT (“Homologous to the E6-AP C-Terminal domain”). Por tanto, las enzimas E3 catalizan el paso final en el proceso de conjugación, esto es, la unión covalente de la ubiquitina al sustrato. La molécula de ubiquitina se transfiere generalmente a un grupo ϵ -amino de un residuo interno de lisina para generar una enlace covalente isopeptídico, aunque esta unión también se puede producir en el grupo N-terminal de la proteína sustrato. Las moléculas adicionales de ubiquitina se añaden sucesivamente a la ubiquitina previamente conjugada (generalmente en Lys⁴⁸) mediante un mecanismo similar para generar una cadena poliubiquitinada, que será reconocida por la maquinaria encargada de la degradación, el proteasoma 26S.

La degradación de los sustratos poliubiquitinados la lleva a cabo un gran complejo proteico de aproximadamente 2,5 MDa conocido como proteasoma 26S, y que salvo alguna excepción como la enzima ornitina decarboxilasa (ODC), no reconoce sustratos no modificados. El proteasoma es una proteasa multicatalítica que degrada proteínas poliubiquitinadas en

pequeños péptidos. Se compone de dos subcomplejos: el núcleo 20S que lleva a cabo la actividad catalítica y una partícula reguladora 19S.

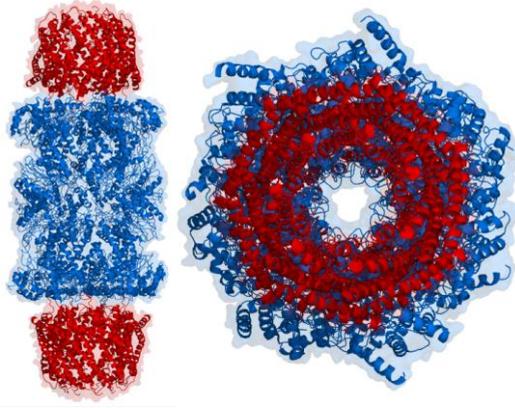


Figura 4. Vistas esquemáticas frontal y superior del proteasoma 26S. Los complejos 19S (en rojo) regulan la entrada de las proteínas sustrato, que son degradadas por las unidades catalíticas que se encuentran en el interior del complejo 20S (en azul). (Tomada de wikipedia.org).

El núcleo 20S es una estructura en forma de barril compuesta por cuatro anillos heptagonales apilados: dos anillos externos idénticos α y dos anillos idénticos internos β (Groll *et al.*, 1997) (Fig. 4). En eucariotas, los anillos α y β están compuestos cada uno por siete subunidades distintas, lo que da al complejo 20S una estructura general $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. Los sitios catalíticos se encuentran en algunas de las subunidades β , en concreto hay tres actividades peptidolíticas diferentes: la de tipo quimotripsina (β_5), la de tipo tripsina (β_2) y la de tipo caspasa (β_1) (Kisselev *et al.*, 2006). Por su parte, las unidades α tienen una naturaleza más estructural. La mayoría de los complejos 20S se encuentran unidos a dos complejos 19S, uno en cada extremo.

La partícula reguladora 19S se puede dividir en dos subcomplejos multisubunidad, la tapa y la base (Glickman *et al.*, 1998). Esta última, que está en contacto directo con el anillo α del complejo 20S, está compuesta por seis ATPasas homólogas (Rpt1-6) y cuatro subunidades sin actividad ATPasa (Rpn1, 2, 10 y 13). Por su parte, la tapa está compuesta por varias proteínas de la familia Rpn (Rpn3, 5-9 y 11-12), incluyendo a la recientemente identificada Rpn15 (Saeki *et al.*, 2004) (Fig. 5).

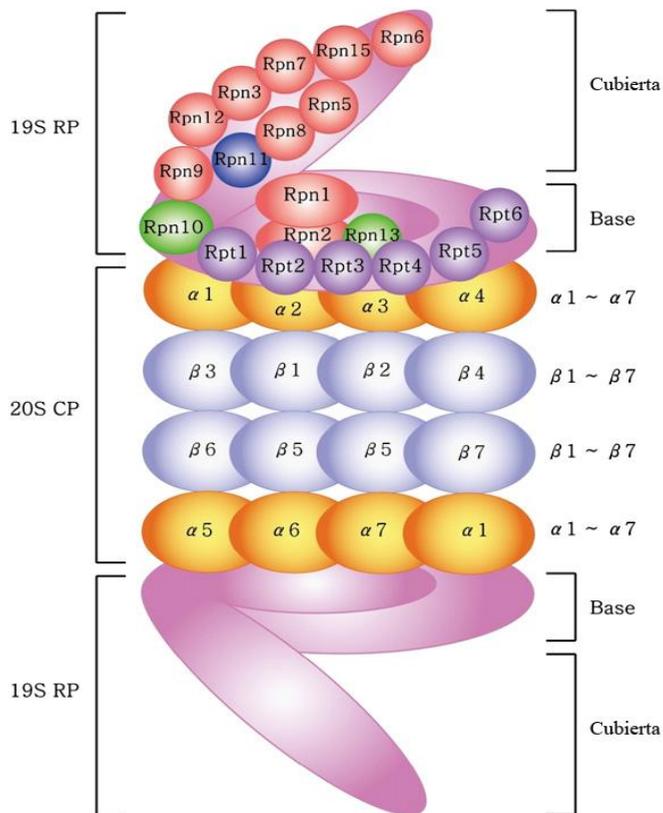


Figura 5. Componentes del proteasoma 26S. El proteasoma está compuesto por un complejo central 20S formado por cuatro anillos ($\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$) y dos partículas 19S, una a cada lado, constituidas principalmente por subunidades Rpt con actividad ATPasa y subunidades Rpn. RP: Partícula reguladora; CP: Partícula nuclear. (Kwak *et al.*, 2011).

En conjunto, el complejo 19S está compuesto por 19 subunidades. Una de sus funciones más importantes es reconocer proteínas ubiquitinadas y otros posibles sustratos del proteasoma. Hasta el momento se han identificado tres subunidades que unen ubiquitina: Rpn10, Rpn13 y Rpt5 (Lam *et al.*, 2002); aunque su importancia y mecanismo de acción están aún por esclarecer. Otra de las funciones del complejo 19S es abrir un orificio en el anillo α que permita la entrada del sustrato en la cámara proteolítica. También se asume que el complejo 19S se ocupa del desdoblamiento de las proteínas (actividad de tipo chaperona) (Braun *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002), ya que si las proteínas estuvieran plegadas no podrían pasar a través del estrecho canal proteasómico. Estas dos funciones son llevadas a cabo por las seis subunidades Rpt (Braun *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2007), las cuales también se encargan de producir la energía metabólica necesaria para estos procesos a partir del ATP gracias a su actividad ATPasa.

Después de la degradación, los péptidos derivados del sustrato son liberados junto con la ubiquitina reusable, y siguen siendo degradados a aminoácidos por amino y carboxi-peptidasas. Una pequeña fracción de estos péptidos son translocados a través del retículo endoplasmático (RE), se unen a moléculas CMH de tipo I y son presentadas a células T citotóxicas. Por lo tanto, una de las funciones del SUP es la generación de antígenos para su presentación (Goldberg *et al.*, 2002). Sin embargo, cabe destacar que la degradación proteica no siempre es completa. En algunos casos, el proteasoma procesa el sustrato ubiquitinado de forma precisa en lugar de destruirlo completamente, y libera un producto truncado. En el caso de NF- κ B por ejemplo, una subunidad activa (p50 o p52), se libera de un precursor inactivo mayor (p105 o p100, respectivamente) (Ben-Neriah, 2002).

La cantidad de proteínas que se degradan a través de esta vía es muy extensa, incluyendo reguladores del ciclo celular como las ciclinas, supresores tumorales, activadores y represores transcripcionales, receptores celulares de superficie y proteínas mutadas, desnaturalizadas o mal plegadas. Por ello, la proteólisis mediada por ubiquitina está relacionada con una enorme cantidad de procesos celulares básicos, como: 1) la regulación del ciclo celular, diferenciación y desarrollo, 2) respuesta celular a estrés y efectores extracelulares, 3) morfogénesis de redes neuronales, 4) modulación de los receptores celulares de superficie y canales iónicos, 5) reparación de DNA, 6) regulación transcripcional, 7) procesos de silenciamiento, 8) memoria a largo plazo, 9) ritmos circadianos, 10) biogénesis de orgánulos y 11) regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. En resumen, el sistema ubiquitina-proteasoma es un componente esencial en el control de calidad celular y en los mecanismos de defensa (Goldberg, 2007).

Bajo la influencia de ciertas citoquinas, como por ejemplo IFN- γ , el proteasoma puede ver modificada su composición (Pickart and Cohen, 2004). Las partículas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ son sustituidas por subunidades homólogas denominadas $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$, que alteran ligeramente las actividades catalíticas. Los complejos 19S también son intercambiados por las partículas reguladoras PA28 (también conocidas como 11S), compuestas por subunidades PA28 α (o también PSME1) y PA28 β (PSME2) que carecen de actividad ATPasa (Li and Rechsteiner, 2001; Mishto *et al.*, 2008). A esta nueva conformación se le denomina inmunoproteasoma (Fig. 6).

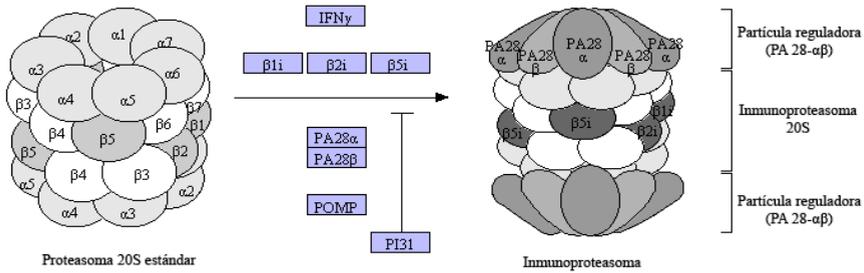


Figura 6. El IFN- γ induce la formación del inmunoproteasoma. Las subunidades catalíticas β_1 , β_2 y β_5 son sustituidas por sus homólogas β_{1i} , β_{2i} y β_{5i} . Se unen también las partículas reguladoras PA28, formadas por unidades α y β . (Tomada de Nijholt *et al.*, 2011b).

El inmunoproteasoma favorece la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I durante la respuesta inmune, la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias y la diferenciación y proliferación de células T. Además de estas funciones inmunológicas, el inmunoproteasoma mitiga el estrés oxidativo, regula el crecimiento de las células tumorales y controla la masa muscular (Angeles *et al.*, 2012).

1.3.2 Sistema ubiquitina-proteasoma y neuro-degeneración

El sistema ubiquitina-proteasoma es el encargado de degradar una enorme cantidad de proteínas. Además, modificaciones por proteínas de tipo ubiquitina o proteínas con motivos que interactúen con ella modulan la acción de muchas otras. Por lo tanto, la degradación, modificación o el procesamiento mediados por ubiquitina intervienen en una gran cantidad de procesos celulares básicos. No es de extrañar entonces que aberraciones

en el sistema ubiquitina-proteasoma se hayan visto implicadas en muchas patologías, entre ellas tumores, disfunciones en la respuesta inflamatoria e inmune o enfermedades neurodegenerativas. Los estados patológicos asociados con el sistema ubiquitina-proteasoma pueden dividirse principalmente en dos grupos: 1) aquellos que resultan de una pérdida de función, es decir, mutaciones en una enzima o sustrato diana que tienen como consecuencia la estabilización de una proteína; y 2) aquellos que resultan de una ganancia de función, esto es, degradación acelerada o anormal de una proteína diana. Por ejemplo, un defecto de función puede provocar que oncogenes diana del sistema ubiquitina-proteasoma como N-myc, c-myc, c-fos, c-jun o Src no sean degradados correctamente y puedan producir la aparición de un cáncer. Del mismo modo, un exceso de actividad puede provocar la degradación excesiva de genes supresores de tumores como p53, como ocurre en el carcinoma uterino cervical, o p27^{Kip1}, como es el caso en algunos cánceres colorrectales, de próstata y de mama (Ciechanover, 2003). También se pueden producir mutaciones en la maquinaria de ubiquitinación, por ejemplo en los genes von Hippel-Lindau (VHL), que codifican para proteínas claves en el proceso de ubiquitinación de múltiples proteínas.

Sin embargo, donde más interés despierta la implicación del sistema ubiquitina-proteasoma es en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, muchas de las cuales cursan con una acumulación de agregados proteicos insolubles en el interior celular. El caso de la enfermedad de Parkinson (EP) es probablemente el que mejor representa la complejidad de la participación del SUP en la patogénesis de la neurodegeneración. Esta patología surge por la acumulación en los

denominados cuerpos de Lewis (CLs) de α -sinucleína, una proteína implicada en la neurotransmisión y liberación de dopamina. Se caracteriza por la muerte progresiva de neuronas en la sustancia negra, lo que causa un desarrollo gradual de rigidez y temblor. Mientras que en las formas más comunes de Parkinson los mecanismos patogénicos no se conocen con exactitud, se han identificado dos mutaciones en el extremo amino de la α -sinucleína en casos raros y hereditarios de Parkinson autosómico dominante, las cuales la hacen menos susceptible a ser degradada. Además, los agregados que forma esta proteína son capaces de unirse al proteasoma e inhibir su función, por lo que la implicación del proteasoma sería secundaria a la causa principal de la enfermedad. Sin embargo, también existen otros casos en los que alteraciones en el proteasoma son causa directa de la patología. Por ejemplo, en la forma juvenil de Parkinson recesiva (AR-JP) la proteína mutada Parkin, una enzima ligasa E3, es la responsable de una acumulación proteica; mientras que mutaciones en las enzimas DUBs, como por ejemplo la hidrolasa de ubiquitina carboxi-terminal UCH-L1, originan una disminución en la cantidad de ubiquitina libre que en último término provoca una disfunción del SUP (Leroy *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 2003; Osaka *et al.*, 2003).

Estos casos raros de Parkinson arrojan luz sobre los mecanismos patogénicos básicos causantes de la neurodegeneración, los cuales podrían también ser relevantes en la forma esporádica más prevalente y de aparición tardía de Parkinson (Giasson and Lee, 2003). En este sentido, junto con la tendencia a acumular proteínas oxidadas con la edad, la incapacidad del SUP para eliminar proteínas anormales o mal plegadas podría subyacer como causa en la degeneración de las células de la

sustancia negra en el Parkinson esporádico (McNaught and Olanow, 2003). Se ha descubierto que algunas subunidades α del complejo 20S del proteasoma 26S se pierden (McNaught *et al.*, 2002), y que las actividades enzimáticas se ven impedidas en las células de la sustancia negra (McNaught and Jenner, 2001). Además, la partícula reguladora 19S también estaba disminuida, y los niveles del complejo PA28 eran prácticamente indetectables en la sustancia negra en comparación con otras áreas cerebrales (McNaught *et al.*, 2003). Llama la atención que estos cambios eran más apreciables en zonas de la sustancia negra con más células que en aquellas en las que la muerte neuronal estaba ya más avanzada. Por todo esto, se ha propuesto un modelo en el que el estrés proteolítico junto con un defecto en el procesamiento de proteínas es crucial en la patogénesis del Parkinson esporádico y que las neuronas de la sustancia negra son especialmente vulnerables debido a su alto contenido de dopamina (Lotharius and Brundin, 2002; McNaught and Olanow, 2003). Esto, junto con los bajos niveles de los complejos 19S y PA28 haría a las células más susceptibles al estrés proteolítico.

Las tautopatías son otro de los grupos de enfermedades neurodegenerativas en los que se ha implicado al SUP. Tau es una proteína implicada en la estabilización de microtúbulos, cuya forma hiperfosforilada se acumula en cuerpos de inclusión citoplasmáticos insolubles (de *et al.*, 2003). La enfermedad más representativa y prevalente de este grupo es la de Alzheimer (EA), que se caracteriza por la acumulación intracelular de tau en ovillos neurofibrilares y la acumulación extracelular del péptido β -amiloides ($A\beta$) en placas seniles, lo que provoca demencia y pérdida de memoria. Igual que en la EP, los casos familiares de EA son los menos (sólo

un 5% de EA con herencia autosómica dominante; (Forloni *et al.*, 2002)), pero son los que sientan las bases para descubrir los posibles mecanismos patogénicos implicados en los casos esporádicos, cuya etiología no se conoce con exactitud. Así, se ha demostrado que la EA puede ser causada por mutaciones en el gen APP que darían lugar a un péptido que tiene más tendencia a agregar consigo mismo. También se han descrito mutaciones en los genes presenilina PS1 y PS2, que codifican para proteínas que pueden cambiar el procesamiento de APP alterando la actividad secretasa y (Hardy and Selkoe, 2002).

En cuanto a la implicación del SUP, se ha demostrado que el péptido A β puede ser degradado por el proteasoma en neuronas y astrocitos en cultivo (Lopez *et al.*, 2003) y estudios tisulares postmortem han encontrado una reducción en la actividad proteasómica en regiones específicas del cerebro de pacientes con EA (Keller *et al.*, 2000). La hipótesis propuesta sería que los filamentos helicoidales presentes en los ovillos neurofibrilares de tau son los responsables de esta reducción, ya que existen estudios que demuestran que estos filamentos pueden inhibir la función del proteasoma y además coimmunoprecipitan con él (Keck *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2000). Otros estudios prueban que la actividad de enzimas implicadas en el proceso de ubiquitinación como E1 y E2 también está disminuida en pacientes con EA (Lopez *et al.*, 2000). En conjunto, las evidencias sugieren que la actividad del SUP se encuentra reducida en pacientes con EA (Cecarini *et al.*, 2007; Keck *et al.*, 2003; Keller *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2000), y que tanto la acumulación de A β como la de tau son importantes en el proceso. Sin embargo, se desconoce con exactitud si es la reducción de la actividad del proteasoma la que causa la acumulación de las

placas amiloides y tau, o son sus cambios conformacionales los que causan la inhibición del proteasoma. Con la edad, tanto la habilidad para conjugar proteína en respuesta a estrés (Shang *et al.*, 1997) como la actividad proteasómica en sí disminuyen en cerebro (Keller *et al.*, 2002), con lo que este sería menos capaz de lidiar con proteínas aberrantes como el A β . Sin embargo, también se ha demostrado que el propio A β , al igual que tau, es capaz de reducir la actividad del proteasoma en lisados de reticulocito (Gregori *et al.*, 1995), lo que sugiere que este péptido sería el responsable de la reducción funcional del SUP observada en cerebros con EA. Por otra parte, una mutación en el gen de la ubiquitina de tipo B, conocida como UBB⁺¹ (van Leeuwen *et al.*, 2000), genera una ubiquitina con una secuencia extra de 19 aminoácidos capaz de inhibir el proteasoma (De Vrij *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2000). Por lo tanto, lo que queda claro es que las evidencias experimentales existentes ponen de manifiesto que el SUP tiene un papel clave en la patogénesis de la EA, ya sea como factor primario o secundario.

Finalmente, se ha relacionado el SUP con patologías de expansión de repeticiones CAG (extensión de poliglutamina) con inclusiones nucleares (Gusella and MacDonald, 2000), como la enfermedad de Huntington (EH) o las ataxias espinocerebelares. Estas se caracterizan por la presencia de una proteína mutada, por ejemplo la huntingtina (EH) (Ross and Tabrizi, 2011; Sieradzan *et al.*, 1999) o la ataxina (ataxias) (Bauer and Nukina, 2009), con un gran número de residuos de glutamina. Los síntomas y el perfil neuropatológico difieren según la proteína mutada, por lo que los pacientes muestran diferentes combinaciones de síntomas motores, psiquiátricos, cognitivos y sensoriales. En todos los casos parece ser que la implicación del

SUP tiene en este tipo de afecciones un rol secundario, ya que son las acumulaciones oligoméricas de las proteínas mutadas las que inhiben al SUP (Díaz-Hernández *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Verhoef *et al.*, 2002).

Además, recientemente se ha puesto de manifiesto la implicación de la forma inducible del proteasoma en trastornos neurodegenerativos (Bendotti *et al.*, 2012; Nijholt *et al.*, 2011a), principalmente debido a su acción proinflamatoria (Basler *et al.*, 2010; Muchamuel *et al.*, 2009). De hecho, el uso de inhibidores de su actividad se ha descrito no sólo en patologías neurodegenerativas (Shah and Di, 2007), sino también en otros trastornos inflamatorios (Chen *et al.*, 2012a) e incluso cáncer (Jones *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2012).

1.3.3 Vía de la autofagia-lisosoma

El término “autofagia” (del griego, “auto” uno mismo y “fagia” comer) se refiere a cualquier vía de degradación celular que comprende la entrega de una carga al lisosoma (Cuervo, 2004; Mizushima and Klionsky, 2007). Se conocen al menos tres formas de autofagia: autofagia mediada por chaperonas (AMC), microautofagia y macroautofagia; que difieren en sus funciones fisiológicas y en el modo de entrega de la carga a degradar. Sin embargo, cuando se habla de autofagia se suele hacer referencia a la macroautofagia, el mayor mecanismo catabólico regulado que usan las células eucarióticas para degradar proteínas de gran vida media y orgánulos. Esta forma de autofagia consiste en la entrega de la carga citoplasmática secuestrada en vesículas de doble membrana a los lisosomas. Los pasos iniciales del proceso incluyen la formación (nucleación

vesicular) y la expansión (elongación vesicular) de una membrana de aislamiento, que se conoce como fagóforo. Entonces los bordes del fagóforo se fusionan (terminación de la vesícula) para formar el autofagosoma, una vesícula de doble membrana que secuestra el material citoplásmico. A ello le sigue la fusión del autofagosoma con un lisosoma para formar un autofagolisosoma o autolisosoma, donde finalmente se degrada el material capturado junto con la membrana interna por la acción de unas proteasas llamadas catepsinas (Fig. 7).

La autofagia es una vía de degradación esencial para la supervivencia, diferenciación, desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis. No sólo provee nutrientes para mantener las funciones celulares durante situaciones de estrés, como el ayuno, sino que también puede eliminar orgánulos dañados, proteínas mal plegadas y microorganismo invasores. En condiciones normales, la autofagia ocurre a niveles basales bajos en prácticamente todas las células, manteniendo así la homeostasis mediante procesos como el recambio proteico y de orgánulos. Los niveles de autofagia aumentan rápidamente cuando hay una necesidad de nutrientes intracelulares y energía, por ejemplo durante el ayuno, depleción de factores de crecimiento o altas demandas energéticas. También se incrementa cuando las células van a someterse a una reestructuración como por ejemplo durante algunas fases del desarrollo, o para deshacerse de compuestos citoplásmicos dañinos, por ejemplo durante el estrés oxidativo, infección o acumulación de agregados proteicos. Además, se trata de un proceso biológico que está emergiendo recientemente como una vía esencial para promover la salud y la longevidad (Madeo *et al.*, 2010; Pyo *et al.*, 2013).

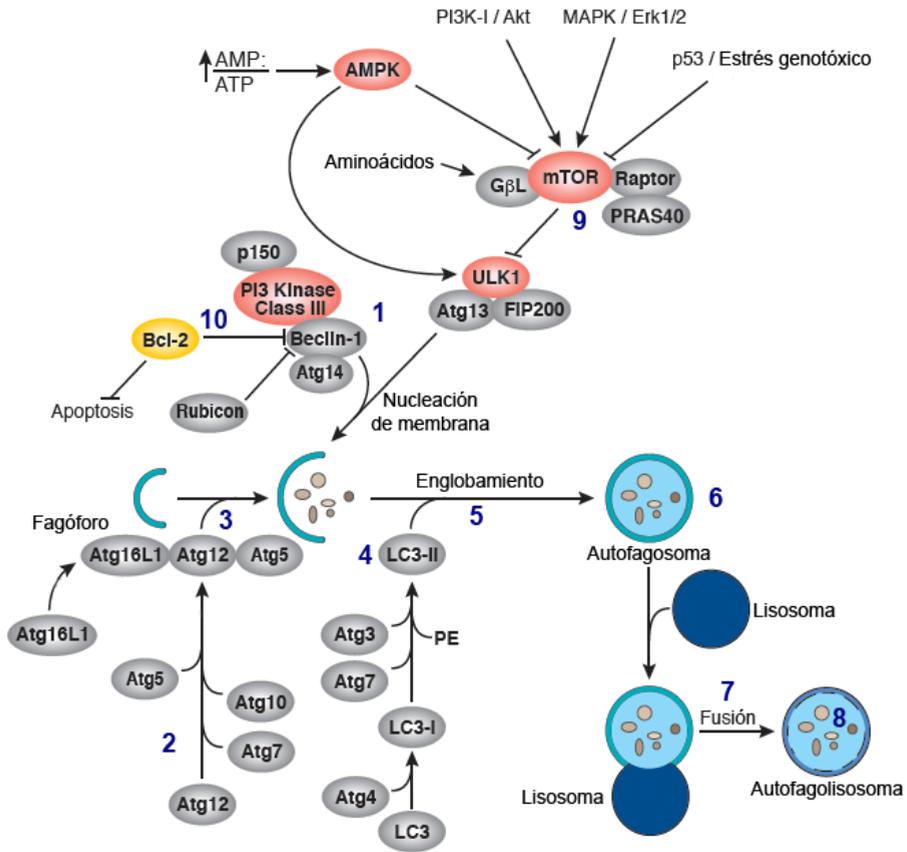


Figura 7. Esquema de la vía autofágica/lisosomal. La formación del fagóforo es iniciada por el complejo p150-PI3K III-Beclin 1-Atg14 (1) y comprende la acción secuencial de diversas proteínas Atg (2). El complejo Atg5/12/16 (3) y LC3-II (4) están implicados en la formación del autofagosoma y forman parte de la membrana. El elemento a degradar es engullido por la membrana (5), formando el autofagosoma (6). La fusión del autofagosoma con un lisosoma produce la formación de un autofagolisosoma (7) y la subsiguiente degradación del material engullido (8). La señalización por mTOR regula negativamente la autofagia (9), así como también lo hace la interacción de Beclin 1 con la proteína antiapoptótica Bcl2 (10). (Modificada de Cell Signaling; www.cellsignal.com).

A nivel molecular, se han identificado más de 35 genes ATG (relacionado con la autofagia, “Autophagy-related”) en levadura que codifican para proteínas Atg altamente conservadas entre especies,

encargadas de regular el proceso autofágico (Mizushima and Klionsky, 2007; Mizushima *et al.*, 2011). Algunas de ellas se asocian para formar complejos que intervienen durante distintas fases de la autofagia, por ejemplo: el complejo serina/treonina quinasa que participa en el proceso de **inducción** (Atg1/ULK1, Atg13, Atg17/FIP200); el complejo lípido quinasa que media en la **nucleación vesicular** (Atg6/Vps30/Beclin 1, Atg14, Vps34/PI3K III, Vps15/p150); dos vías de **conjugación** de tipo ubiquitina que intervienen en la expansión vesicular (los sistemas Atg8/LC3-fosfatidiletanolamina (PE) y Atg5-Atg12); una vía de **reciclaje** que regula el desensamblaje de proteínas Atg de autofagosomas maduros (Atg2, Atg9, Atg18); y permeasas vacuolares que permiten el eflujo de aminoácidos del compartimento degradativo (Atg22).

Un regulador clave de la autofagia es mTOR, que constituye la mayor señal inhibitoria para reducir la autofagia en presencia de factores de crecimiento y nutrientes abundantes. La vía de señalización PI3K-I/Akt activa mTOR por procesos de fosforilación, y reprime así la autofagia en respuesta a insulina y otros factores tróficos (Lum *et al.*, 2005). Otras moléculas reguladoras de mTOR, y por extensión de la autofagia, incluyen la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), que responde ante la falta de sustratos energéticos; proteínas con dominios de unión de homología a Bcl-2 (BH3), que interrumpen la interacción de Bcl-2 con Beclin 1 y permiten su participación en el complejo que media la nucleación vesicular; la proteína supresora tumoral p53; y ERK 1/2 (Maiuri *et al.*, 2007; Meijer and Codogno, 2006; Rubinsztein *et al.*, 2007).

Por último, cabe destacar la relación existente entre autofagia y proteasoma. Estudios recientes prueban que ambos sistemas, en contra de lo que se ha pensado tradicionalmente, trabajan conjuntamente en la degradación de proteínas (Koga *et al.*, 2011; Nijholt *et al.*, 2011b), e incluso se han encontrado algunas de las estructuras responsables de esta cooperación. Por ejemplo, se ha propuesto que Atg8/LC3 puede funcionar como receptor de un sustrato selectivo, p62/SQSTM1 (Bjorkoy *et al.*, 2005), el cual interviene en una gran variedad de rutas de señalización (Moscat *et al.*, 2007; Wooten *et al.*, 2006) y se encuentra mutado en algunas patologías inflamatorias como la enfermedad de Paget (Laurin *et al.*, 2002). Independientemente de estas funciones, p62/SQSTM1 se une a LC3 y es degradada preferentemente por la autofagia. Además, ya que p62/SQSTM1 posee un dominio de unión a ubiquitina, se ha propuesto que las proteínas ubiquitinadas y cuerpos de inclusión podrían ser reclutados hasta el autofagosoma vía p62/SQSTM1 (Bjorkoy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007) (Fig. 8). Precisamente por ello, la visión tradicional de la autofagia como un sistema de degradación al por mayor, inespecífico y que se ocupa exclusivamente de la renovación de orgánulos y degradación de proteínas de vida media larga está cada vez más en entredicho. Parece ser que existe también una autofagia selectiva que es capaz de degradar proteínas de una forma específica (Iwata *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007), aunque los mecanismos por los cuales esto es posible todavía han de ser esclarecidos.

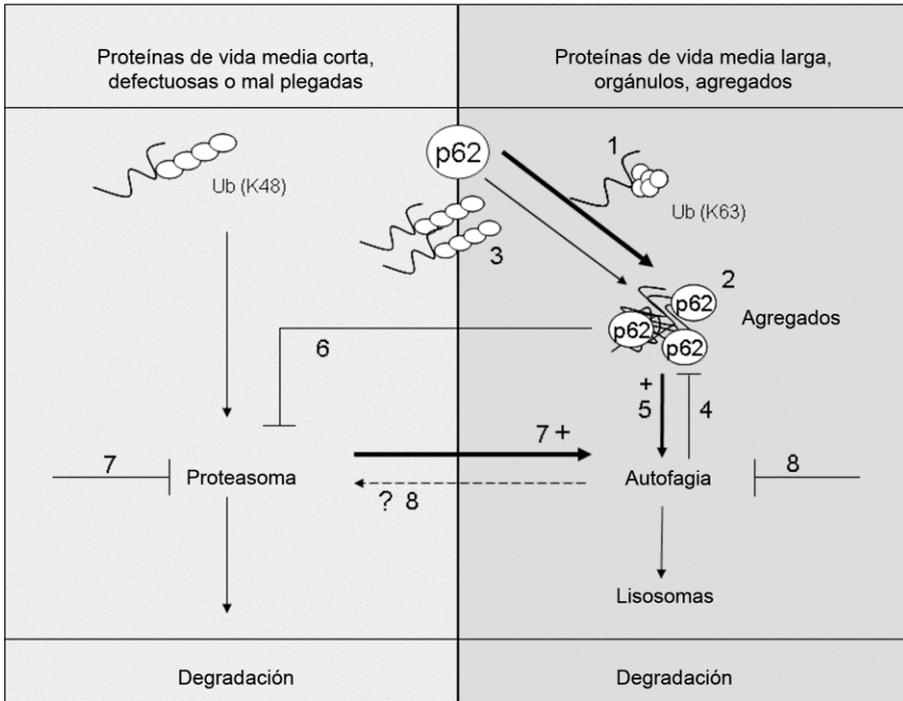


Figura 8. Comunicación entre el SUP y la autofagia, y función de p62 en la degradación selectiva por autofagia de proteínas ubiquitinadas. Tanto el SUP como la autofagia están implicados en la degradación de proteínas ubiquitinadas; en condiciones fisiológicas, degradan proteínas ubiquitinadas en K48 o K63, respectivamente. Sin embargo, durante periodos de estrés, se pueden degradar por autofagia sustratos que normalmente se digieren por el proteasoma. De esta forma, aunque p62 se une preferentemente a proteínas ubiquitinadas en K63 (1) y promueve la formación de agregados (2) que son degradados por la vía de la autofagia, también puede unirse a proteínas ubiquitinadas en K48 (3) y “desviarlas” hacia la vía autofágica cuando estas no son degradadas por el proteasoma de forma eficiente. Los niveles de p62 pueden ser regulados por el proceso autofágico (4) y la unión de p62 a proteínas poli-ubiquitinadas en K63 estabiliza LC3, estimulando de esta forma la autofagia (5). Además, los complejos p62/K63 inhiben la degradación proteasomal (6). La inhibición del proteasoma activa la autofagia (7), pero lo contrario no ha sido demostrado (8). Ello indica que una de las funciones del sistema de la autofagia-lisosoma es la de actuar como respaldo del sistema ubiquitina-proteasoma y se activa cuando este sistema es incapaz de ocuparse de toda la carga proteica a degradar. (Tomada de Nijholt *et al.*, 2011b).

1.3.4 Vía de la autofagia-lisosoma y neurodegeneración

Debido a la gran cantidad de procesos celulares básicos relacionados en los que interviene, la autofagia es un proceso esencial para la salud humana, y defectos en el proceso autofágico se han relacionado con una gran variedad de patologías, como por ejemplo cáncer (Levine, 2007; Mathew *et al.*, 2007), enfermedades de acumulación lisosomal (Tanaka *et al.*, 2000), infecciosas (Amano *et al.*, 2006; Levine and Kroemer, 2008), musculares (Bolanos-Meade *et al.*, 2005; Lunemann *et al.*, 2007) o del corazón (Terman and Brunk, 2005).

Puesto que la autofagia es un proceso esencial a la hora de eliminar agregados proteicos, esta también se ha visto implicada en muchas enfermedades neurodegenerativas, ya que las neuronas son especialmente sensibles a estas acumulaciones. A pesar de que, como se ha comentado anteriormente, la primera vía de eliminación para las proteínas solubles mal plegadas suele ser el proteasoma, cuando este se ve sobrepasado y las proteínas comienzan a formar oligómeros tóxicos se hace necesaria la intervención de procesos autofágicos. De hecho, muchos de los pacientes que sufren este tipo de enfermedades acumulan vacuolas autofágicas con agregados proteicos ubiquitinados. Por lo tanto, la vía de la autofagia también está implicada en muchas de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el SUP, como la EA, la EP o la EH (Levine and Kroemer, 2008; Rubinsztein, 2006). Esto es de gran importancia, ya que pone de manifiesto que ambos sistemas proteolíticos no son independientes como se creía en un principio, sino que interaccionan (Koga *et al.*, 2011; Komatsu *et al.*, 2006; Nijholt *et al.*, 2011b)

y pueden actuar de forma compensatoria (Ding *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2007).

A pesar de que la autofagia puede causar enfermedad tanto por exceso como por defecto, en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas parece que la inducción de la autofagia tiene un efecto neuroprotector y que niveles de autofagia inadecuados o defectivos serían responsables de la muerte neuronal en la mayoría de patologías (Wong and Cuervo, 2010). En este sentido, diversos estudios muestran que ratones con delección de los genes Atg5 (Hara *et al.*, 2006) y Atg7 (Komatsu *et al.*, 2006) sufren una severa neurodegeneración en el SNC. Sin embargo, también existe alguna excepción a esta norma, ya que existen diversos casos en los que una actividad autofágica excesiva resulta perjudicial para la supervivencia celular, como se ha demostrado en células de Purkinje cerebelares (Yue *et al.*, 2002) o en cerebros de pacientes con la EA (Canu *et al.*, 2005).

La EP fue una de las primeras patologías neurodegenerativas en ser asociadas con la autofagia, y es por lo tanto una de las más estudiadas. Se sabe que la α -sinucleína se degrada en parte por procesos autofágicos, como macroautofagia y AMC (Cuervo *et al.*, 2004; Mak *et al.*, 2010; Vogiatzi *et al.*, 2008; Webb *et al.*, 2003). Además, ratones *knockout* (KO) para ATG5 o Beclin 1 desarrollan déficits motores, reflejos anormales y acúmulos de cuerpos de inclusión ubiquitinados en las neuronas. Por el contrario, la sobreexpresión de Beclin 1 reduce la agregación de α -sinucleína y la patología neuronal (Spencer *et al.*, 2009).

En la EA también se han detectado alteraciones de la vía de la autofagia (Alirezai *et al.*, 2008; Nixon, 2007), y se ha observado la

acumulación de vacuolas autofágicas en neuritas (Nixon *et al.*, 2005), que parecen ser autofagosomas incapaces de madurar y convertirse en autolisosomas (Funk *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2005). Al igual que en la EP, se han detectado bajos niveles de Beclin 1 en cerebro, y su sobreexpresión parece reducir la acumulación del péptido A β (Pickford *et al.*, 2008). Además, mutaciones en el gen de la presinilina-1, PS1, parecen entorpecer la acidificación lisosomal y la activación de catepsinas (Lee *et al.*, 2010).

Por último, también en enfermedades con extensión de glutaminas como la EH se han encontrado alteraciones en la vía de la autofagia. Diferentes estudios muestran que la activación de esta vía mediante rapamicina atenúa la acumulación de huntingtina y la pérdida neuronal (Ravikumar *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009a). Sin embargo, todavía se desconoce qué causa la disminución en los niveles de autofagia, aunque se especula con que la huntingtina *wild type* (wt) tenga un papel en la regulación de la autofagia, que se vea afectado por la repetición de tripletes en la huntingtina mutante (Cheung and Ip, 2011).

En resumen, ambos mecanismos proteolíticos están involucrados en varias de las patologías neurodegenerativas más frecuentes. Éstas están asociadas con la formación de agregados ricos en proteínas ubiquitinadas (Huang and Figueiredo-Pereira, 2010), que resultan en la formación de cuerpos de inclusión. Aunque los productos acumulados en cada caso sean similares (agregados proteicos que interactúan con componentes del SUP y de la vía autofágica), los eventos que causan su formación pueden ser muy específicos. Además, los defectos en la proteostasis pueden ser tanto primarios como secundarios a la patogénesis de la enfermedad, lo que influye en gran medida en la adopción de medidas terapéuticas.

Finalmente, aunque los grupos específicos de neuronas afectados por cada patología sean distintos, comparten la incapacidad para degradar proteínas ubiquitinadas y por tanto es muy probable que el mal funcionamiento de ambos sistemas proteolíticos esté implicado en la muerte neuronal observada (Moore *et al.*, 2003), y prueba de ello son todos los componentes del SUP y de la autofagia afectados por mutaciones en enfermedades neurodegenerativas (parkin y UCH-L1 en EP; enzimas E1 y E2, y UBB⁺¹ en EA; o ATGs y Beclin 1 en EP y EA).

1.4 Alcohol y proteólisis

El etanol se oxida a acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) o por la citocromo P450 2E1 (CYP2E1) principalmente en el hígado, proceso en el cual también se generan especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). Estos compuestos son altamente tóxicos para las células, y además de haberse demostrado su implicación en numerosas enfermedades neurodegenerativas, también se han relacionado con deficiencias en los sistemas proteolíticos. Las modificaciones oxidativas de de las proteínas pueden resultar en una función proteica alterada, además de incrementar su hidrofobicidad, lo cual genera una tendencia a la agregación proteica (Dasuri *et al.*, 2010). Por ello, tanto la autofagia como el proteasoma son procesos esenciales en la eliminación del estrés oxidativo y la toxicidad generados por el etanol.

Estudios recientes demuestran que el etanol puede alterar la autofagia en patologías hepáticas (Ding *et al.*, 2011b; Osna *et al.*, 2011).

Estos trabajos señalan la implicación del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) en la acumulación lipídica y la reducción de los niveles de autofagia durante la administración de etanol en células humanas de hepatoma (Thomes *et al.*, 2013), o durante el desarrollo de esteatosis hepática alcohólica (Wu *et al.*, 2012). Otros análisis *in vitro* de distintas líneas celulares señalan que la autofagia es esencial en la reducción de la toxicidad causada por el etanol, ya que mientras que inductores de esta vía como la rapamicina disminuyen la apoptosis, inhibidores como la wortmanina la agravan (von Haefen *et al.*, 2011).

La vía del proteasoma también se ha relacionado recientemente con los mecanismos hepatotóxicos del etanol. Diferentes trabajos demuestran que el metabolismo del etanol a través de CYP2E1 produce ROS que inhiben la actividad del proteasoma, acumulándose proteínas oxidadas que dañarían a los hepatocitos (Osna and Donohue, Jr., 2007). Por otra parte, otros estudios prueban que la inhibición selectiva del proteasoma con PS-341 (bortezomib) es beneficiosa en la hepatopatía alcohólica, al aumentar los niveles de las enzimas antioxidantes, encargadas de eliminar las ROS (Bardag-Gorce *et al.*, 2011).

Debido a que el etanol se metaboliza principalmente en el hígado, es en este órgano donde más se ha estudiado su relación con los procesos proteolíticos. Sin embargo, el etanol se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal y se distribuye por todo el cuerpo incluyendo el cerebro, ya que puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica debido a su hidrofobicidad, por lo que los efectos nocivos del etanol no sólo se limitan al hígado. Actualmente se desconocen los mecanismos patológicos implicados en otros órganos, y sólo recientemente se está empezando a

investigar la participación de los mecanismos de degradación de proteínas en el daño causado por el etanol en órganos como corazón (Ge and Ren, 2012; Guo *et al.*, 2012) o cerebro (Chen *et al.*, 2012b).

2 OBJETIVOS

Basándonos en los antecedentes expuestos, la **hipótesis de partida** que proponemos es que *“el etanol, al interactuar con los receptores TLRs, activa su señalización vía NFκB, conduciendo a la producción de citoquinas y radicales libres. El consumo crónico de alcohol causaría un exceso de radicales libres que inducirían un aumento y acumulación de proteínas oxidadas y restos celulares, eventos que podrían estar relacionados con alteraciones del sistema ubiquitina-proteasoma y de la vía de la autofagia-lisosoma. El aumento de restos celulares (DAMPs), junto con el propio etanol, activaría a su vez a los receptores TLR4, lo que conllevaría la aparición de una mayor neuroinflamación y neurodegeneración”*.

En base a esta hipótesis, los **objetivos** han sido los siguientes:

- 1) Estudiar si el abuso crónico de alcohol altera la composición y/o la función del sistema ubiquitina-proteasoma en corteza cerebral de ratones C57BL/6.
- 2) Evaluar si el consumo crónico de alcohol afecta a la capacidad degradativa de la vía de la autofagia-lisosoma en corteza cerebral.
- 3) Confirmar la implicación de los mecanismos de degradación de proteínas en el daño causado por el etanol a las células gliales, mediante la estimulación aguda con alcohol en cultivos primarios de astrocitos y microglía.

4) Investigar la participación del receptor TLR4 en los cambios producidos por el alcohol en ambos sistemas proteolíticos, a través del estudio de dichas alteraciones en ratones y cultivos TLR4-KO.

5) Evaluar si tratamientos farmacológicos que modulen los sistemas proteolíticos previenen la neuroinflamación asociada al consumo crónico de alcohol.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Para el desarrollo de este proyecto de investigación, se trabajó con ratones macho C57BL/6 silvestres o *wild type* (WT) (Harlan Ibérica, Barcelona, España) y *knockout* (KO) para TLR4 (TLR4-KO; de fondo genético C57BL/6, cedidos por el Dr. Akira, Universidad de Osaka, Suita, Japón) de entre 6-7 semanas de vida. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de ciclos de luz y oscuridad (12/12 h), temperatura (23°C) y humedad (60%). Todos los protocolos de experimentación con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación con Animales del CIPF (CEBA), siguiendo las pautas establecidas por el Consejo Directivo de la Comunidad Europea (86/609/ECC), y por el Real Decreto Ley 1201/2005.

3.2 Cultivos

En este trabajo se han empleado cultivos primarios de astrocitos y microglía. El manejo de los cultivos se ha realizado en condiciones de esterilidad y en cabina de flujo laminar (Faster Bio 48; Faster, Cremona, Italia). Todo el material empleado ha sido estéril: las placas y jeringuillas de Becton Dickinson (BD, Nueva Jersey, EEUU), las pipetas y tubos de Corning Costar (Nueva York, EEUU), los filtros de VWR (Pensilvania, EEUU), y los reactivos y medios de cultivo de Gibco (Life Technologies, California, EEUU). Los cultivos se han mantenido en estufa húmeda (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) a 37°C con un 5% de CO₂.

3.2.1 Cultivo primario de astrocitos

Los cultivos de astrocitos (protoplasmáticos o de tipo I) se realizaron a partir de corteza cerebral de ratones P0 (postnatal 0, recién nacidos) WT y TLR4-KO, siguiendo protocolos anteriores (Renau-Piqueras *et al.*, 1989). Se extrajeron los cerebros, se separaron las cortezas, y se disgregaron en medio DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) mediante aspiración y posterior agitación en vórtex durante un minuto. Posteriormente se filtró el extracto celular a través de una malla de nylon de 90 μm de poro y se procedió a su siembra. El medio empleado fue DMEM suplementado con 20% (v/v) de suero bovino fetal (SBF), y 1% de fungizona (2,5 $\mu\text{g/ml}$), glutamina (2 mM), antibiótico (penicilina 100 uds./ml-estreptomocina 100 $\mu\text{g/ml}$) y glucosa (100 $\mu\text{g/ml}$). El medio de cultivo se cambió dos veces por semana y al día 7 de cultivo, se eliminó la glucosa y se redujo la cantidad de SBF al 10%. Los astrocitos se dejaron crecer hasta que llegaron a confluencia, alrededor de 11-13 días tras el cultivo.

3.2.2 Cultivo primario de células microgliales

Los cultivos de microglía se prepararon siguiendo el método descrito por Giulian y Baker (Giulian and Baker, 1986), a partir de las cortezas cerebrales de crías de ratón P1-P3. Tras diseccionar las cortezas y disgregarlas mecánicamente por aspiración, se disgregaron también químicamente mediante una incubación con 0,25% tripsina-EDTA 0,25 mM a 37°C durante 30 minutos (min). Posteriormente, se bloqueó la digestión mediante el mismo volumen de medio DMEM-F12 suplementado con 15%

de SBF y desoxirribonucleasa I, se centrifugó el extracto celular a 3000 rpm durante 5 min y se resuspendieron y filtraron las células en 10 ml de DMEM-F12. La siembra se realizó en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SBF, y 1% de fungizona (2,5 µg/ml), glutamina (2 mM) y antibiótico (penicilina 100 uds./ml-estreptomomicina 100 µg/ml). De esta forma se obtuvo un cultivo mixto de células gliales que se mantuvo en estufa húmeda a 37°C y 5% de CO₂ durante 14-17 días, cambiando el medio cada 4-5 días.

Tras este periodo y para obtener el cultivo puro de microglía, se aplicó el método de la tripsinización diferencial (Saura *et al.*, 2003), consistente en tripsinizar el cultivo mixto de células gliales durante unos minutos a 37°C con 0,05% tripsina-EDTA 25 mM, de manera que sólo los astrocitos se liberen, permaneciendo adherida la microglía. Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran, mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para cada tipo celular (CD11b para microglía, GFAP para astrocitos y MAP-2 para neuronas), que la pureza de células microgliales que se obtiene con este método es superior al 98%.

3.3 Tratamientos

3.3.1 Administración crónica de etanol *in vivo*

Para el tratamiento crónico con etanol *in vivo*, se emplearon ratones macho C57BL/6 (WT y TLR4-KO) de 7 semanas de edad, con un peso de 18-20 g. Se mantuvieron 4 animales por caja con agua (WT y TLR4-KO control) o agua con 10% (v/v) de etanol suplementado con sacarina, y

una dieta sólida *ad libitum* durante 4 meses. En este periodo, el consumo tanto de comida como de agua fue similar para ratones WT y TLR4-KO, así como para ratones tratados con etanol y los grupos control (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010). De esta forma, los animales consumieron alrededor de $12,6 \pm 2,0$ g de etanol/kg de masa corporal. Los niveles de etanol alcanzados en los ratones tratados fueron de 122 ± 18 mg/dl. El incremento en el peso de los animales fue similar entre los grupos WT y TLR4-KO tratados y control (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010).

3.3.2 Inhibición del proteasoma y estimulación de la autofagia *in vivo*

Para la inhibición *in vivo* del proteasoma y la estimulación de la vía de la autofagia, se usó bortezomib ($C_{19}H_{25}N_4O_4B$), que produce una inhibición selectiva y reversible del proteasoma 26S, y rapamicina, (o sirolimus, $C_{51}H_{79}NO_{13}$) que inhibe al complejo mTOR y estimula así el proceso autofágico, respectivamente. Se emplearon ratones WT control y tratados con etanol durante 4 meses, mientras que los tratamientos con los inhibidores se llevaron a cabo durante las últimas 8 semanas de este periodo. El bortezomib (1 mg/kg; LC Laboratories, Woburn, EEUU), disuelto en DMSO y suero salino fisiológico, se administró de forma intravenosa una vez a la semana en ratones anestesiados mediante inhalación de isoflurano al 2-4%. La rapamicina (3 mg/kg; LC Laboratories), disuelta en DMSO y suero salino fisiológico, se administró intraperitonealmente una vez a la semana.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron los cerebros, se diseccionaron y las cortezas cerebrales se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior análisis. Algunos animales fueron anestesiados, perfundidos con paraformaldehído (PF) y usados para los análisis inmunohistoquímicos.

3.3.3 Tratamiento *in vitro* de astrocitos y microglía con etanol

Para el análisis *in vitro* de ambos sistemas proteolíticos, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos y microglía procedentes de corteza cerebral de ratón. Cuando los cultivos llegaron a confluencia (día 11-13 en astrocitos y 14-17 en microglía), se sustituyó el suero bovino fetal (SBF) por albúmina de suero bovino (BSA, 1 mg/ml) en astrocitos o N2 (1%, v/v) en microglía, para dejar a las células en condiciones basales y evitar la activación de rutas fisiológicas. Sin embargo, tal y como describe la literatura, se comprobó que la privación de suero en cultivos primarios de células gliales era capaz de activar la vía de la autofagia (Janen *et al.*, 2010). Por este motivo y tras realizar varios ensayos, se redujo la concentración del suero al 2% únicamente en los cultivos destinados a analizar dicha vía. Tras 12 horas (h) de acondicionamiento al nuevo medio, se estimularon las células mediante la adición de etanol a una concentración de 50 mM y se recogieron en tampón fosfato salino (PBS) o se fijaron a diferentes tiempos (control sin etanol, 30 min, 1 h, 3 h, 7 h, 24 h) para su posterior análisis.

Puesto que ciertos productos comerciales pueden contener restos de LPS (Weinstein *et al.*, 2008) y éste activa los receptores TLR4, en nuestro laboratorio se realizó previamente el test del lisado de amebocitos de Limulus (LAL; Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica) para determinar la cantidad de LPS en el etanol usado para la estimulación celular. El contenido en LPS detectado fue menor de $2,98 \times 10^{-3}$ pg/ml, concentración insuficiente para activar a las células.

3.4 Determinación de proteínas: inmunotransferencia

3.4.1 Obtención del lisado celular y de tejido

Para la extracción de proteínas se realizó una lisis celular con tampón de lisis casero (Tris-HCl 20 mM, pH 8, Nonidet P-40 1%, cloruro sódico 130 mM, fluoruro sódico 10 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 40 µM, DTT 1mM, ortovanadato sódico 1 mM, PMSF 1 mM). Este se utilizó tanto con las placas de células previamente lavadas con PBS frío, como con las muestras de corteza cerebral, que se homogenizaron mecánicamente en el propio tampón (Ultra Turrax T8; IKA-WERKE, Staufen, Alemania). Los lisados se incubaron en hielo durante 30 minutos, agitándolos cada dos minutos, y finalmente se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a máxima velocidad (centrífuga Eppendorf modelo 5415 R; Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se midió la concentración de proteína del sobrenadante por el método de BCA (Thermo Fisher Scientific), empleando como curva patrón controles de concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU).

3.4.2 Electroforesis

Se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Se emplearon geles de poliacrilamida (grosor 1-1,5 mm; porcentaje bis:acrilamida 30:0,8) con un porcentaje de acrilamida 6-15%, en función del tamaño de la proteína a resolver. Las muestras se desnaturalizaron en un bloque termostático (Stuart-Bibby Scientific, Staffordshire, Gran Bretaña) durante 5 minutos a 95°C en presencia de la solución solubilizadora Laemmli 6× (350 mM Tris pH 6,8, 30% glicerol, 30% β-mercaptoetanol, 12,8% SDS y 0,02% azul de bromofenol) y se cargaron en el sistema de electroforesis (Mini-PROTEAN® 3 Cell; Bio-Rad, California, EEUU) con el tampón correspondiente (Tris-HCl 25mM, glicina 200mM y SDS al 0,1%). El proceso de electroforesis se llevó a cabo a partir de 40 µg de proteína a temperatura ambiente, con unas condiciones de voltaje constante (100 V) durante aproximadamente 90 minutos.

3.4.3 Inmunotransferencia y detección de proteínas

La transferencia se llevó a cabo con una membrana de PVDF (Merck-Millipore, Massachusetts, EEUU) mediante el sistema de transferencia húmeda de Bio-Rad. Las transferencias fueron realizadas bien a un voltaje constante (100 V) durante una hora, o bien en condiciones de amperaje constante (200 mA) toda la noche a 4°C, en un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM y metanol al 20%. Inmediatamente después de la transferencia, se bloqueó la membrana con

TBS-T (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, y Tween 20 0.1%) + 5% (p/v) de BSA a temperatura ambiente durante una hora.

La inmunodetección de las proteínas se realizó según el método descrito por Towbin (Towbin *et al.*, 1979), con anticuerpos disueltos en una solución de TBS-T + 1% de BSA (Tabla 2). Las incubaciones de los anticuerpos primarios se realizaron durante toda la noche a 4°C en agitación, mientras que los secundarios, conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), fueron incubados durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Entre ambos anticuerpos y tras el secundario se realizaron 3-4 lavados con TBS-T. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia con ECL-Plus (Thermo Fisher Scientific). Los análisis densitométricos se realizaron mediante el software de análisis de imagen ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, EEUU). La expresión de cada proteína se normalizó con respecto a los niveles de la proteína de expresión constitutiva GAPDH; o en el caso de proteínas fosforiladas, con respecto a la cantidad de proteína total.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la experimentación.

Antígeno	PM (kDa)	Especie	Dilución	Casa comercial
Ubi	-	Ratón (monoclonal)	1:5000	Abcam
$\alpha 2$	25	Conejo (policlonal)	1:10000	Abcam
$\beta 5i$	20	Conejo (policlonal)	1:1000	Abcam
$\beta 2i$	29	Ratón (monoclonal)	1:1000	Santa Cruz
$\beta 1i$	23	Conejo (policlonal)	1:2000	Abcam
$\beta 5$	23	Cabra (policlonal)	1:100	Santa Cruz
$\beta 2$	23	Ratón (monoclonal)	1:500	Santa Cruz

β1	25	Conejo (policlonal)	1:500	Santa Cruz
PSME1	28	Conejo (policlonal)	1:1000	Abcam
PSME2	27	Conejo (policlonal)	1:500	Abcam
p62/SQSTM1	47	Conejo (policlonal)	1:1000	Abcam
ATG5	32;60	Conejo (policlonal)	1:1000	Abcam
ATG12	21;60	Ratón (monoclonal)	1:500	Santa Cruz
LC3A/B	14	Conejo (policlonal)	1:2000	Abcam
CTSB	25;37	Ratón (monoclonal)	1:1000	Santa Cruz
mTOR	220	Conejo (policlonal)	1:500	Santa Cruz
p-mTOR(Ser 2448)	220	Conejo (policlonal)	1:200	Santa Cruz
iNOS	130	Ratón (monoclonal)	1:1000	BD Transduction Laboratories
COX-2	72	Conejo (policlonal)	1:1000	Cayman Chemical
GAPDH	38	Ratón (monoclonal)	1:20000	Merck Millipore
2º Anti ratón-AP			1:1000	Sigma-Aldrich
2º Anti- ratón-HRP	-	-	1:5000	Sigma-Aldrich
2º Anti-conejo- HRP	-	-	1:20000	Sigma-Aldrich
2º Anti-cabra- HRP	-	-	1:10000	Sigma-Aldrich

kDa = kiloDalton.

3.5 Análisis de la expresión génica

3.5.1 Extracción y aislamiento del RNA

Para la extracción del RNA se usó el reactivo TRI Reagent (Sigma-Aldrich), y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se disgregó el tejido mecánicamente y se incubó en TRI Reagent a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añadió cloroformo y se centrifugó para recoger la fase acuosa, a la que se añadió isopropanol para precipitar el RNA, que fue resuspendido y tratado con DNasa. Finalmente, se cuantificó la cantidad de RNA extraído mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific).

3.5.2 Transcripción reversa y PCR cuantitativa

De cada muestra, 1 µg de RNA fue retrotranscrito mediante el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” (Roche, Basilea, Suiza). El cDNA obtenido fue posteriormente amplificado a tiempo real en un termociclador (LightCycler 480, Roche) con buffer y sondas Taqman (Taqman Gene Expression; Applied Biosystems, California, EEUU) (Tabla 3), siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante. Se llevó a cabo una cuantificación relativa (Schmittgen and Livak, 2008) tomando como referencia el gen endógeno de expresión constitutiva β-glucuronidasa (GUS).

Tabla 3. Gene Expression Assay usado para la PCR.

Gen	Código de ensayo
$\beta 5i$	Mm01278979_m1
$\beta 2i$	Mm00479052_g1
$\beta 1i$	Mm00479004_m1
Atg12	Mm00503201_m1
Atg5	Mm00504340_m1
Catepsina B	Mm01310506_m1
LC3	Mm00782868_sH
p62	Mm00448091_m1
GUSB	Mm00446953_m1

3.6 Medida de la actividad del proteasoma

Las cortezas fueron homogenizadas en tampón de extracción [20 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM ditioneitol (DTT), 1 mM ATP, 10% glicerol, 0,5 mM EDTA, 0,5% Igepal (Sigma-Aldrich) y 5 mM $MgCl_2$]. Los lisados se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min. Las tres actividades del proteasoma 20S [de tipo quimotripsina, tripsina y peptidil glutamil péptido hidrolasa (PGPH) o caspasa] se analizaron usando sustratos fluorogénicos SUC-LLVY-MCA, Boc-LSTR-MCA y Z-LLE- β -naftilamida (Sigma-Aldrich), respectivamente. Los lisados de cerebro (50 μg de proteína) y el sustrato fluorogénico (concentración final, 50-100 μM) se incubaron conjuntamente en un tampón con 20 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM DTT, 1 mM ATP y 5 mM $MgCl_2$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La incubación tuvo lugar a 37°C durante 60 min en una placa de 96 pocillos. La fluorescencia se determinó a 355 nm excitación/460 nm emisión en un espectrofluorómetro

(PerkinElmer, Massachusetts, EEUU). La actividad proteasomal se expresó en unidades arbitrarias.

3.7 Análisis de citoquinas y especies reactivas del oxígeno

Los niveles de TNF- α , IL-1 β , óxido nítrico (NO) e IFN- γ se determinaron en lisados de corteza cerebral. TNF- α , IL-1 β e IFN- γ se midieron mediante un kit de ELISA (eBioscience, Viena, Austria) siguiendo los protocolos suministrados por el fabricante, mientras que la producción NO se analizó midiendo los niveles de nitrito por la reacción colorimétrica de Griess. El reactivo de Griess se preparó mezclando volúmenes iguales de sulfanilamida al 1% (p/v) en ácido acético al 30% y N-(1-Naftil)etilendiamina diclorhidrato al 0,5% (p/v) en ácido acético al 60% (v/v). Se mezcló este preparado con un volumen igual de lisado cerebral durante 10 min y se determinó la concentración de nitrito midiendo la absorbancia a 540 nm, utilizando como patrón nitrato de sodio.

La medida de los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se realizó mediante el kit "OxiSelect Hydrogen Peroxide Assay Kit" (Cell Biolabs, California, EEUU), siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Debido a que ciertos detergentes pueden interferir en los resultados obtenidos, las secciones de corteza cerebral se homogenizaron en tampón de lisis sin Nonidet P-40 mediante sonicación. Además, para corroborar los resultados obtenidos en corteza y analizar si las alteraciones producidas también se reflejaban a nivel sistémico, se midieron los niveles de H₂O₂ en suero sanguíneo.

3.8 Imagen óptica *in vivo* (IVIS)

Para estudiar la expresión de moléculas en tiempo real en animales vivos, se utilizó un sistema de imagen IVIS-200 (Caliper Life Sciences, Mainz, Alemania). Se usó el fluoróforo Xenolight CF770 para marcar los anticuerpos contra LC3 y β 5i, proteínas representativas de la autofagia y la vía del proteasoma, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante (Caliper Life Sciences). Antes de las sesiones de imagen, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de las sondas LC3-CF770 (2 mg/kg) o β 5i-CF770 (2,5 mg/kg) disueltas en suero salino fisiológico. A continuación, fueron anestesiados con 1.5-2.0% isoflurano en O₂ al 100% y colocados en una cámara oscura donde se tomaron imágenes de las cabezas de los animales a diferentes tiempos (24 h, 72 h y 120 h) tras la administración de las sondas. Se usaron IgG-CF770 y suero salino fisiológico como controles negativos. La señal de intensidad máxima se cuantificó mediante el software de análisis de imagen "Living Image 4.0" (Caliper Life Sciences, Xenogen Corp.) a 24 h para LC3 y 72 h para β 5i. Los valores se representan como porcentaje de la eficiencia de radiación.

3.9 Técnicas de microscopía

3.9.1 Preparación y fijación del tejido cerebral

Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg) y fentanilo (0,05 mg/kg) para la fijación de los cerebros. Se perfundieron de forma transcardíaca con suero salino 0,9% frío con heparina, seguido de paraformaldehído (PF) al 4% (v/v) en tampón

fosfato 0,1 M, pH 7,4. Los cerebros fijados fueron extraídos y post-fijados durante toda la noche a 4°C con la misma solución fijadora (4% PF), y guardados a 4°C en PBS con sacarosa al 30% para su crioprotección. Se obtuvieron secciones cerebrales coronales (40 µm) con un criostato (Microm HM 505E; Microm, Walldorf, Alemania) y montadas en portas de polisina gelatinizados (Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific).

3.9.2 Inmunohistoquímica en tejido cerebral

Las secciones se trataron con tampón citrato, pH 6,0, durante 15 min para la exposición de epítomos, incubadas con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol durante 10 min para la inactivación de la peroxidasa endógena y bloqueadas (5% suero de cabra en 0,1% PBS-Tween 20) durante 1 h. A continuación, se incubaron toda la noche a 4°C con anti-Ubicultina (1:1000; Abcam), y tras sucesivos lavados (0,1% PBS-Tween 20), incubadas con el anticuerpo secundario biotinilado (1:200; Vector Laboratories, California, EEUU). El método avidina-biotina-peroxidasa (Kit ABC; Vector Laboratories) se empleó usando 2,2'-diaminobenzidina (DAB, 0,7 mg/ml; Sigma-Aldrich) como sustrato, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes se montaron en portas con distireno-plastificante-xilol (DPX, Sigma-Aldrich). Las tinciones se visualizaron y se tomaron imágenes con una cámara (DFC-480; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) montada sobre un microscopio (DM-600B, Leica Microsystems). Los análisis cuantitativos de la inmunoreactividad de la ubicuitina en corteza cerebral se realizaron con el software de análisis de imagen "MetaMorph" (versión 7.0; Molecular Devices, California, EEUU). Se analizaron aproximadamente 18-20 campos

de corteza cerebral de 5-8 secciones coronales de al menos 3 animales por grupo.

3.9.3 Microscopía confocal

Para la doble inmunofluorescencia p62-LC3, las secciones coronales de cerebro se trataron con tampón citrato, pH 6,0, durante 15 min para la exposición de epítomos, e incubadas 30 min con negro de Sudan B (“Sudan black B”, SBB) al 0,3% (p/v) en 70% etanol para bloquear la autoinmunofluorescencia del tejido. Después de bloquear con 10% SBF y 0,2% Tritón X-100 en PBS durante 1 h, las secciones se incubaron secuencialmente con anti-LC3 (1:50, Abcam) y anti-p62/SQSTM1 (1:250, Abcam) durante toda la noche a 4°C, y sus respectivos anticuerpos secundarios “Alexa Fluor” (1:500; Invitrogen, California, EEUU). Se utilizó el fluoróforo Hoechst 33342 (0,5 mg/ml; Molecular Probes, Oregón, EEUU) para marcar los núcleos celulares. Se realizaron controles negativos con IgGs irrelevantes en lugar de anticuerpos. Las secciones se montaron con medio de montaje “Fluorsave” (Merck, Darmstadt, Alemania) y las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal TCS-SP2-AOBS (Leica Microsystems) y un objetivo 63× HCX PL APO lbd.BL63xN.A.1.4. Todas las imágenes de cada experimento fueron tomadas en las mismas condiciones y con la misma configuración. La distribución de la fluorescencia se analizó con el software “MetaMorph” (versión 7.0, Molecular Devices) y los resultados para los estudios de colocalización se expresaron como el porcentaje de una de las proteínas colocalizando con respecto a la otra. Se analizaron aproximadamente 18-20 campos de

corteza cerebral de 5-8 secciones coronales de al menos 3 animales por grupo.

Para las inmunofluorescencias de células *in vitro*, se fijaron las células con 3,7% (p/v) formaldehído durante 20 min. A continuación fueron lavadas 10 min en PBS, permeabilizadas con 0,25% (p/v) Triton X-100 durante 5 min, y bloqueadas con 3% (p/v) BSA durante 30 min. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente y tras varios lavados, se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios “Alexa Fluor” y con el reactivo Hoechst para teñir núcleos. Las inmunofluorescencias fueron montadas con “Fluorsave”, y la captura de imágenes y su posterior análisis se realizaron del mismo modo que se describe anteriormente para análisis de tejido. Se emplearon controles negativos sin anticuerpos primarios y se usó la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como marcador de astrocitos. Para la medida de la masa lisosomal, se incubaron las células con LysoTracker Red DND-99 (200 nM; Molecular Probes-Life Technologies) durante 2 h a 37°C antes de empezar el proceso de fijación. Este compuesto está formado por sondas acidotrópicas fluorescentes que se unen y marcan estructuras ácidas en las células. Al tener éstas preferencia por orgánulos esféricos, se concentran en los lisosomas, dando una estimación de la masa lisosomal de una célula.

3.9.4 Microscopía electrónica de transmisión

Para la obtención de las secciones de cerebro, los ratones, previamente anestesiados, se perfundieron por el ventrículo izquierdo con

1% PF y 2,5% glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Pequeños bloques de corteza cerebral fueron procesados y embebidos en resina Epon, como está descrito anteriormente (Romero *et al.*, 2010). Las secciones ultrafinas de tejido obtenidas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión CM100. Se tomaron 20-25 micrografías al azar de cada muestra (aumentos, $\times 10000$). A continuación, el volumen de las vacuolas autofágicas fue estimado por morfometría con el software Visilog (Noesis Vision, Francia). Los resultados se expresaron como la densidad de volumen (Vv) de las vacuolas autofágicas ($\mu\text{m}^3/100 \mu\text{m}^3$ por célula). Esta parte del trabajo fue realizada en colaboración con el Dr. Jaime Renau, del Centro de Investigación Hospital La Fe de Valencia.

Para las imágenes de células *in vitro*, éstas fueron sembradas en placas de Permanox (Nunc, Sigma-Aldrich), fijadas con 2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato (PB) 0,1M durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego lavadas 3 veces en PB 0,1M. Las células fueron postfijadas en 2% de tetraóxido de osmio durante 2 horas, deshidratadas, e incluidas en Araldita (Durcupan, Sigma-Aldrich). El resto de procesado y adquisición de imágenes fueron realizados en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se realizaron cortes semifinos de 1 μm , con una cuchilla de vidrio, y se tiñeron con azul de toluidina (Panreac, Barcelona, España) al 1%. Las fotografías se tomaron en un microscopio Nikon Eclipse 800. Posteriormente, a partir de los cortes semifinos se realizaron cortes ultrafinos (60-70nm) con una cuchilla de diamante, se tiñeron con citrato de plomo, y fueron examinados usando un microscopio electrónico modelo FEI Tecnai Spirit.

3.10 Citometría

3.10.1 Análisis de la masa lisosomal

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos, y se llevaron a confluencia en medio completo. Para evitar la activación de la autofagia que se produce al privar a las células de suero antes de la estimulación con etanol, se redujo la concentración de suero a un 2% en lugar de sustituirlo por BSA. Una vez acondicionadas las células durante al menos 12 h, algunos pocillos se estimularon con etanol (50 mM) durante 3 o 24 h. Paralelamente, 2 h antes de recoger las células, se añadió al medio LysoTracker Red DND-99 (50 nM; Molecular Probes-Life Technologies) para marcar los lisosomas. Finalmente, las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en PBS tras centrifugación, y se pasaron por un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter, California, EEUU), donde se midió la fluorescencia emitida (620 ± 20 nm). Los resultados obtenidos se analizaron con el software proporcionado por el fabricante. Además, estos resultados fueron corroborados mediante microscopía confocal con LysoTracker Red, tal y como se describe en el apartado correspondiente.

3.10.2 Cálculo del pH en los lisosomas

Se utilizaron cultivos primarios confluentes de astrocitos. De nuevo, se utilizó medio completo reduciendo la concentración de SBF al 2% antes de la estimulación. Tras 12 h de acondicionamiento, se añadió etanol (50 mM) a las células 3 o 24 h antes de su recogida. Para medir el pH en los lisosomas, se incubaron las células con 40 kDa FITC-dextrano durante 18 h, siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Nilsson *et al.*, 2003). El

FITC-dextrano (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) es un polímero de anhidroglucosa cuya fluorescencia incrementa con el pH. Tras la incubación, las células fueron lavadas cinco veces con PBS e incubadas de nuevo con su medio correspondiente durante 4 h. Posteriormente, se tripsinizaron y resuspendieron tras centrifugación en PBS, para su análisis en un citómetro FC500 (Beckman Coulter). El FITC se excitó a 488 nm con un laser de argón y la emisión resultante fue detectada a 530 ± 28 nm (FL1) y 610 ± 20 nm (FL3) para 10.000 eventos celulares. El pH fue calculado mediante una curva estándar de calibrado, añadiendo PBS a diferentes pHs (en un rango de 4-8) a las células junto con los ionóforos monensina (20 μ M, Sigma-Aldrich) y nigericina (10 μ M, Sigma-Aldrich).

3.11 Métodos estadísticos

Todos los datos se expresan como media \pm error estándar (SEM) para variables continuas. La comparación de variables continuas de distribución normal entre dos grupos se realizó mediante la prueba estadística t-Student. La comparación entre diferentes grupos de datos se estudió mediante ANOVA unidireccional, seguido de los análisis *post-hoc* de Bonferroni o Dunnett. En todos los modelos descritos, se asumió significación estadística para un valor p menor de 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas SigmaPlot (versión 10) y GraphPad Prism (versión 5.00).

4 Resultados

4.1 El consumo crónico de etanol afecta a la proteólisis intracelular y causa una acumulación de proteínas en corteza cerebral

4.1.1 Papel de TLR4 en la acumulación de proteínas ubiquitinadas

El sistema ubiquitina-proteasoma constituye el mecanismo de degradación principal en la proteólisis de las proteínas de vida media corta, mal plegadas o defectuosas. Su disfunción, junto con una acumulación de proteínas ubiquitinadas es la principal causa de la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas (Alves-Rodrigues *et al.*, 1998; Levine and Kroemer, 2008). Por ello, lo primero que estudiamos fue si el consumo crónico de alcohol afecta a la eliminación de proteínas ubiquitinadas y si la señalización por TLR4 participa en estos efectos. Para analizar las proteínas ubiquitinadas se realizaron ensayos de inmunotransferencia con un anticuerpo anti-ubiquitina que detecta preferentemente proteínas conjugadas a poliubiquitina y agregados proteicos ubiquitinados. La Figura 9A muestra que el tratamiento crónico de etanol incrementó los niveles de proteínas ubiquitinadas en corteza cerebral de ratones WT, induciendo un *smear* o arrastre de proteínas con peso molecular aproximado de entre 45-76 kDa. Por el contrario, el mismo tratamiento de etanol no incrementó la cantidad de proteína ubiquitinada en ratones TLR4-KO. Del mismo modo, un análisis inmunohistoquímico de diferentes secciones de corteza cerebral demostró que el tratamiento crónico con alcohol en ratones WT promueve la acumulación de proteínas ubiquitinadas y que este evento está asociado a la señalización por TLR4 (Fig. 9B).

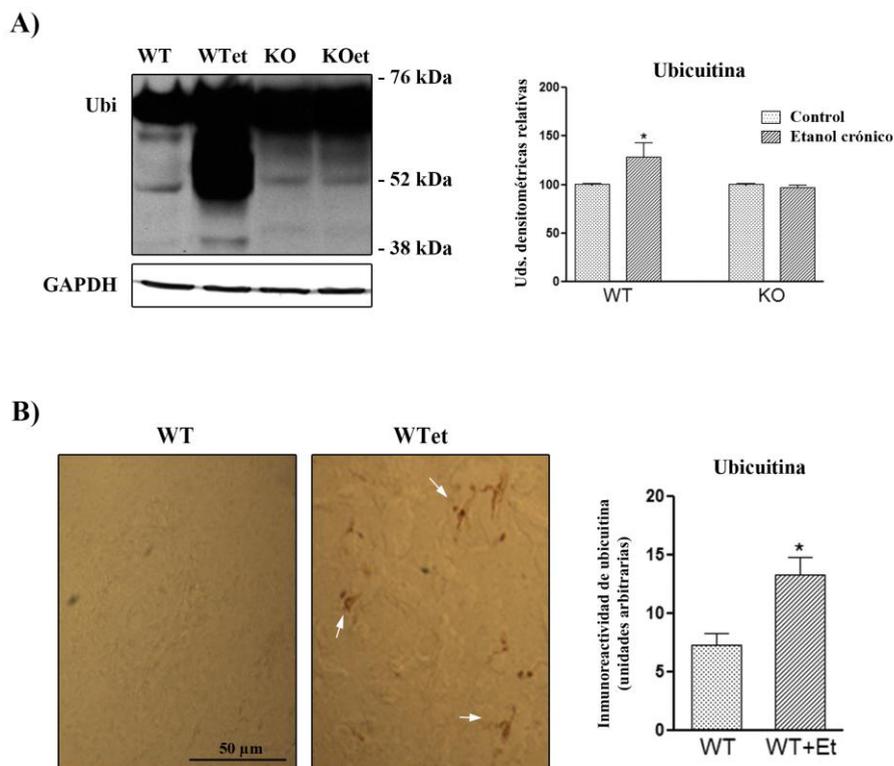


Figura 9. El consumo crónico de etanol induce una acumulación de proteínas ubiquitinadas en corteza cerebral de ratones WT. Los resultados obtenidos mediante *western blot* (A) e inmunohistoquímica (B) corresponden a lisados de proteína y secciones histológicas de corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO tratados o no con etanol durante 4 meses, respectivamente. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 7$ ratones/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) mediante test *t* de Student. Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína. Barra de escala: 50 μ m.

4.1.2 El consumo crónico de alcohol afecta al sistema ubiquitina-proteasoma

El proteasoma 20S constituye el núcleo proteolítico del proteasoma 26S, un gran complejo de degradación de proteínas que permite la digestión de proteínas innecesarias o mal plegadas al activar una serie de actividades proteolíticas capaces de eliminar proteínas ubiquitinadas. El proteasoma 20 S contiene diferentes subunidades catalíticas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) y se encuentra unido a dos partículas reguladoras 19S que posibilitan el reconocimiento de proteínas (ver Figura 5 de la introducción). Por lo tanto, para estudiar el posible papel del etanol en el SUP, se midieron en primer lugar los niveles de las subunidades constitutivas del proteasoma. Como se muestra en la Figura 10, el tratamiento crónico con etanol *in vivo* disminuyó la expresión de las subunidades $\beta 5$ y $\alpha 2$ en corteza cerebral de ratones WT, sin producir cambios significativos en las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$. Sin embargo, el tratamiento con etanol no afectó a la expresión de ninguna de las subunidades constitutivas del proteasoma en ratones TLR4-KO.

En muchas enfermedades neurodegenerativas, el declive funcional del proteasoma constitutivo se asocia con un incremento de las subunidades catalíticas inducibles del proteasoma ($\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$), así como con la unión del núcleo 20S a partículas reguladores PA28 (Bendotti *et al.*, 2012; Nijholt *et al.*, 2011a), a través de la sobreexpresión de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF- α (Basler *et al.*, 2012). Por ello, determinamos si el tratamiento crónico con alcohol podría inducir la expresión de las subunidades del inmunoproteasoma en la corteza cerebral de los ratones.

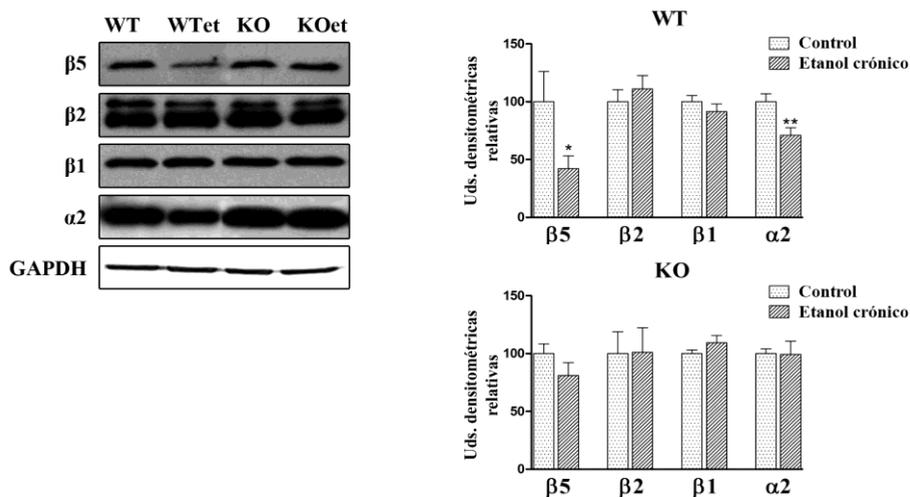


Figura 10. El abuso del alcohol altera la expresión de las subunidades constitutivas del proteasoma en corteza cerebral. El etanol disminuye significativamente los niveles de expresión de la subunidad catalítica $\beta 5$ y de $\alpha 2$ en ratones WT, pero no produce cambios en ratones TLR4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 7 ratones/grupo. Se asumió significación estadística para p < 0,05 (*) y p < 0,01 (**) mediante test t de Student. Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

La Figura 11 muestra que la expresión proteica de $\beta 5i$ y $\beta 2i$ (Fig. 11A), y los niveles de mRNA de $\beta 5i$ (Fig. 11B) incrementaron significativamente en ratones WT tratados con etanol. Del mismo modo, los niveles de la subunidad PA28 α (o PSME1), un activador del proteasoma implicado en el ensamblaje del inmunoproteasoma y el procesamiento de antígenos (Kloetzel *et al.*, 1999), también aumentaron en los animales WT alcoholizados.

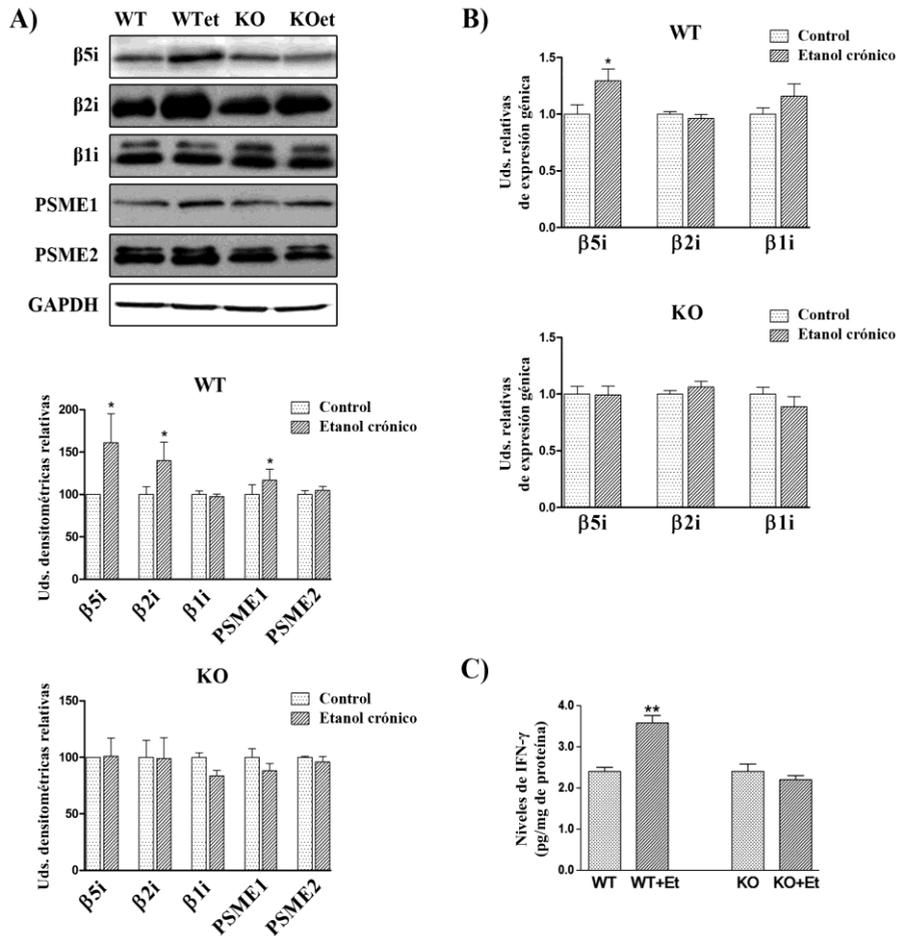


Figura 11. El consumo crónico de etanol aumenta los niveles de expresión de distintas subunidades del proteasoma en corteza cerebral de ratones WT. El etanol incrementa la expresión proteica de las subunidades inducibles $\beta 5i$ y $\beta 2i$, y del componente de la partícula reguladora PSME1 en ratones WT (A), mientras que en mRNA produce únicamente un aumento significativo de $\beta 5i$ (B). Sin embargo, no se observan cambios en animales TLR4-KO. El etanol también incrementa la expresión de IFN- γ , citoquina que induce la formación del inmunoproteasoma (C). Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 7$ ratones/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) mediante test t de Student. Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

Además, como en la mayoría de patologías neurodegenerativas, el etanol indujo un aumento de los niveles de TNF- α (Fig. 22A) (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010) e IFN- γ en corteza cerebral de ratones WT (Fig. 11C). En cambio, no se detectaron cambios significativos en las subunidades del inmunoproteasoma ni en los niveles de IFN- γ en corteza de ratones TLR4-KO tratados con etanol en comparación con los ratones TLR4-KO sin tratar (Fig. 11A-C).

4.1.3 El etanol aumenta los niveles de las actividades tipo quimotripsina y tripsina

Para establecer si la sobreexpresión de algunas de las subunidades del inmunoproteasoma en la corteza de los animales tratados con etanol estaba asociada a cambios en la actividad proteasomal, se midieron las tres actividades proteolíticas: tipo quimotripsina, tripsina y caspasa. La Figura 12 muestra que las actividades tipo quimotripsina y tripsina se encontraban aumentadas en la corteza cerebral de animales WT alcoholizados, mientras que no se observaron cambios en ratones TLR4-KO.

En general, los resultados obtenidos sugieren que el etanol reduce la expresión del proteasoma constitutivo 20S en corteza cerebral y promueve la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas, a la vez que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, probablemente a través de la señalización por TLR4, que inducirían una activación del inmunoproteasoma.

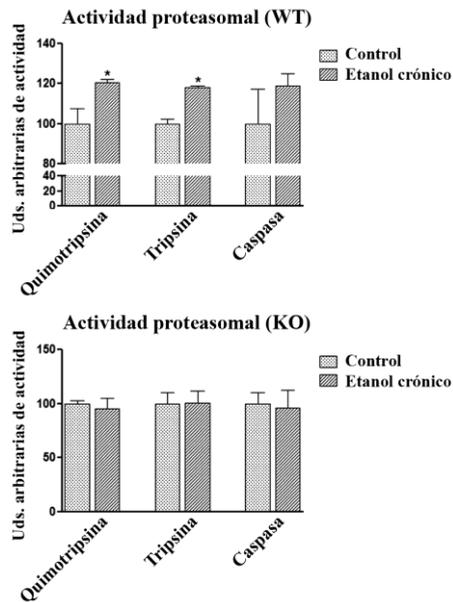


Figura 12. El etanol incrementa las actividades de tipo quimotripsina y tripsina en corteza cerebral de ratones WT, pero no en animales TLR4-KO. Las tres actividades del proteasoma 20S se analizaron mediante el uso de los sustratos fluorogénicos SUC-LLVY-MCA (quimotripsina), Boc-LSTR-MCA (tripsina) y Z-LLE- β -naftilamida (caspasa). Los ensayos se realizaron con 50 μ g de lisado de corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 7 ratones/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) mediante test t de Student.

4.1.4 El etanol causa alteraciones en la vía de la autofagia-lisosoma

Para evaluar las posibles acciones del consumo crónico de etanol en la vía de la autofagia-lisosoma en la corteza cerebral, se analizaron en primer lugar las proteínas implicadas en la formación de los autofagosomas, LC3-II, ATG5 y ATG12, así como la catepsina B, una de las principales enzimas hidrolasas lisosomales, y p62. La Figura 13 (A-B) muestra que el tratamiento con etanol disminuyó los niveles tanto de proteína como de mRNA de catepsina B, LC3 y ATG5, y sólo los niveles de proteína de ATG12

en ratones WT. Sin embargo, no se observaron cambios significativos entre los ratones TLR4-KO control y tratados con etanol.

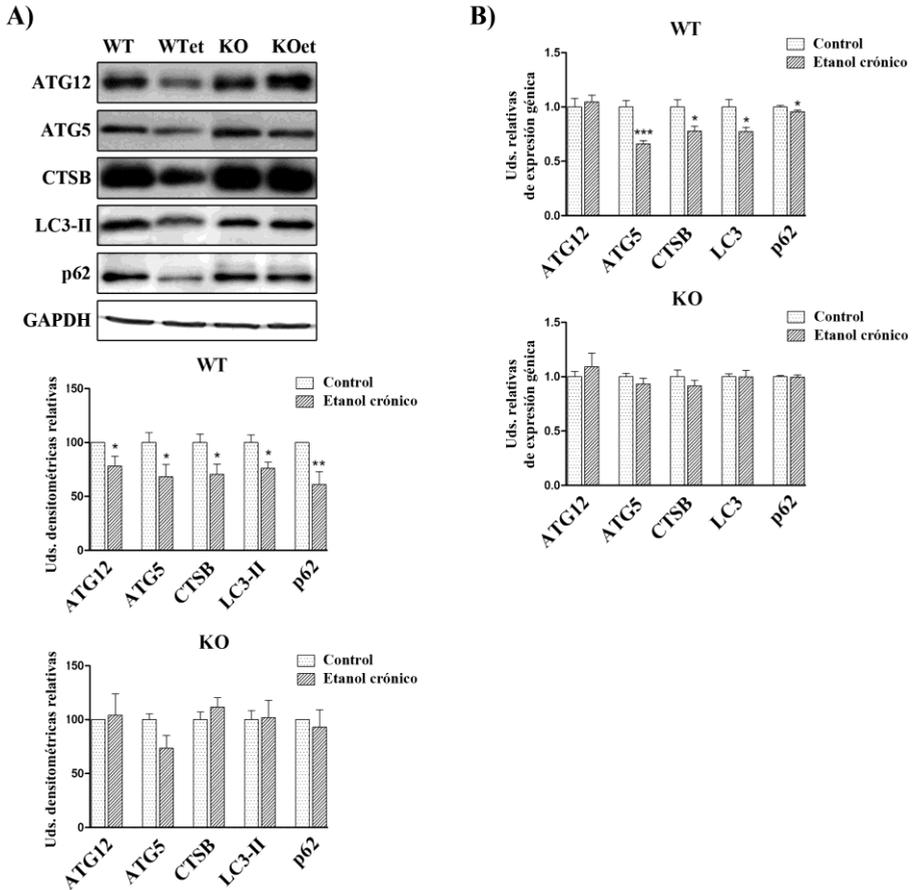


Figura 13. El consumo crónico de etanol disminuye los niveles de expresión de las principales moléculas implicadas en la autofagia en corteza cerebral de ratones WT. El etanol disminuye la expresión de las proteínas autofágicas ATG (ATG5, ATG12, LC3-II/ATG8), de la hidrolasa lisosomal CTSB y de p62 en ratones WT (A), así como su mRNA, a excepción de ATG12 (B). Sin embargo, no se observan cambios en animales TLR4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 7$ ratones/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) mediante test t de Student. Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

Nuestro próximo objetivo fue evaluar si p62, proteína que puede unirse a LC3-II y a proteínas ubiquitinadas (Pankiv *et al.*, 2007), podría participar en el proceso autofágico selectivo de los agregados proteicos ubiquitinados y orgánulos.

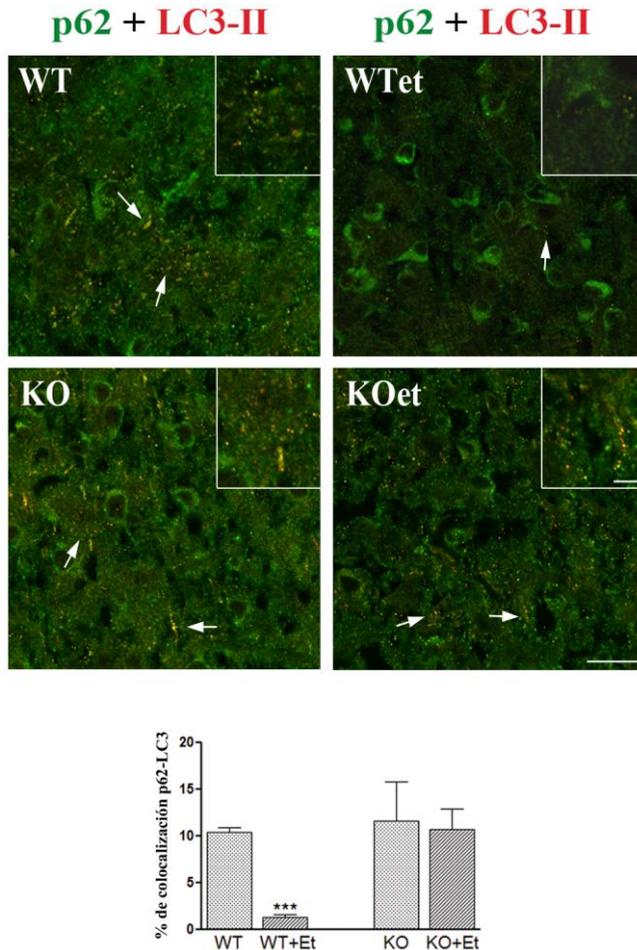


Figura 14. El consumo de alcohol reduce la colocalización entre p62 y LC3-II en ratones WT. Las imágenes de la doble inmunofluorescencia p62-LC3-II corresponden a la corteza cerebral de secciones coronales de ratones WT y TLR4-KO tratados o no con etanol durante 4 meses. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 3-4$ ratones/grupo. Significación estadística, $p < 0,001$ (***) mediante test t de Student. Barras de escala: 25 μm , y 6,25 μm (ampliación).

La Figura 13 (A-B) muestra que el tratamiento con etanol induce una disminución en la expresión de p62 en corteza cerebral de ratones WT, cambio que no se aprecia en ratones TLR4-KO. Estos resultados sugieren que la señalización por TLR4 estaría implicada en las alteraciones en la expresión de p62 y en general en el proceso autofágico. De hecho, los estudios de inmunofluorescencia mostraron la interacción de LC3-II y p62, y confirmaron que el tratamiento con etanol reduce dicha interacción en ratones WT, pero no causa cambios en animales TLR4-KO (Figura 14).

Finalmente, para evaluar el mecanismo de acción del etanol sobre la vía de la autofagia, se midieron los niveles de fosforilación de mTOR. La proteína quinasa mTOR es un regulador crítico del proceso autofágico, ya que la activación de mTOR inhibe esta vía (Kim *et al.*, 2011).

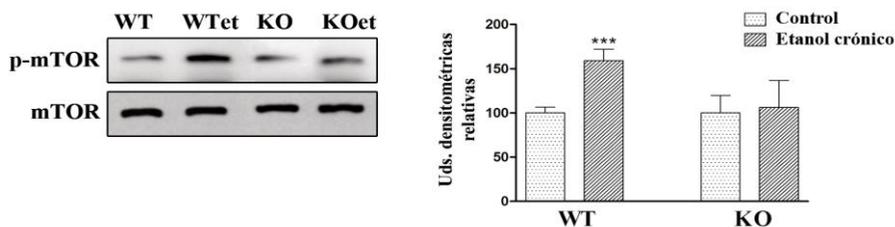


Figura 15. El consumo crónico de etanol induce la fosforilación de mTOR en corteza cerebral de ratones WT. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 12 ratones/grupo. Significación estadística, $p < 0,001$ (***) mediante test t de Student. Se evaluó la expresión de mTOR total como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

Como se muestra en la Figura 15, el etanol causó un aumento en los niveles de fosforilación de mTOR en ratones WT, mientras que los niveles de fosforilación de esta proteína fueron similares en corteza cerebral de ratones TLR4-KO control y tratados. Por último, se analizó el posible efecto

del etanol sobre Beclin 1, proteína que se encarga de inducir la expresión de las proteínas ATG. Sin embargo, el tratamiento crónico con etanol no indujo cambios significativos en los niveles de esta proteína (datos no mostrados).

4.1.5 El tratamiento crónico con etanol produce un aumento del volumen de las vacuolas autofágicas

Para confirmar que el tratamiento con etanol afecta a la vía de la autofagia-lisosoma, se analizaron las vacuolas autofágicas por microscopía electrónica. Estos estudios revelaron que el etanol incrementó el volumen de las vacuolas en el citoplasma de ratones WT, mientras que los cambios fueron mucho menores en ratones TLR4-KO (Fig. 16).

Estos resultados sugieren que el etanol afecta al flujo autofágico de vacuolas, provocando una acumulación y un aumento de tamaño e impidiendo su correcta progresión. Una maduración deficiente o un reciclaje incorrecto de los autofagosomas podrían afectar a la degradación de su contenido, lo que podría provocar daño celular y, en último término, neurodegeneración (Ravikumar *et al.*, 2010).

Todos estos resultados evidencian que el tratamiento con etanol altera el proceso autofágico, impidiendo el correcto flujo de vacuolas autofágicas y degradación de su contenido, eventos que podrían contribuir a la muerte celular y neurodegeneración. Los resultados obtenidos también sugieren que la activación de la respuesta inmune innata a través de TLR4 mediada por el etanol participa en la reducción del proceso autofágico.

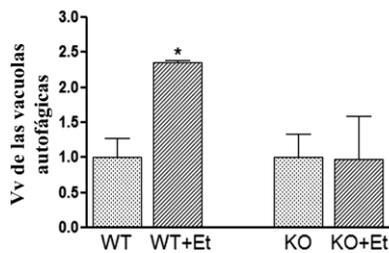
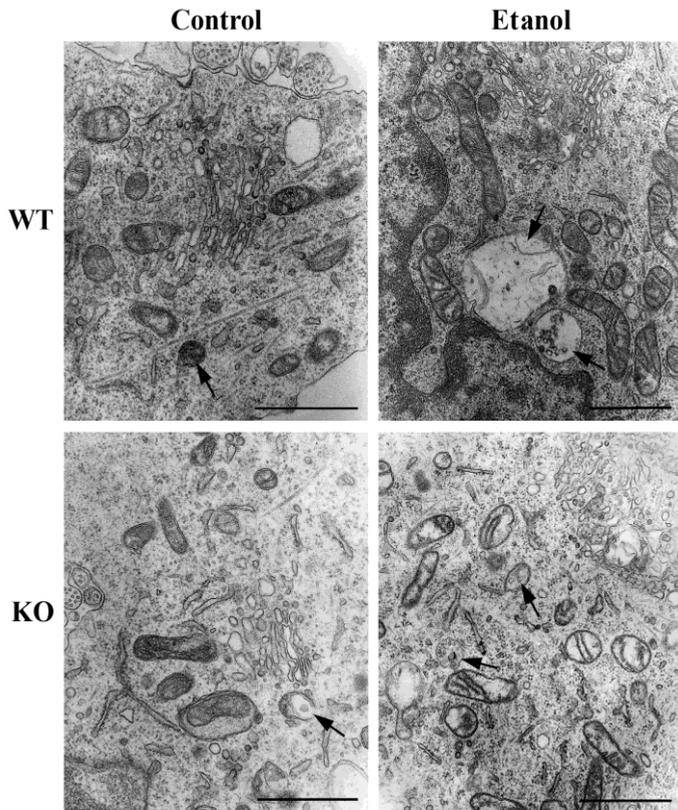


Figura 16. Efecto del alcohol sobre las vacuolas autofágicas en corteza cerebral de ratones. El etanol causa un aumento de la densidad de volumen en las vacuolas de ratones WT tras 4 meses de consumo, pero no en ratones TLR4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 3-4$ ratones/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) mediante test t de Student. Barra de escala: $1 \mu\text{m}$. Vv = densidad de volumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ por célula).

4.1.6 Estudio *in vivo* de la expresión de β 5i y LC3 en cerebro

Para corroborar los resultados experimentales obtenidos, utilizamos una técnica de imagen *in vivo* que permite la detección de la expresión proteica en animales vivos. Se seleccionaron β 5i y LC3 como proteínas características del sistema ubiquitina-proteasoma y de la vía de la autofagia, respectivamente. Los animales WT y TLR4-KO control o tratados con etanol recibieron una inyección intraperitoneal con las sondas fluorescentes β 5i-CF770 y LC3-CF770, y la intensidad de fluorescencia se evaluó tras 72 h y 24h, respectivamente, coincidiendo con la máxima intensidad de cada sonda. Como se muestra en las Figuras 17A y 18A, el consumo crónico de etanol incrementó la intensidad de fluorescencia de β 5i-CF770 (Fig. 17A), mientras que disminuyó la de LC3-CF770 (Fig. 18A) en los cerebros de ratones WT con respecto a los animales control.

Sin embargo, el mismo tratamiento con etanol no causó diferencias significativas en las intensidades de fluorescencia de ambas sondas en los cerebros de ratones TLR4-KO. La reconstrucción tridimensional (Fig.17B y 18B) apoya los datos obtenidos en análisis de imagen espectral planar.

Para validar los resultados obtenidos, y comprobar que las sondas utilizadas eran capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el cerebro de los animales, se inyectaron intraperitonealmente las dos sondas junto con dos controles negativos, IgG-CF770 y suero salino fisiológico, en cuatro ratones WT diferentes. Tras 24 h o 72 h según la sonda, se evaluó la intensidad de fluorescencia emitida en la parte posterior de la cabeza y en la cavidad abdominal.

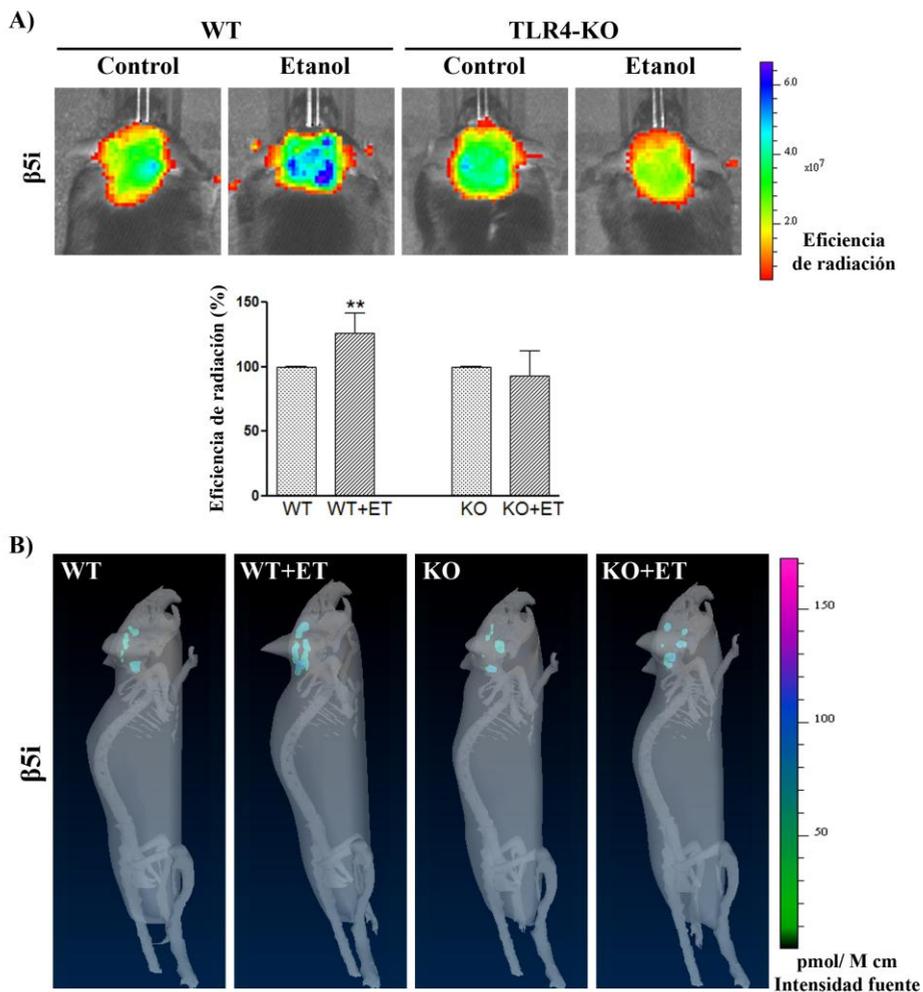


Figura 17. Expresión *in vivo* de la proteína del inmunoproteasoma $\beta 5i$ en cerebro. Las imágenes muestran la fluorescencia emitida por la sonda $\beta 5i$ -CF770 (2,5 mg/kg) en cerebros de ratones WT y TLR4-KO tratados o no con etanol durante 4 meses, 72 h después de la inyección intraperitoneal (A); e imágenes longitudinales de la sonda $\beta 5i$ -CF770 en cerebros de ratones tras una reconstrucción 3D (B). Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4 ratones/grupo, en porcentaje de la eficiencia de la radiación. Significación estadística, p < 0,01 (***) mediante test t de Student.

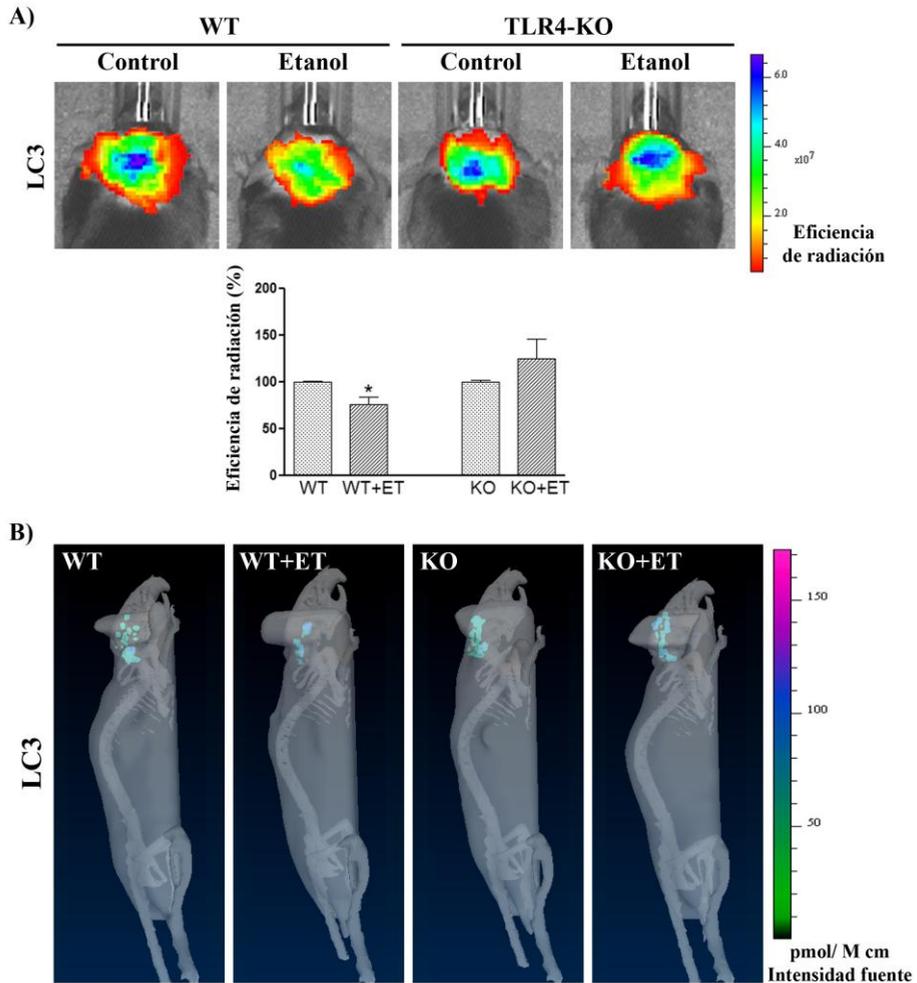


Figura 18. Expresión *in vivo* de la proteína autofágica LC3 en cerebro. Las imágenes muestran la fluorescencia emitida por la sonda LC3-CF770 (2 mg/kg) en cerebros de ratones WT y TLR4-KO tratados o no con etanol durante 4 meses, 72 h después de la inyección intraperitoneal (A); e imágenes longitudinales de la sonda LC3-CF770 en cerebros de ratones tras una reconstrucción 3D (B). Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 4$ ratones/grupo, en porcentaje de la eficiencia de la radiación. Significación estadística, $p < 0,05$ (*) mediante test t de Student.

Como se puede observar en la Figura 19, las dos sondas específicas se detectaron correctamente en los animales *in vivo*, mientras que ni la sonda inespecífica ni el suero salino produjeron prácticamente señal.

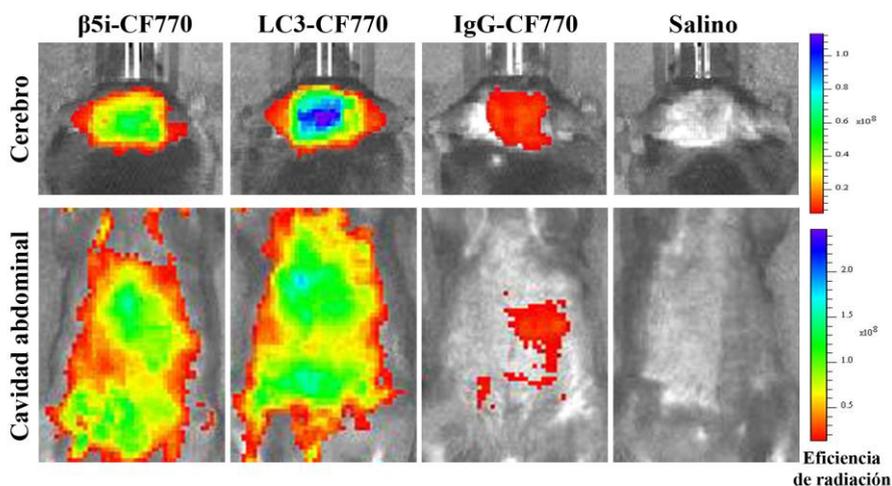


Figura 19. Validación del sistema de imagen *in vivo*. Se inyectaron intraperitonealmente ratones WT con las sondas fluorescentes específicas $\beta 5i$ -CF770 (2,5 mg/kg) y LC3-CF770 (2,0 mg/kg). Como control se utilizaron una sonda inespecífica IgG-CF770 y suero salino. Se midieron los niveles de fluorescencia en cerebro y cavidad abdominal tras 72 h ($\beta 5i$ e IgG) o 24 h (LC3 y suero salino). La ausencia de señal en ambos controles negativos prueba la especificidad de la sonda.

Posteriormente, los animales se sacrificaron y los cerebros e hígados se extrajeron para medir las intensidades de fluorescencia *ex vivo*. Además, se realizaron cortes coronales de los cerebros para comprobar la correcta penetración de la sonda en este órgano (Figura 20). Ambas sondas se detectaron tanto en cerebro (Figura 20A-B) como en hígado (Figura 20C).

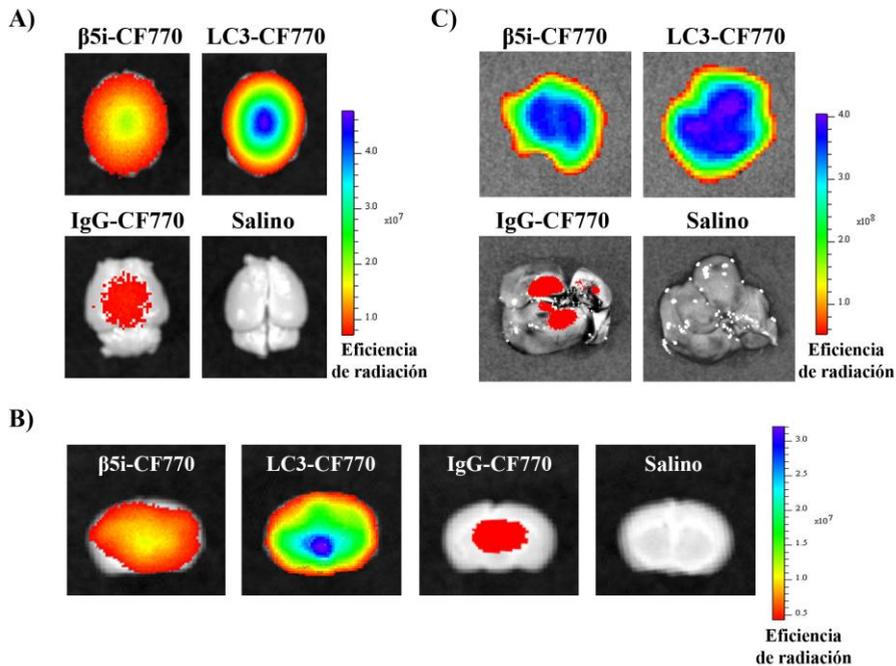


Figura 20. Comprobación de la fluorescencia emitida *ex vivo* entre hígado y cerebro. Tras la validación *in vivo* de la especificidad de las sondas, los animales se sacrificaron y los cerebros e hígados fueron extraídos. Se evaluó la fluorescencia *ex vivo* de los cerebros enteros (A), de cortes coronales cerebrales (B) y de los hígados (C). La sonda se distribuyó correctamente por el organismo, y fue detectada en ambos órganos de forma específica, como muestra la ausencia de señal en los controles negativos.

Tras el análisis *ex vivo* de los cerebros e hígados y como era de esperar, la intensidad de fluorescencia en los hígados fue mayor (aproximadamente en un orden de magnitud) que la de los cerebros, algo que no es de extrañar dada la función detoxificadora de este órgano. Sin embargo, y como demostraron los cortes cerebrales coronales, se pudo confirmar la penetración de ambas sondas en el cerebro de los animales.

Además, ambos controles negativos no dieron prácticamente ninguna señal, demostrándose así la especificidad de las sondas empleadas.

Estos estudios de imagen *in vivo* se correlacionan con los resultados bioquímicos obtenidos en las Figuras 11A y 13A, y confirman que el etanol incrementa la actividad del inmunoproteasoma, pero disminuye la actividad autofágica en los cerebros de ratones WT. Además, estos estudios también demuestran la implicación de TLR4 en estos eventos, al no encontrarse cambios relevantes entre ratones TLR4-KO tratados con etanol y sin tratar.

4.1.7 El consumo crónico de etanol genera estrés oxidativo

El consumo crónico de etanol produce un ambiente inflamatorio que puede resultar tóxico para la célula (Valles *et al.*, 2004). Para evaluar la posible implicación del daño oxidativo en la neurotoxicidad causada por el etanol, se analizaron los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS). La Figura 21A muestra que el etanol produjo un aumento de los niveles de H_2O_2 en la corteza cerebral de ratones WT, pero no causó alteraciones en animales TLR4-KO. Estos datos fueron además corroborados mediante la medida de los niveles sistémicos de H_2O_2 en suero sanguíneo, obteniéndose resultados muy similares (Fig. 21B).

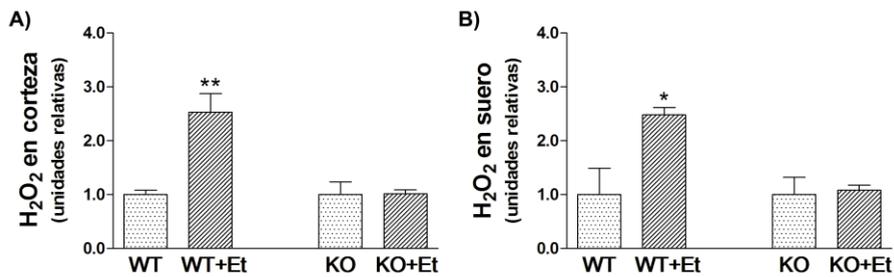


Figura 21. El etanol causa un aumento de los niveles de H_2O_2 en ratones WT. El consumo crónico de etanol aumenta la producción de H_2O_2 en corteza cerebral (A) y en suero sanguíneo (B) de ratones WT, pero no produce alteraciones de sus niveles en animales TLR4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 6-8 ratones/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) mediante test t de Student.

4.1.8 Administración *in vivo* de bortezomib y rapamicina a ratones alcoholizados

Para evaluar la relevancia de las alteraciones proteolíticas en la neuroinflamación y el daño cerebral *in vivo*, se administró a los animales un modulador de la actividad proteasomal, bortezomib, que inhibe la actividad catalítica 26S (Groll *et al.*, 2009). Los efectos del abuso de etanol en la vía de la autofagia también se evaluaron mediante la administración de rapamicina, un compuesto que inhibe la señalización de mTOR (p. e., AMPK y p53) (Alers *et al.*, 2012) e induce la autofagia (Graziotto *et al.*, 2012). Ambos inhibidores se inyectaron tanto a los animales WT control como a los tratados con etanol de forma crónica.

Como se aprecia en la Figura 22A, la administración de bortezomib evitó la activación de las actividades proteasomales tipo quimotripsina y tripsina inducida por el etanol en la corteza cerebral de ratones WT. De forma similar, las inyecciones de rapamicina inhibieron de forma significativa la inducción de la fosforilación de mTOR producida por el

consumo crónico de alcohol (Fig. 22B). Estos resultados indican que bajo las condiciones experimentales empleadas, ambos inhibidores fueron capaces de modular y prevenir los efectos del etanol en las dos vías metabólicas estudiadas, SUP y autofagia.

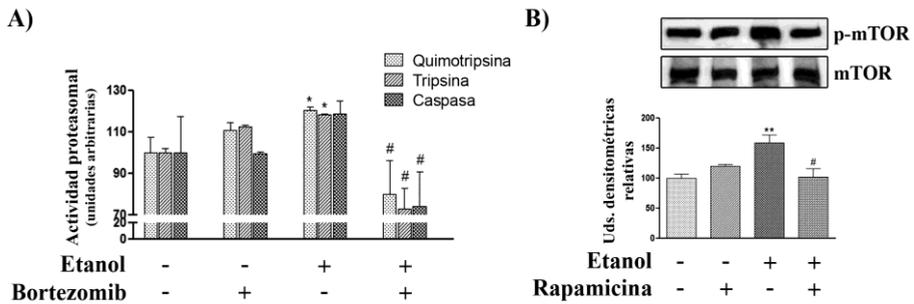


Figura 22. El tratamiento con moduladores del proteasoma y de la autofagia previene los efectos del etanol sobre ambas vías proteolíticas en la corteza cerebral. Se evaluaron los efectos del tratamiento con bortezomib (inhibidor de la actividad proteasomal) y rapamicina (inhibidor de mTOR, induce autofagia) durante el consumo crónico de alcohol sobre ambas vías proteolíticas. Se administró bortezomib o rapamicina a animales WT con un consumo de alcohol durante 4 meses, o a ratones WT control. La administración de bortezomib (1 mg/kg) previno el incremento de los niveles de actividad proteasomal inducida por el consumo crónico, pero no tuvo efecto en animales control (A). La administración de rapamicina (3 mg/kg) suprimió el incremento en la fosforilación de mTOR que induce el tratamiento con etanol, y no produjo cambio en los animales control (B). Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4-6 ratones/grupo. Significación estadística mediante análisis ANOVA (*post-hoc*, test Bonferroni), $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) cuando se comparan los grupos tratados con etanol y los control; y $p < 0,05$ (#) entre los grupos tratados con etanol + inhibidor y los grupos tratados únicamente con etanol. Se evaluó la expresión de mTOR total como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

Para determinar los efectos de ambos moduladores en las vías proteolíticas correspondientes, analizamos en primer lugar el efecto del etanol sobre la producción de las citoquinas proinflamatorias interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y otros mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX-2) o la óxido nítrico sintasa

inducible (iNOS) y el producto que sintetiza, el radical libre óxido nítrico (NO). La Figura 23 muestra que el etanol produjo un aumento estadísticamente significativo de todos estos compuestos.

Una vez comprobada la eficacia de los moduladores y la neuroinflamación producida por el etanol, se determinó si ésta estaba asociada a la alteración de los procesos proteolíticos en la corteza cerebral de ratones WT. La Figura 23A muestra que mientras el bortezomib, inhibidor de la actividad quimotripsina del proteasoma, suprime completamente el incremento en los niveles de expresión de TNF- α , IL-1 β y NO en ratones alcoholizados, la rapamicina, inhibidor de la vía de la autofagia, sólo restablece los niveles de IL-1 β de forma significativa, aunque los niveles en este grupo son en general más bajos que en el grupo tratado con etanol.

El análisis por *western blot* de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 demostró la eficacia del bortezomib a la hora de restablecer los niveles normales de expresión de ambas moléculas en ratones WT tratados con etanol. Por otra parte, la rapamicina, sólo rescató los niveles de expresión de iNOS (Fig. 23B). Por último, no se encontraron cambios significativos en la expresión de citoquinas u otros mediadores proinflamatorios cuando se administró cada uno de los inhibidores en ratones control.

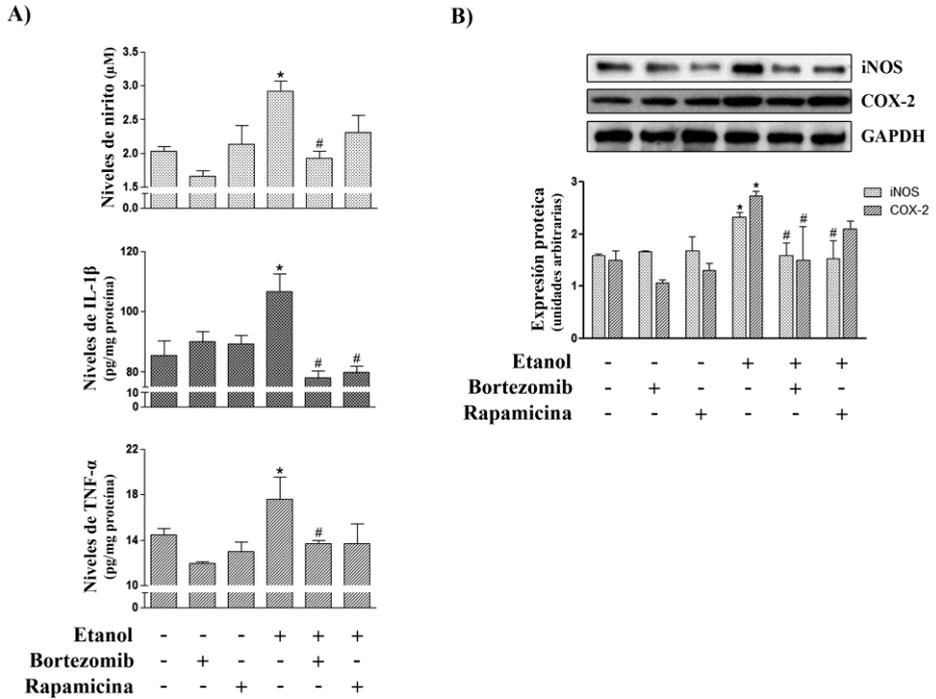


Figura 23. Efectos del etanol y de los moduladores proteolíticos bortezomib y rapamicina sobre la producción de radicales libres, citoquinas y otros mediadores inflamatorios en la corteza cerebral. El consumo crónico de etanol aumenta los niveles de óxido nítrico, y de las citoquinas IL-1 β y TNF- α (A), así como de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 (B). El bortezomib previene la formación de todos estos compuestos si se administra junto con el etanol (A-B), mientras que la rapamicina sólo evita de forma significativa la sobreproducción de IL-1 β (A) e iNOS (B). Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4-6 ratones/grupo. Significación estadística mediante análisis ANOVA (*post-hoc*, test Bonferroni), $p < 0,05$ (*) cuando se comparan los grupos tratados con etanol y los control; y $p < 0,05$ (#) entre los grupos tratados con etanol + inhibidor y los grupos tratados únicamente con etanol. Se evaluó la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

4.2 El etanol altera la proteólisis en células gliales en cultivo primario

4.2.1 El etanol no afecta a la acumulación de proteínas ubiquitinadas en cultivo de astrocitos

En primer lugar y siguiendo el patrón empleado para evaluar el consumo crónico de alcohol, se analizaron los efectos del etanol sobre la acumulación de proteínas ubiquitinadas. Para ello, se estimularon cultivos de astrocitos WT con una única dosis de etanol (50 mM, dosis fisiológicamente relevante) y se evaluó la cantidad total de proteína ubiquitinada a diferentes tiempos (0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 7 h, 24 h) por *western blot*. Se usó el mismo anticuerpo anti-ubiquitina, que reconoce preferentemente complejos poliubiquitinados y específicamente cuerpos de inclusión ubiquitinados que se forman cuando existen deficiencias en la proteólisis. Sin embargo y a diferencia de lo observado tras un consumo crónico, el etanol no produjo cambios en la acumulación de proteínas ubiquitinadas (Fig. 24A).

Para confirmar los resultados obtenidos, se analizó la presencia de proteína ubiquitinada también mediante microscopía confocal tras 3 h o 24 h de exposición al etanol. Las imágenes obtenidas mostraron una expresión de ubiquitina más o menos constante durante el lapso de tiempo estudiado (Fig. 24B).

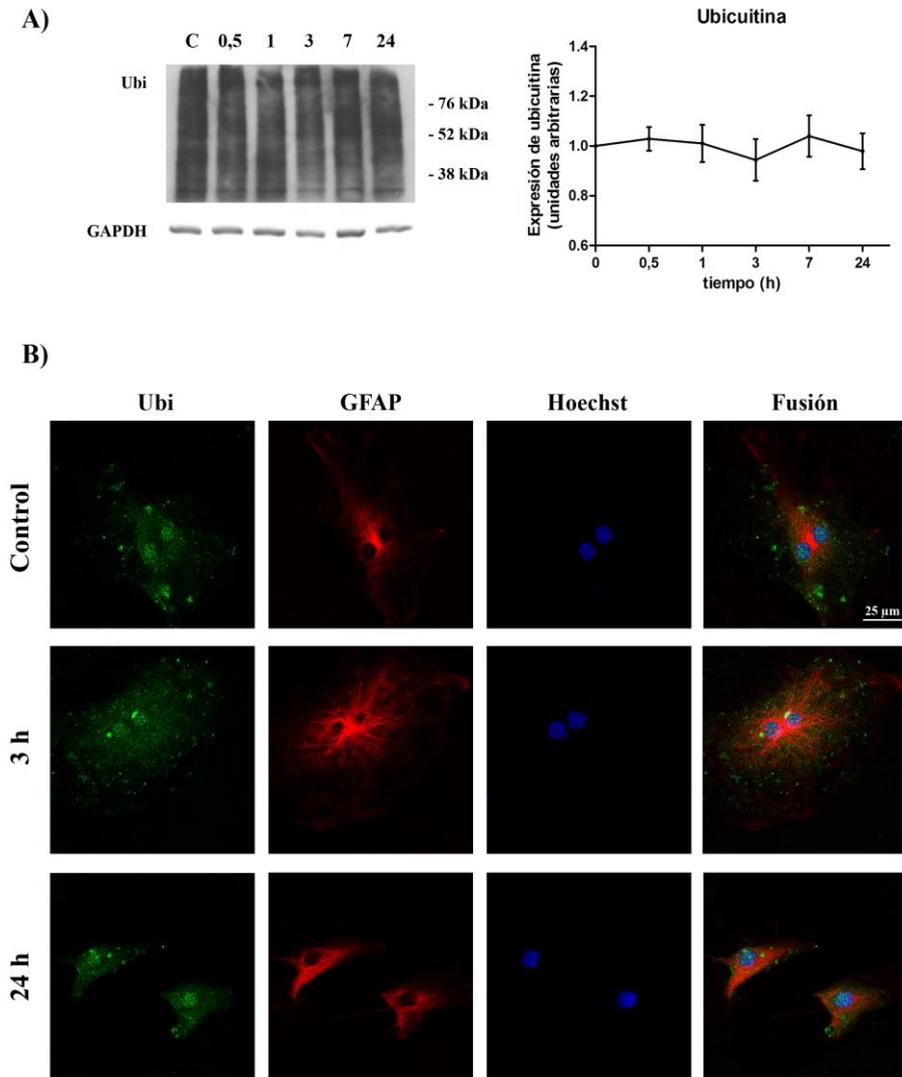


Figura 24. La incubación de astrocitos con etanol no produce cambios en la acumulación de proteínas ubiquitinadas. El etanol (50 mM) se añadió directamente al medio, y se evaluó su efecto sobre la ubiquitinación de proteínas a diferentes tiempos mediante *western blot* (A) e inmunofluorescencia (B, verde). Se usó la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, rojo) como marcador de astrocitos y el reactivo Hoechst (azul) para teñir los núcleos. Barra de escala: 25 µm.

4.2.2 El inmunoproteasoma se activa en células gliales incubadas con etanol

Para el estudio del sistema ubiquitina-proteasoma en células gliales, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos y microglía procedentes de corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO. Las células se estimularon con etanol (50 mM) y se evaluó el inmunoproteasoma a diferentes tiempos (0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 7 h, 24 h), dado que los resultados del análisis *in vivo* revelaron que los mayores cambios de expresión se producían en sus subunidades.

Las Figuras 25 y 26 muestran que el etanol produjo un incremento en la expresión de algunas de las principales subunidades del inmunoproteasoma, tanto en astrocitos como en microglía. En concreto, se produjo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de $\beta 1i$ y $\beta 5i$ a 7 h y 24 h, y de PSME1 a 24 h, en astrocitos WT (Fig. 25). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de estas proteínas en cultivos de astrocitos TLR4-KO.

En cultivos WT de microglía, el etanol incrementó los niveles de $\beta 1i$ a 24 h ($p < 0,05$), $\beta 2i$ a 1 h ($p < 0,05$) y a 3 h ($p < 0,01$), $\beta 5i$ a 3 h y 7 h ($p < 0,01$), y PSME1 a 24 h ($p < 0,05$) (Fig. 26). Por el contrario, no se observaron variaciones significativas en los niveles de expresión de las distintas proteínas en cultivos procedentes de corteza cerebral de ratones TLR4-KO (Fig. 26).

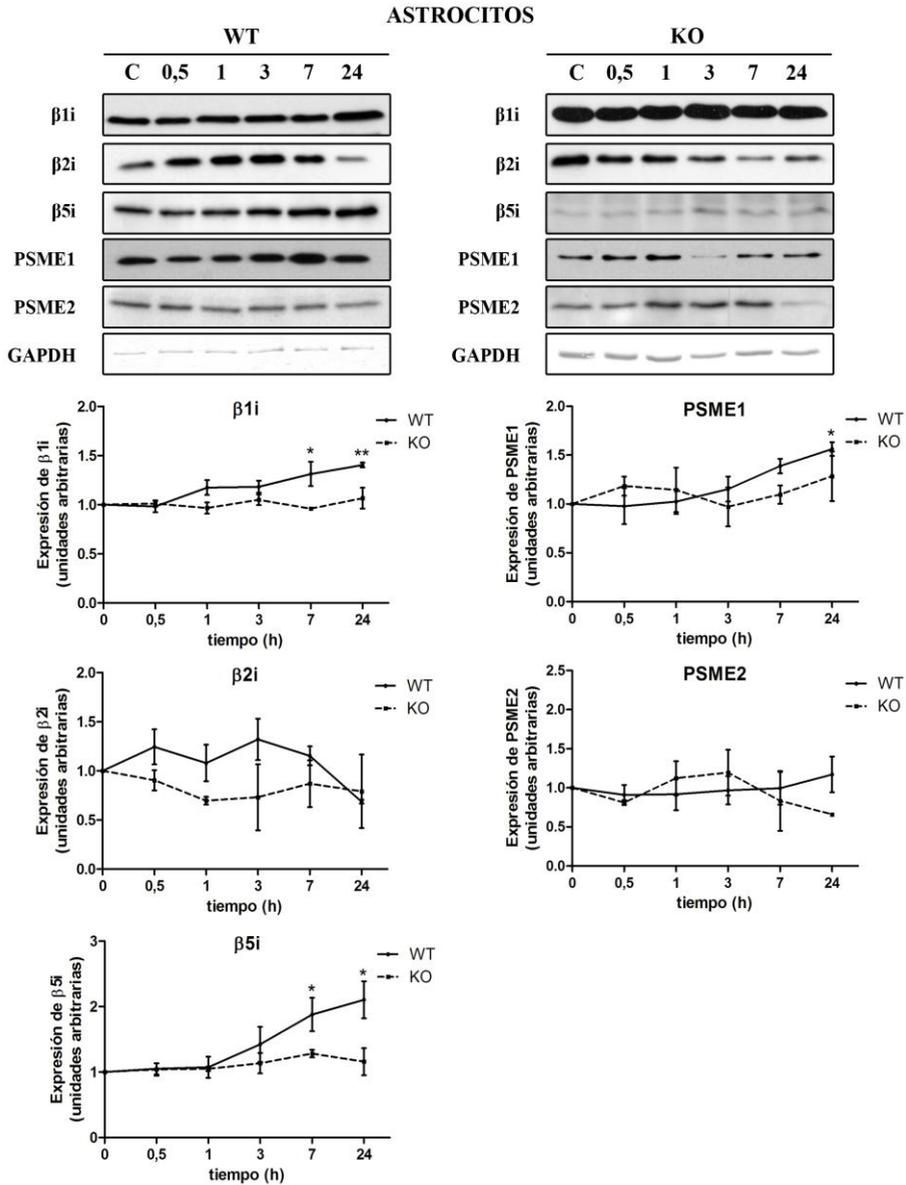


Figura 25. El etanol altera la expresión de las subunidades del inmunoproteasoma en cultivos de astrocitos WT y TLR4-KO. El etanol (50 mM) incrementa los niveles de expresión β 1i, β 5i y PSME1 a diferentes tiempos en astrocitos WT, pero no produce cambios en cultivos TLR4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4-6 cultivos/fenotipo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) mediante test ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett). Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

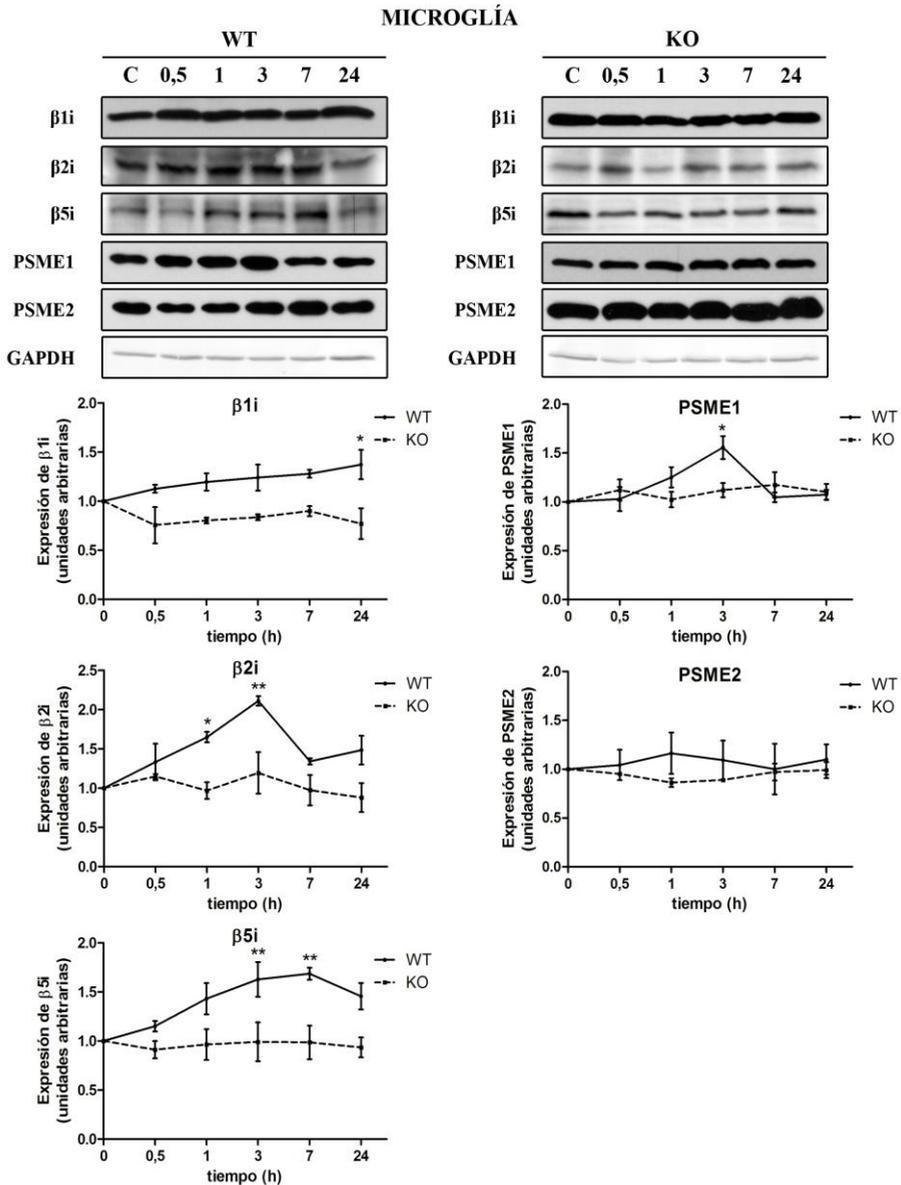


Figura 26. Efecto del etanol sobre la expresión de los componentes del inmunoproteasoma en cultivos de microglía WT y TLR4-KO. El etanol (50 mM) produce una sobreexpresión de las subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ y PSME1 en cultivos WT de microglía a diferentes tiempos, mientras que los niveles de expresión en cultivos TLR4-KO se mantienen constantes. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 4-6$ cultivos/fenotipo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) mediante test ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett). Se evaluó GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

4.2.3 La administración *in vitro* de etanol estimula la autofagia en células gliales

Para evaluar el efecto de una dosis aguda de etanol en la vía de la autofagia en células gliales, los astrocitos y la microglía se estimularon igualmente con etanol (50 mM) a diferentes tiempos (0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 7 h, 24 h). En los experimentos anteriores, el SBF se eliminó del medio de cultivo 24 h antes de la estimulación con etanol para evitar la activación de rutas metabólicas (sobre todo las relacionadas con la inflamación) y mantener los cultivos en condiciones basales. Sin embargo, se observó que la privación de suero producía un fuerte incremento de los niveles de proteínas autofágicas (datos no mostrados), de forma que se enmascaraban los posibles efectos del etanol sobre la autofagia, observándose además una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con esta vía especialmente evidentes a tiempos de incubación prolongados (Fig. 27). Estos resultados confirman otros estudios que demuestran que la privación de suero en cultivo *in vitro* de astrocitos causa un aumento en los niveles de autofagia (Janen *et al.*, 2010), y que si se le añade etanol al medio tras la estimulación autofágica, se produce una disminución de los niveles de las proteínas autofágicas ATG (von Haefen *et al.*, 2011). Por ello, y tras probar varias concentraciones de SBF en busca de los mejores resultados, se decidió reducir la concentración de suero en los cultivos a un 2% en lugar de eliminarlo totalmente antes de la estimulación con etanol.

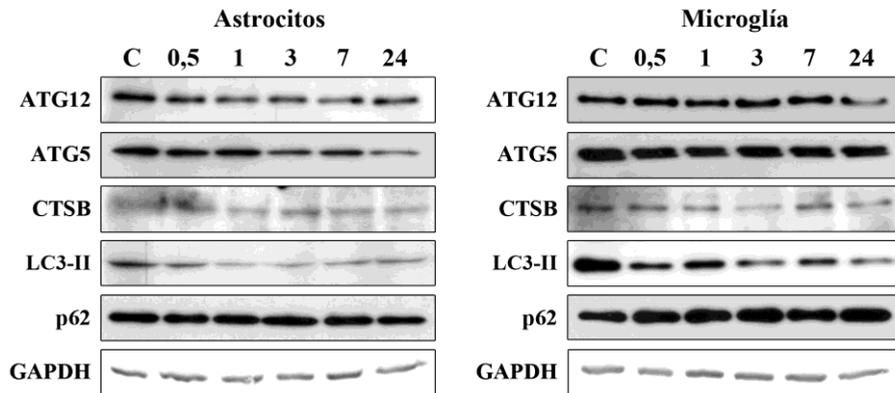


Figura 27. La incubación de astrocitos y microglía con etanol disminuye la expresión de las proteínas autofágicas inducidas por la privación de suero en cultivos WT de astrocitos y microglía. Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína, $n = 3$ cultivos/tipo celular.

Una vez conseguidas las condiciones experimentales apropiadas para el estudio de la autofagia *in vitro*, se evaluó la expresión de las mismas proteínas autofágicas analizadas *in vivo* a diferentes tiempos tras la estimulación con etanol. Como se puede apreciar en la Figura 28, la administración de etanol en astrocitos produjo un aumento estadísticamente significativo de la expresión de ATG12 a todos los tiempos estudiados ($p < 0,05$ – $p < 0,001$) y de LC3-II únicamente a 24 h. Sin embargo, no se produjeron cambios significativos en cultivos TLR4-KO.

Por otra parte, en cultivos WT de microglía también aumentó la expresión de ATG12 a 3 h, 7 h y 24 h ($p < 0,01$ – $p < 0,001$) y de LC3-II a 24 h, así como los niveles de catepsina B a todos los tiempos estudiados ($p < 0,05$ – $p < 0,001$). De nuevo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de las mismas proteínas en cultivos TLR4-KO (Fig. 29).

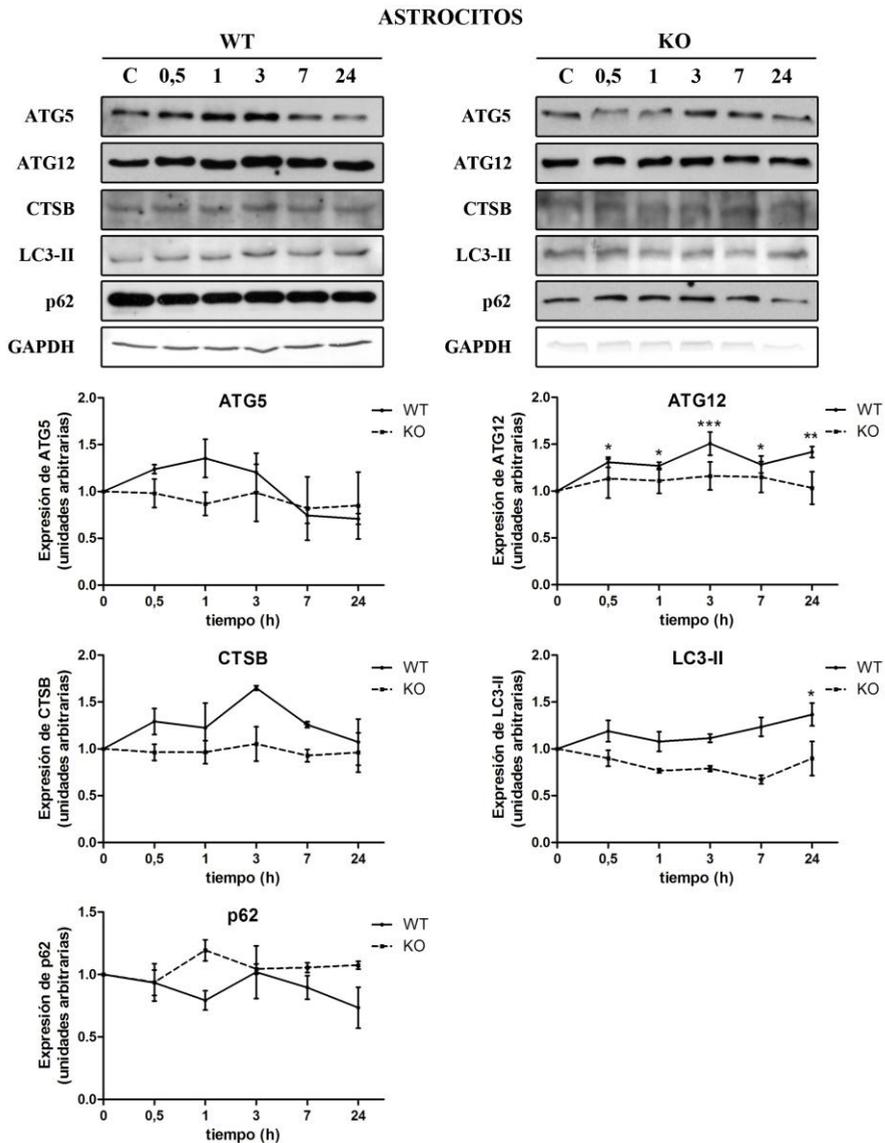


Figura 28. Efecto del etanol sobre la expresión de diferentes proteínas autofágicas en cultivos de astrocitos WT y TLR4-KO. La incubación de astrocitos con etanol (50 mM) induce la sobreexpresión de LC3-II a 24 h y de ATG12 a todos los tiempos estudiados, pero no produce cambios en cultivos TRL4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 4-6 cultivos/fenotipo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ mediante test ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett). Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

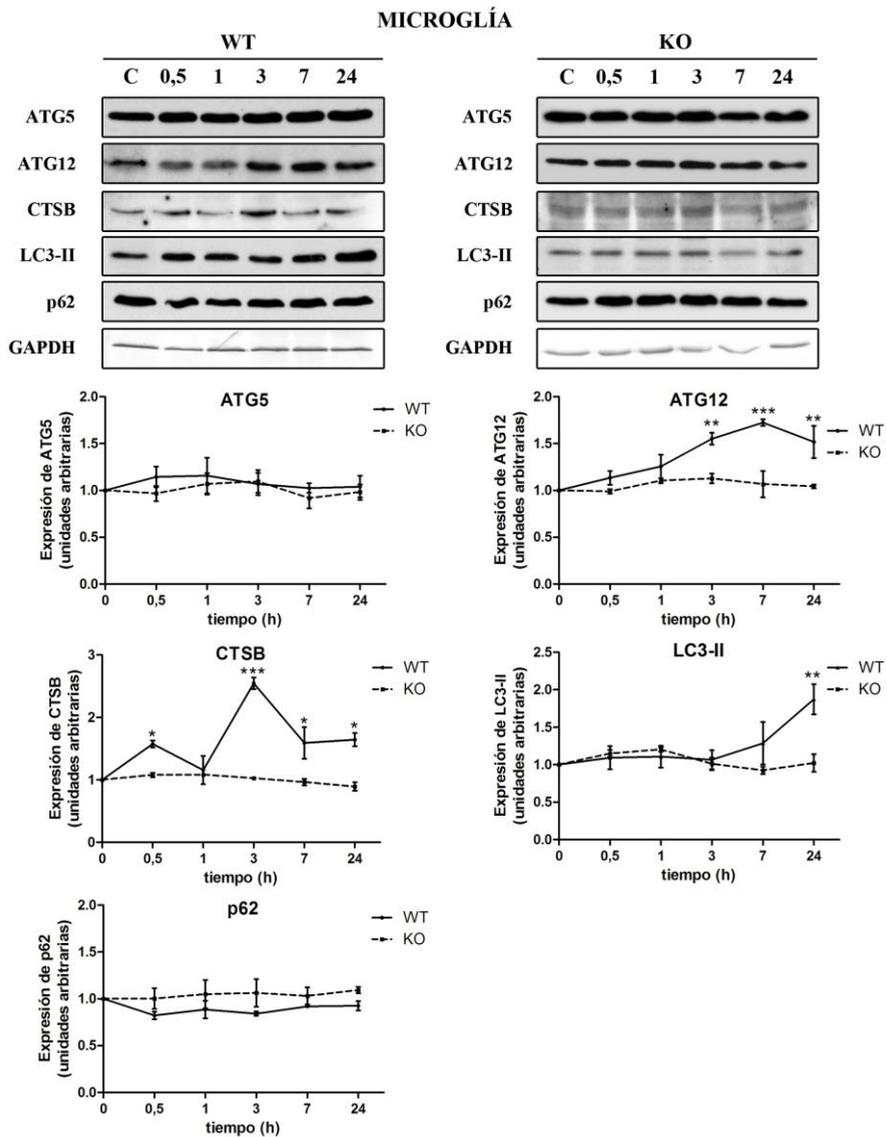


Figura 29. Efecto del etanol sobre la expresión de diferentes proteínas autofágicas en cultivos de microglía WT y TLR4-KO. El etanol (50 mM) induce la sobreexpresión de LC3-II a 24 h, y de ATG12 y catepsina B a partir de las 3 h, pero no produce alteraciones en cultivos TRL4-KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 4-6$ cultivos/fenotipo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ mediante test ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett). Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de GAPDH como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

A pesar de que cada molécula tiene su propio patrón de expresión tras la administración de etanol, tanto en astrocitos como en microglía se observa una tendencia en los cultivos WT hacia un aumento de los niveles de la mayoría de moléculas autofágicas, sobre todo a partir de las 3 h tras la administración de etanol. Para tratar de explicar las variaciones observadas, se evaluó si la sobreexpresión de estas proteínas se correlacionaba con variaciones en los niveles de fosforilación de mTOR (Fig. 30).

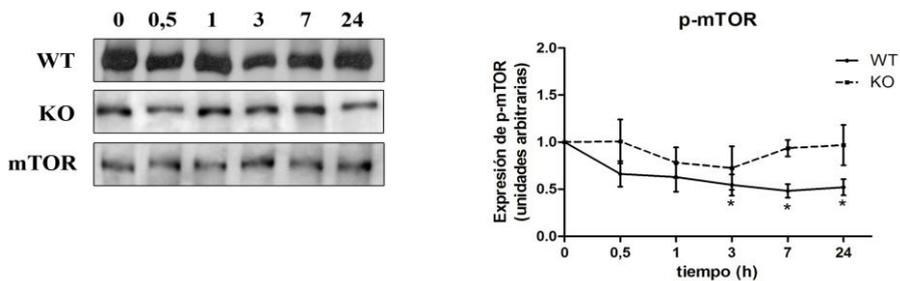


Figura 30. El tratamiento agudo de cultivos de astrocitos WT con etanol disminuye los niveles de fosforilación de mTOR. Se observa una disminución significativa de la fosforilación de mTOR a partir de las 3 h de exposición al etanol en cultivos de astrocitos WT, pero no en cultivos KO. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 4$ cultivos/fenotipo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) mediante test ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett). Las membranas fueron reutilizadas para evaluar la expresión de mTOR como control de carga. Se muestra un *blot* representativo de cada proteína.

En efecto, se observó una disminución significativa a partir de las 3 h ($p < 0,05$) en la cantidad de mTOR fosforilada en cultivos de astrocitos WT, pero no en cultivos KO (Fig. 30). Puesto que la fosforilación de mTOR inhibe la formación del complejo de inducción de la autofagia, la disminución observada en los niveles de fosforilación de mTOR podría ser responsable, al menos en parte, del aumento de expresión de algunas de las moléculas implicadas en el proceso autofágico.

4.2.4 El número de vacuolas autofágicas aumenta en astrocitos en cultivo tras la incubación con etanol

Para evaluar si los cambios observados anteriormente reflejaban alteraciones en la composición celular de estructuras relacionadas con la autofagia, se realizaron estudios de microscopía electrónica (Fig. 31).

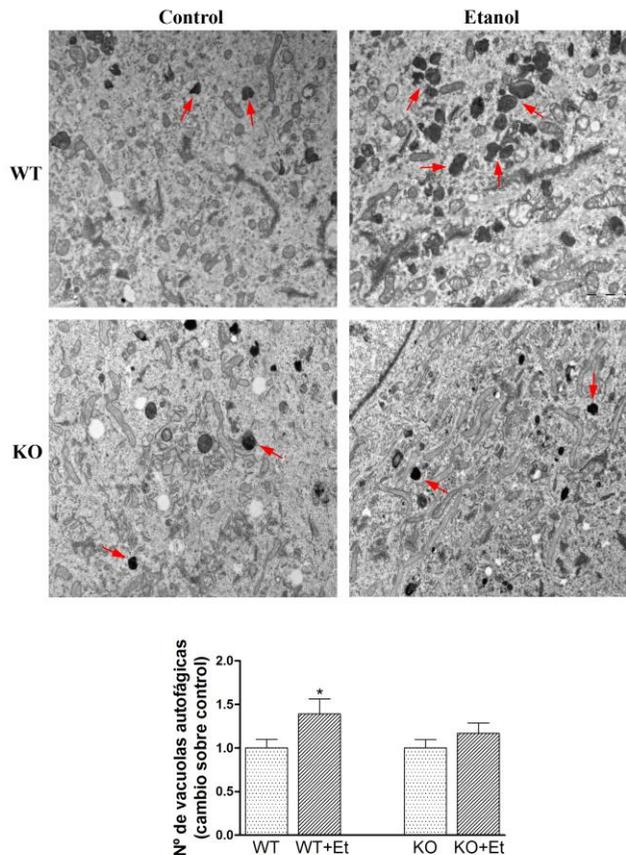


Figura 31. La incubación de astrocitos con etanol produce un aumento del número de vacuolas autofágicas en cultivos WT, pero no afecta a las células TLR4-KO. El etanol (50 mM) se añadió al medio de astrocitos WT y TLR4-KO. Tras 24 h de incubación se fijaron las células y se evaluó el número de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica. Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 3$ cultivos/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) mediante test t de Student. Barra de escala: 2 μ m.

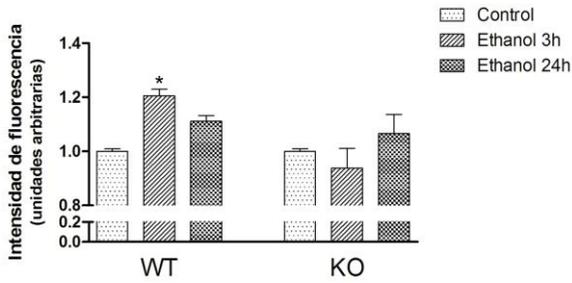
Los cultivos de astrocitos WT y TLR4-KO fueron tratados o no con etanol (50 mM) durante 24 h, y se evaluaron los posibles cambios producidos en las vacuolas autofágicas. La Figura 31 muestra que el etanol produjo un aumento del número de vacuolas en astrocitos WT. Por el contrario, estas alteraciones no se apreciaron en cultivos de TLR4-KO.

4.2.5 El etanol produce un aumento de la masa y el pH lisosomales en células gliales

Otro de los principales componentes celulares implicados en la autofagia es el lisosoma, orgánulo que se une con el autofagosoma para digerir su contenido mediante la acción de sus enzimas hidrolasas, como la catepsina B (Gondi and Rao, 2013). Puesto que habíamos observado que el etanol aumentaba los niveles de catepsina B en cultivos WT de células gliales, quisimos evaluar si este incremento se asociaba con alteraciones en la cantidad y/o funcionalidad de los lisosomas. Para ello, se analizaron la masa total de lisosomas y el pH de los mismos en cultivos de astrocitos.

Para el estudio de la masa lisosomal, se utilizó LysoTracker Red DND-99 (50 nM, Molecular Probes-Life Technologies) en cultivos de astrocitos control y tratados con etanol durante 3 h o 24 h y se midió la intensidad de fluorescencia por citometría. Como se aprecia en la Figura 32, el etanol produjo un aumento de la cantidad total de lisosomas a 3 h ($p < 0,05$) en cultivos WT. Además, estos datos fueron confirmados mediante imágenes de microscopía confocal, donde se observa claramente un aumento de la masa lisosomal en astrocitos incubados con etanol. No se produjeron variaciones significativas en cultivos TLR4-KO.

A)



B)

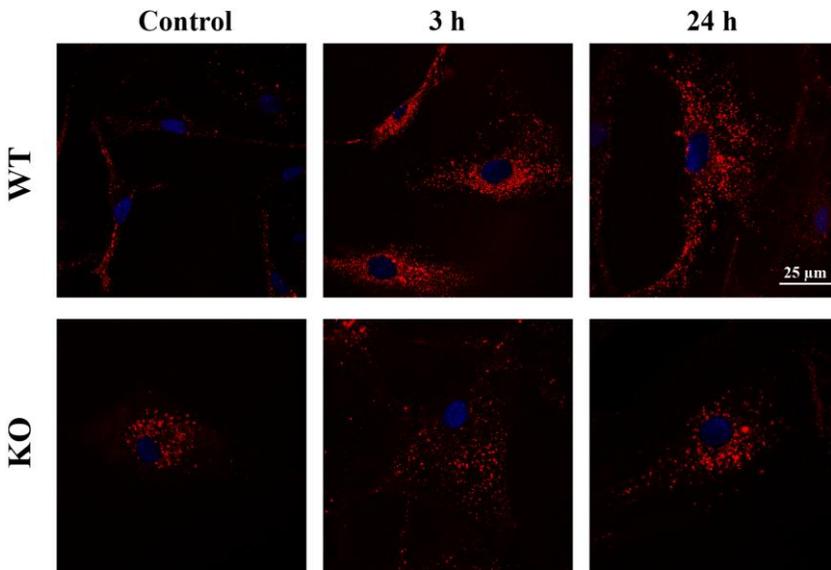
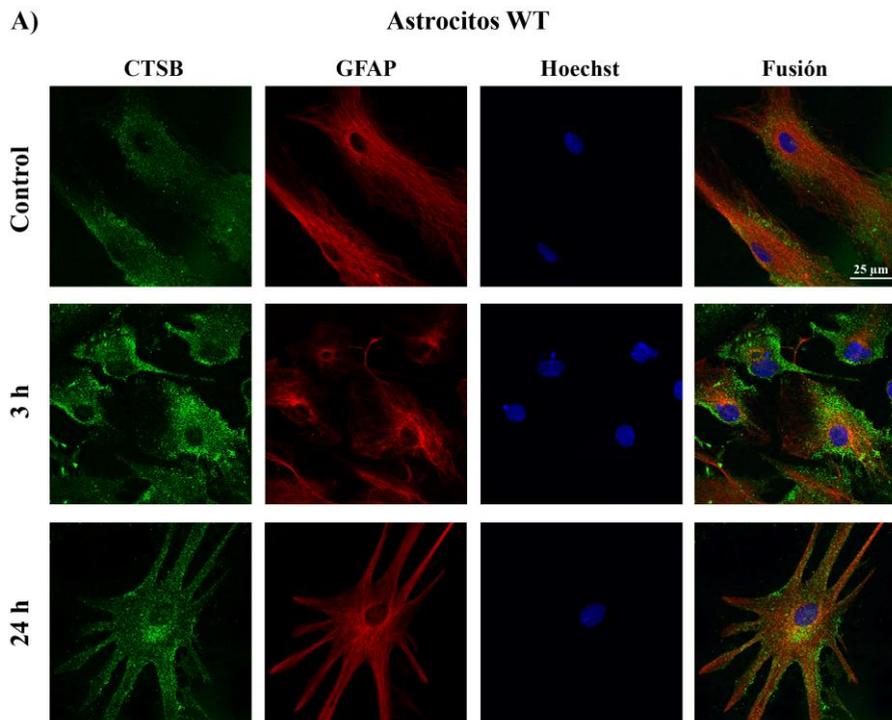


Figura 32. Efecto del etanol sobre la masa lisosomal en cultivos de astrocitos. Se estimularon astrocitos WT y TLR4-KO con etanol (50 mM) durante 3 h o 24 h en presencia de Lysotracker Red, que se une a los lisosomas. Se analizó la fluorescencia emitida mediante citometría de flujo (A) y los datos obtenidos se corroboraron por microscopía confocal (B). Los datos se expresan como media \pm SEM, $n = 8-12$ cultivos/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) mediante análisis ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett). Barra de escala: 25 μ m.

Para tratar de corroborar los datos obtenidos mediante citometría y *western blot*, analizamos los niveles de expresión de catepsina B, una de las principales hidrolasas lisosomales, mediante estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal. La Figura 33 muestra que el etanol aumentó los niveles de expresión de esta proteína en astrocitos WT tanto a 3 h como a 24 h. Sin embargo, la expresión de catepsina B tras la adición de etanol en cultivos de astrocitos TLR4-KO se mantuvo constante.



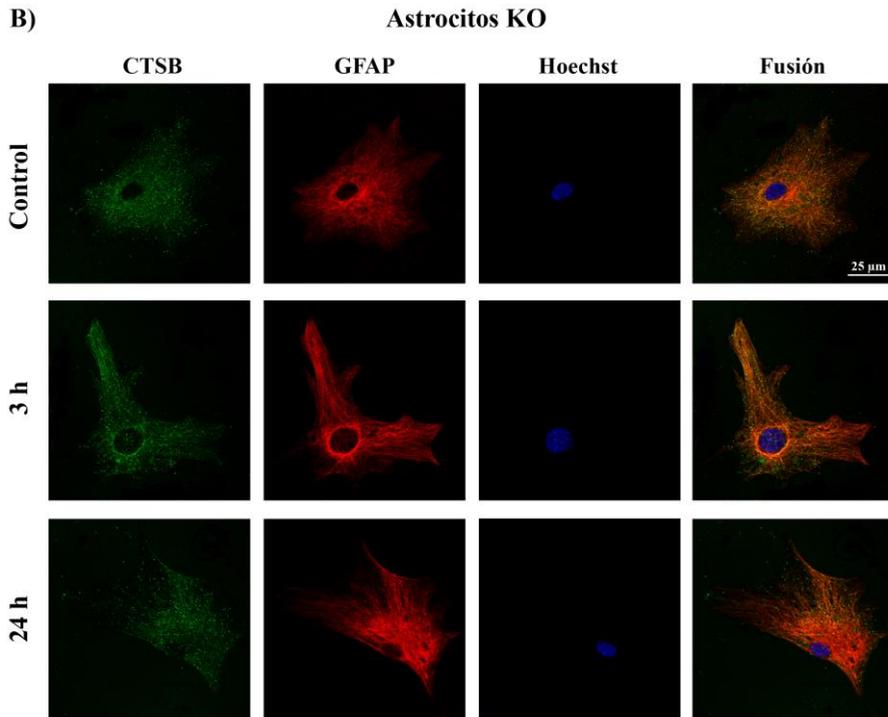


Figura 33. El etanol aumenta los niveles de expresión de catepsina B en cultivos de astrocitos WT. Las imágenes muestran la expresión de catepsina B (verde), GFAP (rojo) y los núcleos (azul) en cultivos de astrocitos WT (A) y TLR4-KO (B) tras el tratamiento con etanol (50 mM) a 3 h o 24 h. Barra de escala: 25 µm.

Mediante la adición de FITC-dextrano (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) al medio, se evaluó mediante citometría de flujo el pH de los lisosomas. La Figura 34 muestra que el etanol incrementó ligeramente el pH de estos orgánulos a 3 h (0,3 unidades; $p < 0,05$) y a 24 h (0,4 unidades; $p < 0,01$) en astrocitos WT, pero no produjo cambios en cultivos TLR4-KO.

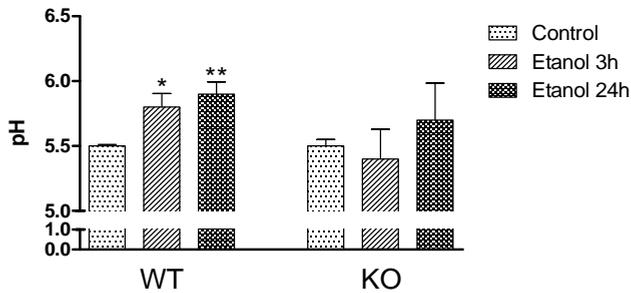
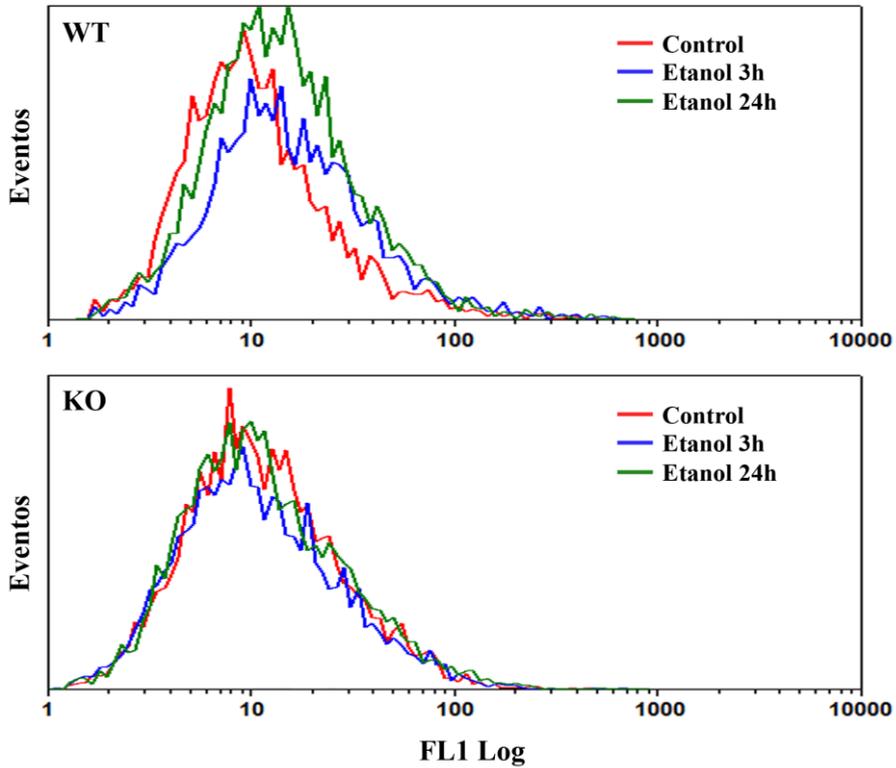


Figura 34. Efecto del etanol sobre el pH de los lisosomas en cultivos de astrocitos WT y TLR4-KO. Los astrocitos se incubaron con etanol (50 mM) en presencia de FITC-dextrano y se midió el pH de los lisosomas mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos indican que el etanol aumenta significativamente el pH de los lisosomas de astrocitos WT tras 3 h y 24 h de incubación. Los datos se expresan como media \pm SEM, n = 8-12 cultivos/grupo. Se asumió significación estadística para $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**) mediante análisis ANOVA (*post-hoc*, test Dunnett).

5 Discusión

Estudios recientes señalan la importancia de los procesos proteolíticos tanto en la respuesta inmune innata como en la patología de numerosos trastornos inflamatorios y degenerativos (Cheung and Ip, 2011; Dasuri *et al.*, 2013; Ying *et al.*, 2013). Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que el etanol, mediante la activación de los receptores del sistema inmune innato TLR4 en las células gliales, incrementa la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios, y causa neuroinflamación y daño cerebral (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010; Blanco and Guerri, 2007; Blanco *et al.*, 2005; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009). Sin embargo, todavía se desconoce si la activación neuroinmune inducida por el etanol altera los procesos proteolíticos neurales que también pueden contribuir al daño cerebral. El presente trabajo demuestra por primera vez que el consumo crónico de etanol altera el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de la autofagia, y causa una acumulación de proteínas ubiquitinadas en corteza cerebral, eventos que podrían participar en el daño cerebral y la neurodegeneración inducidos por el etanol. Nuestro trabajo también muestra la importancia de la activación de los receptores TLR4 en los procesos proteolíticos en cerebro, ya que la eliminación de TLR4 suprime las disfunciones de ambas vías proteolíticas causada por el etanol, así como la acumulación de proteínas ubiquitinadas, lo que sugiere que el receptor TLR4 tiene un papel esencial en estos procesos patológicos.

5.1 Acumulación de proteínas ubiquitinadas y neurodegeneración

La acumulación y agregación de proteínas es una característica común entre muchas patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la ataxia espinocerebelar, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades por priones (Yamamoto and Simonsen, 2011). Muchas de estas enfermedades neurodegenerativas están causadas por mutaciones que resultan en la producción de proteínas defectuosas o mal plegadas específicas para cada patología. Por este motivo, la degradación mediada por ubiquitina de estas proteínas por el proteasoma constituye una parte crítica de la maquinaria de control de calidad citoprotectora, ya que defectos en este sistema pueden llevar a una acumulación de proteínas aberrantes. De hecho, en estadios tardíos de ciertas patologías neurodegenerativas, las proteínas mutantes tienden a formar agregados ubiquitinados al exceder su producción continua la capacidad del SUP, que a su vez puede estar alterado de forma previa (Le, 2014).

El presente trabajo demuestra que el consumo crónico de etanol es capaz de provocar una acumulación de proteínas ubiquitinadas en corteza cerebral de ratones WT (Fig. 9), efectos que podrían estar asociados con alteraciones en el SUP y en su versión inducible, el inmunoproteasoma, así como con una disfunción del proceso autofágico (Fig. 35). De acuerdo con nuestros resultados y los hallazgos anteriores de nuestro laboratorio, estudios de *microarrays* en corteza frontal de personas alcohólicas revelan alteraciones en la expresión de genes relacionados no sólo con el SUP y los lisosomas, sino también con procesos apoptóticos, de mielinización, estrés

y respuesta inmune (Liu *et al.*, 2006; Sokolov *et al.*, 2003). Por el contrario, cabe destacar que la administración aguda de etanol en cultivos de astrocitos no genera una mayor acumulación de agregados proteicos (Fig. 24). Esto puede ser debido a que dichos agregados o bien no llegan a producirse, o a que si se generan, son eliminados de forma eficiente.

La relevancia patogénica de los agregados en la neurodegeneración es un tema controvertido, ya que se desconoce si este evento es favorable o desfavorable en el proceso patogénico de la neurodegeneración. Esto es debido, en parte, a que es difícil establecer una relación clara entre los defectos en estas patologías y el sistema ubiquitina-proteasoma. Muchas de estas enfermedades, como por ejemplo el Alzheimer y el Parkinson, no son entidades clínicas definidas, sino más bien síndromes con diferentes etiologías y con una característica común, como es el deterioro cognitivo. En este sentido, algunos estudios apuntan a que los agregados proteicos solubles pueden inhibir el SUP (Bence *et al.*, 2001). Sin embargo, un concepto cada vez más aceptado en este campo es que el secuestro de los agregados proteicos del citosol y núcleo, y su concentración en cuerpos de inclusión, separa estos agregados de sistemas celulares como el aparato transcripcional, y que por lo tanto podrían ejercer una función protectora (Pastore and Temussi, 2012; Rubinsztein, 2006).

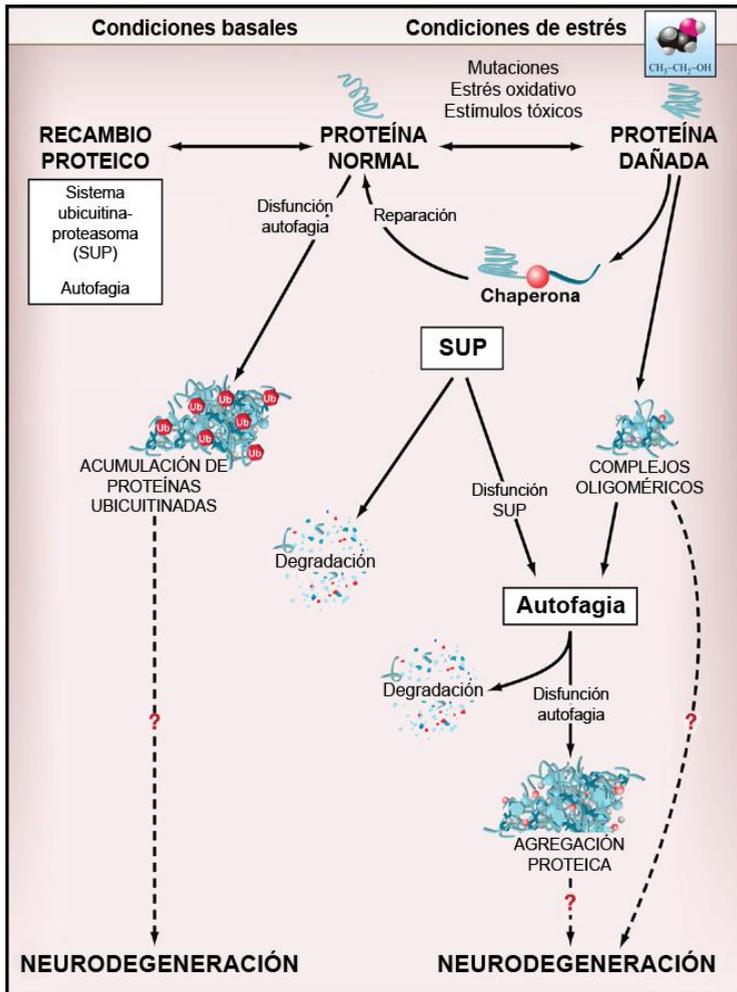


Figura 35. El consumo crónico de etanol puede provocar una acumulación de proteínas y la aparición de neurodegeneración a través de la afectación de los sistemas proteolíticos. Las proteínas sufren un recambio proteico rutinario mediante los sistemas de degradación de proteínas, el SUP y la autofagia. Estímulos tóxicos como el etanol producen alteraciones en las proteínas que pueden dar lugar a su acumulación. En condiciones normales, estas proteínas son reparadas (chaperonas) o eliminadas (SUP y autofagia). Sin embargo, ante disfunciones en los sistemas proteolíticos, la acumulación de proteínas dañadas puede ocasionar la aparición de neurodegeneración. SUP, sistema ubiquitina-proteasoma. (Adaptada de Levine and Kroemer, 2008).

La generación de estos agregados depende en gran medida de la patología estudiada. En el caso de la neurodegeneración inducida por el consumo de etanol, la mayoría de estudios se han realizado en el hígado, como se ha comentado en la introducción. En este órgano, se ha propuesto que las enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol, como la alcohol deshidrogenasa (ADH) o el citocromo P450 2E1 (CYP2E1), podrían interferir con los mecanismos de degradación de proteínas, causando alteraciones tanto en el sistema ubiquitina-proteasoma (Osna and Donohue, Jr., 2007), como en la vía de la autofagia (Osna *et al.*, 2011; Thomes *et al.*, 2013). Por lo tanto, el ambiente oxidativo generado por CYP2E1 junto con la disfunción de los sistemas proteolíticos serían en este caso los responsables de la toxicidad inducida por el consumo de alcohol. En otros órganos, estudios recientes indican la participación de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) en la inducción de la autofagia mediada por AMPK en corazón (Ge *et al.*, 2011), o la implicación de la enzima catalasa en la generación de daño oxidativo en cerebro (Ledesma *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). En cualquier caso, una de las características comunes en todos los órganos y modelos estudiados es la afectación de los mecanismos proteolíticos y su relación con la generación de un ambiente oxidativo tóxico para la célula, que se produce como consecuencia del metabolismo del etanol. De hecho, resultados de nuestro laboratorio demuestran que el consumo crónico de alcohol induce el CYP2E1, y causa aumento de ROS (Fig. 21) y peroxidación lipídica en cerebro de animales (Montoliu *et al.*, 1994) y en astrocitos expuestos al etanol (Montoliu *et al.*, 1995).

En resumen, aunque los datos hasta el momento no clarifican si la acumulación de agregados proteicos es o no beneficiosa para la célula, es

posible sugerir que aunque inicialmente y en una fase temprana pueda ser favorable para la célula, su acumulación durante el transcurso de la enfermedad puede, por otra parte, causar disfunciones o bloquear la vía del SUP y otras vías de degradación de proteínas como la autofagia, y participar en la neurotoxicidad y neurodegeneración.

5.2 Importancia del proteasoma constitutivo e inducible en la neuroinflamación y neurodegeneración

Como se ha comentado en la introducción, en presencia de un ambiente proinflamatorio, el proteasoma constitutivo 20S es reemplazado por el inmunoproteasoma, principalmente a través de la expresión de las citoquinas IFN- γ y TNF- α (Basler *et al.*, 2012). De hecho, la inducción del inmunoproteasoma ocurre en diferentes enfermedades neurodegenerativas asociadas con procesos neuroinflamatorios (Diaz-Hernandez *et al.*, 2003; Orre *et al.*, 2013), y también en patologías que cursan con daño cerebral (Yao *et al.*, 2008). Nuestros resultados en cultivos de astrocitos y microglía indican que el tratamiento agudo o de una dosis de etanol induce un aumento significativo en la expresión de las subunidades inducibles del inmunoproteasoma β 1i, β 2i y β 5i, así como de la partícula reguladora PA28 α (Figs. 25 y 26). Además, estos cambios no sólo se producen tras un tratamiento agudo *in vitro*, sino que el consumo crónico de etanol también incrementa los niveles de β 2i, β 5i y PA28 α en la corteza de cerebral de ratones WT, y reduce algunas de las subunidades del

proteasoma constitutivo 20S ($\beta 5$ y $\alpha 2$), a través de la sobreexpresión de IFN- γ (Fig. 11).

El cambio de composición a favor del inmunoproteasoma se correlaciona con un incremento en las actividades tipo quimotripsina y tripsina, como se demuestra en este trabajo (Fig. 12), coincidiendo con otros estudios (Gaczynska *et al.*, 1993; Gaczynska *et al.*, 1994). No obstante, a pesar de este incremento en las actividades proteasomales, el etanol causa también una gran acumulación de agregados ubiquitinados. La acumulación de estos agregados podría ser atribuible bien a un exceso de proteínas ubiquitinadas, que sobrepasan la capacidad degradativa del proteasoma, o a la incapacidad de estas formaciones para entrar en la cavidad del proteasoma, tal y como han sugerido algunos autores (Canu *et al.*, 2000). Hay que resaltar que el inmunoproteasoma es una estructura especializada en el procesamiento de péptidos pequeños para la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad CMH-I. Sin embargo, el cambio de su actividad no afecta a su capacidad para degradar totalmente proteínas ubiquitinadas (Gaczynska *et al.*, 1993). Por lo tanto, la inducción del inmunoproteasoma en detrimento del proteasoma constitutivo puede explicarse por la necesidad de una mayor presentación antigénica (Gavilan *et al.*, 2009; Seifert *et al.*, 2010) para generar una respuesta inmune eficiente en situaciones de estrés, tales como la generación de toxicidad producida por el etanol. De hecho, la activación de la actividad tipo quimotripsina, asociada a la subunidad $\beta 5i$, se ha relacionado recientemente con la generación y el mantenimiento de un ambiente inflamatorio (Basler *et al.*, 2010; Muchamuel *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2012). El uso de inhibidores

de esta actividad, como el bortezomib, se ha descrito en muchas terapias anticancerígenas (Jones *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2012), trastornos neurodegenerativos (Shah and Di, 2007) y otras patologías inflamatorias crónicas (Chen *et al.*, 2012a). Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la administración de bortezomib previene la sobreexpresión de citoquinas y otros mediadores inflamatorios inducidos por el consumo crónico de alcohol en corteza cerebral de ratones WT, lo que corrobora el papel del etanol en la disfunción del SUP (Fig. 23).

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran la participación de los receptores TLR4 y su respuesta en la liberación de citoquinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6) y mediadores inflamatorios inducida por el etanol, así como en la aparición de daño cerebral (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2005; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009). Los resultados del presente estudio también apoyan el papel del TLR4 y de la activación del sistema neuroinmunitario en las alteraciones proteolíticas inducidas por el etanol, ya que la deficiencia en estos receptores en los ratones TLR4-KO reduce significativamente las alteraciones del sistema ubiquitina-proteasoma inducidas por el etanol. De acuerdo con nuestros resultados, diferentes trabajos indican que la activación de los receptores TLR4 promueve la sobreexpresión de las subunidades del inmunoproteasoma e incrementa su actividad tanto *in vitro*, en células microgliales estimuladas con LPS (Orre *et al.*, 2013), como *in vivo*, en ratas inyectadas con LPS (Pintado *et al.*, 2012). Estos hallazgos, junto con nuestros resultados, sugieren que la eliminación de TLR4 podría reducir el ambiente inflamatorio producido por el etanol, lo que podría favorecer la reducción o incluso evitar la activación del inmunoproteasoma. De acuerdo con esta hipótesis, en el presente trabajo

se demuestra por primera vez que el etanol no produce alteraciones ni en el proteasoma ni en el inmunoproteasoma cuando se elimina la respuesta de TLR4 en ratones TLR4-KO (Figs. 10-11 y 25-26). La ausencia de los efectos del etanol en ratones TLR4-KO podría estar asociada con la falta de un ambiente celular inflamatorio en el cerebro. Además, la eliminación de TLR4 previene la acumulación de proteínas ubiquitinadas inducida por el abuso crónico de alcohol en corteza cerebral.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, los resultados indican que las alteraciones causadas por el etanol en el sistema ubiquitina-proteasoma se podrían englobar dentro de una respuesta neuroinflamatoria general, destinada a la generación de una correcta respuesta inmune innata. En concreto, el papel del inmunoproteasoma sería el de generar antígenos de las especies tóxicas presentes en el medio. Esta respuesta inmune sería efectiva ante estímulos tóxicos puntuales como la administración de etanol, atenuándose la misma tras la eliminación de las células o componentes celulares que hayan resultado dañados. Por ejemplo, en un estudio reciente realizado en ratas, se demuestra que la viabilidad neuronal se mantiene ante estímulos puntuales con el ligando de TLR4, LPS (Pintado *et al.*, 2012). Sin embargo, durante la respuesta inflamatoria las neuronas se vuelven más vulnerables a la inhibición del proteasoma. De hecho, la inhibición selectiva de la actividad proteasomal con lactacistina en un ambiente inflamatorio favorece la expresión de moléculas proapoptóticas y la degeneración neuronal, además de producir la formación de agregados proteicos (Pintado *et al.*, 2012). Estos agregados también se observan tras el tratamiento con IFN- γ en células carentes de inmunoproteasoma (Witt *et al.*, 2000), lo que sugiere que este complejo tiene un papel esencial tanto

en la inflamación mediada por citoquinas como en la eliminación de proteínas dañadas y agregados proteicos. Por el contrario, en el caso de un consumo crónico de etanol se produce una respuesta inmune continuada que se traduce en una neuroinflamación crónica. Este ambiente inflamatorio se caracteriza, además de por una mayor expresión del inmunoproteasoma (debido a la sobreexpresión de factores inductores del mismo como IFN- γ o TNF- α), por la acumulación de proteínas ubiquitinadas, que forman agregados que exceden la capacidad degradativa del proteasoma. Estos dos eventos también se han descrito en una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas que cursan con inflamación crónica (Mishto *et al.*, 2010; Mishto *et al.*, 2011). Ello plantea la cuestión de si el inmunoproteasoma tiene una función protectora, como un intento de las células neurales por lidiar con la progresiva acumulación de proteínas dañadas, o si por el contrario tiene un efecto perjudicial. En este sentido, existen evidencias para ambas posibilidades: la sobreexpresión del inmunoproteasoma tendría un papel protector en el contexto de la neuroinflamación aguda, pero podría también ser perjudicial cuando la neuroinflamación se vuelve crónica, como ocurre en la mayoría de patologías neurodegenerativas.

5.3 Papel de la autofagia en la neurodegeneración

La autofagia constituye la segunda gran vía proteolítica, y su principal función es la de mantener la homeostasis celular reciclando principalmente orgánulos dañados y proteínas de larga vida media. A pesar de que siempre se ha considerado como un mecanismo de degradación

inespecífico e independiente, evidencias recientes indican que existe un tipo de autofagia selectiva, cuyo papel es esencial en la degradación de agregados proteicos ubiquitinados que sobrepasan la capacidad degradativa del SUP (Cecarini *et al.*, 2012; Lilienbaum, 2013). Una proteína clave en este proceso es p62/SQSTM1, ya que dirige dichos agregados hacia la maquinaria autofágica, mediante interacción directa con LC3 (Pankiv *et al.*, 2007). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento crónico con etanol causa una disminución significativa de p62, así como de su colocalización con LC3, y de las proteínas autofágicas ATG5, ATG12 y de la propia LC3 (Figs. 13 y 14). Ello sugiere que la acumulación de proteínas ubiquitinadas también podría estar relacionada con una deficiencia en la maquinaria autofágica. Los resultados obtenidos por microscopía electrónica apoyan la participación del etanol en la alteración del proceso autofágico, ya que este induce un incremento de volumen en las vacuolas autofágicas (Fig. 16). Basándonos en estos datos, se podría postular que la acumulación de vacuolas autofágicas de mayor tamaño podría agravar el proceso neuropatológico. Además, debido a la menor expresión de las proteínas ATG como LC3, componente de las membranas autofagosómicas, estas vacuolas podrían ser defectivas, lo que dificultaría su correcta eliminación y la generación de nuevas vacuolas funcionales. No obstante, serían necesarios más estudios para determinar el papel que tienen estas vacuolas engrosadas, y si realmente son capaces de fusionarse con los lisosomas y cumplir su función. A este respecto, el descenso en los niveles de la hidrolasa lisosomal catepsina B obstaculizaría la correcta degradación del material engullido una vez producida la fusión con los lisosomas. De acuerdo con esto, se ha observado que la presencia de agregados proteicos inhibe la degradación lisosomal en neuronas y vuelve a los lisosomas más

vulnerables ante el estrés oxidativo (Terman and Brunk, 2004a; Terman and Brunk, 2004b). Además, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer se produce una acumulación de vesículas autofágicas que parece estar ocasionada por defectos en su eliminación y reciclaje, más que por defectos en su inducción (Boland *et al.*, 2008).

Nuestros resultados sugieren que el consumo crónico de alcohol reduciría o impediría el flujo autofágico a través de una disminución de las principales moléculas implicadas en esta vía, evento que contribuiría a la neurodegeneración (Ravikumar *et al.*, 2010). Coincidiendo con nuestros resultados, numerosas enfermedades neurodegenerativas cursan con una actividad autofágica impedida (Niedzwiedzka-Rystwej *et al.*, 2013; Nixon, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que neuronas deficientes en ATG5 presentan una neurodegeneración progresiva asociada a la formación de agregados ubiquitinados y cuerpos de inclusión (Hara *et al.*, 2006). Además, también se ha demostrado que algunas de las proteínas aberrantes implicadas en estas patologías pueden modular la autofagia (Knecht *et al.*, 2012). En general, se asume que la autofagia tiene una función protectora y en muchas de estas patologías la activación de esta vía tiene un efecto beneficioso en la eliminación de agregados proteicos (Deretic and Klionsky, 2008). Una diana esencial en la regulación vía de la autofagia es mTOR, un complejo proteico con actividad quinasa que regula negativamente la autofagia (Zhang *et al.*, 2013). La modulación farmacológica de mTOR con inhibidores tales como la rapamicina promueve la degradación autofágica de proteínas con tendencia a agregar *in vitro*, y disminuye la severidad de la neurodegeneración y neuroinflamación en diferentes modelos *in vivo* (Sarkar and Rubinsztein, 2008; Wang and Mandelkow, 2012). De acuerdo

con estos resultados, el presente trabajo demuestra que la administración de rapamicina reduce parcialmente la neuroinflamación en ratones WT tratados con etanol (Fig. 23). Además, puesto que mTOR es activado por las cascadas de señalización PI3K-I/Akt y MAPK/Erk1/2 (Laplante and Sabatini, 2012a; Laplante and Sabatini, 2012b) y dado que TLR4 activa estas dos vías de señalización, es posible que TLR4 esté modulando de forma indirecta la autofagia. En este sentido, nuestros resultados indican que en ausencia de la respuesta del receptor TLR4, el consumo crónico de etanol no induce cambios en los niveles de fosforilación de mTOR (Fig. 15), ni en la expresión de las principales proteínas autofágicas (ATG5, ATG12, LC3), p62/SQSTM1 o la hidrolasa lisosomal catepsina B en corteza cerebral de ratones TLR4-KO (Fig. 13).

Un dato que resulta algo contradictorio en el marco de una disminución de los niveles de autofagia es la baja expresión de p62/SQSTM1. Esta proteína se une a LC3 y es degradada selectivamente por autofagia, de manera que bajo circunstancias normales sirve como un indicador negativo de la actividad autofágica (Bjorkoy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007). Por lo tanto, cabría esperar un aumento en su expresión antes que la disminución observada. Sin embargo, estudios más recientes indican que el daño oxidativo que ocurre en procesos neuroinflamatorios podría afectar al promotor de p62/SQSTM1, causando una disminución en los niveles de proteína de p62/SQSTM1, tal y como se observa en muchas enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson o Huntington (Du *et al.*, 2009). En este sentido, se ha propuesto que tratamientos farmacológicos que incrementen la expresión de esta proteína podrían ser beneficiosos para retrasar la aparición de

neurodegeneración. La razón de este beneficio residiría en que la sobreexpresión de p62 incrementaría el tráfico de los complejos poliubiquitinados hacia la maquinaria proteolítica, gracias al dominio de unión a ubiquitina de p62/SQSTM1. De todas formas, hay que tener precaución en la interpretación de los datos obtenidos con marcadores autofágicos como p62/SQSTM1 o LC3-II (Klionsky *et al.*, 2012; Mizushima *et al.*, 2010). De hecho, la autofagia es un proceso dinámico y muchas veces la medida de estas proteínas en un momento determinado puede ser engañosa y no reflejar la realidad. Así, la medida de los niveles de estas proteínas puede dar una idea de los niveles de actividad autofágica, pero para medir el flujo habría que usar inhibidores lisosomales. Además, en el caso de LC3, en que se suele medir la conversión de LC3-I a LC3-II, la detección del LC3-II mediante *western blot* tiende a ser más sensible que la del LC3-I (como se comprobó en las inmunotransferencias realizadas). Por tanto, la medida de la relación o la suma de LC3-I y LC3-II no sería apropiada, y lo correcto sería comparar únicamente los niveles de LC3-II entre muestras (Mizushima and Yoshimori, 2007).

5.3.1 El alcohol puede inhibir o inducir la autofagia

Algunos estudios indican que el alcohol puede tanto inhibir como inducir la autofagia, dependiendo del modelo experimental, dosis y tipo de exposición (por ejemplo, aguda o crónica). Esto se explica porque la regulación de la autofagia por el etanol es compleja, y en ella intervienen directamente muchas rutas moleculares como mTOR, el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), Beclin 1 o Bcl-2 (Cui *et al.*, 2013), además de otros procesos que también

influyen indirectamente como la inflamación, apoptosis o neurodegeneración. Por ello, no es de extrañar que la respuesta autofágica ante estímulos agudos de etanol *in vitro* difiera de la obtenida tras un consumo crónico *in vivo*. Los resultados obtenidos por *western blot*, tanto en cultivos WT de astrocitos como de microglía, revelan una inducción de la autofagia (Figs. 28 y 29). En concreto, el tratamiento agudo de etanol *in vitro* produce una sobreexpresión estadísticamente significativa de algunas de las proteínas ATG como ATG12 o LC3/ATG8 a diferentes tiempos, posiblemente inducida por un descenso en los niveles de fosforilación de mTOR, como se demuestra en cultivos de astrocitos WT (Fig. 30). Además, en este caso el marcador autofágico p62/SQSTM1 sí se comporta como cabría esperar cuando se induce la autofagia, ya que su expresión muestra una tendencia hacia una menor expresión, aunque esta no llega a ser estadísticamente significativa, por lo que serían necesarios más experimentos en presencia de inhibidores lisosomales para clarificar este punto. En todo caso, los resultados sugieren que el flujo autofágico en el caso de los cultivos de células gliales *in vitro* es eficiente, ya que existe una inducción de los primeros pasos de la autofagia a través de la sobreexpresión de las proteínas ATG, y también de los últimos pasos de la misma, como muestra la degradación de p62/SQSTM1. Otros datos que confirman esta idea son las imágenes tomadas por microscopía electrónica, que muestran un aumento significativo del número de vacuolas autofágicas en cultivos de astrocitos WT (Fig. 31). Por lo tanto, nuestros resultados indican que el tratamiento agudo con etanol induce la autofagia en cultivos WT de astrocitos y microglía, datos que concuerdan con diversos estudios no sólo *in vitro* (Ni *et al.*, 2013; Thomes *et al.*, 2013), sino también *in vivo* en hígado (Ding *et al.*, 2010), corazón (Ge and Ren, 2012; Guo *et al.*, 2012;

Kandadi *et al.*, 2013) e incluso cerebro (Chen *et al.*, 2012b) sobre los efectos agudos del etanol sobre la autofagia.

Nuestros resultados indican que la inducción de la autofagia se correlaciona con un incremento en los niveles de la enzima lisosomal catepsina B (Fig. 33). Los lisosomas, compartimentos esféricos ácidos rodeados de membrana simple, son orgánulos clave en el proceso autofágico, ya que defectos en su funcionalidad podrían bloquear los últimos pasos de la autofagia e impedir un flujo autofágico eficiente. Además, son esenciales en la respuesta celular ante compuestos tóxicos como las proteínas aberrantes que se forman en muchas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha demostrado que los lisosomas son capaces de degradar α -sinucleína (Lee *et al.*, 2008; Mak *et al.*, 2010), tau (Wang *et al.*, 2009b) y huntingtina (Kim *et al.*, 2006), implicados en la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington, respectivamente. Nuestros resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de la masa lisosomal en cultivos de astrocitos WT tras tres horas de exposición al etanol, aumento que se ve ligeramente reducido a las 24 h, lo que parece indicar que los niveles lisosomales estarían volviendo a la normalidad (Fig. 32). Además, también se producen alteraciones del pH lisosomal tanto a 3 h como a 24 h tras la adición de etanol al medio (Fig. 34). De hecho, observamos un ligero incremento del pH estadísticamente significativo a ambos tiempos. Estos resultados pueden parecer contradictorios, ya que se ha demostrado que un incremento en el pH lisosomal reduce la capacidad degradativa y bloquea la maduración de los autofagosomas (Ramachandran *et al.*, 2009). Una posible explicación sería que al engullir parte del material citoplasmático (de pH neutro), se

produjera un aumento del pH lisosomal, como señalan otros estudios donde se observa un incremento del pH en condiciones de mayor proteólisis (Vidal-Donet *et al.*, 2013). Por otro lado, también se podría sugerir en base a estos resultados que el aumento del pH fuera indicativo del daño lisosomal producido por el etanol, y la mayor formación de lisosomas y vacuolas autofágicas fuera un mecanismo compensatorio para mantener la capacidad de degradación. Además, el bloqueo de la maduración de los autofagosomas explicaría la acumulación vacuolar observada tras el consumo crónico de etanol.

Cabe destacar que las alteraciones detectadas en ratones TLR4-KO, tanto en la expresión de las proteínas ATG, p62 y mTOR, como en la masa y pH lisosomales, son mucho menores, y ninguna llega a ser estadísticamente significativa. Por lo tanto, estos datos nos indican la participación de TLR4, directa o indirectamente, en los mecanismos patológicos inducidos por la intoxicación aguda con etanol en células gliales. Del mismo modo, los cambios en ratones TLR4-KO tras un consumo crónico de alcohol son irrelevantes si se comparan con los que se observan en animales WT, que en este caso se corresponden con una inhibición del proceso autofágico. En este sentido, llama la atención la dualidad de los efectos del etanol en las alteraciones de la vía de la autofagia, según se produzca un consumo agudo o crónico. Sin embargo, algunos estudios ya apuntaban a esta dirección hace un par de años, y señalaban que mientras que el consumo agudo de etanol aumenta el flujo autofágico positivo que protegería frente a la toxicidad generada, su abuso crónico podría comprometer la habilidad celular para producir una respuesta autofágica correcta debido a cambios patológicos en diferentes estructuras celulares (Ding *et al.*, 2011a).

Nuestra hipótesis es que la inflamación causada por una activación en la respuesta y señalización de TLR4 está relacionada con las alteraciones en la degradación de proteínas que induce el consumo de alcohol. Así, los ratones TLR4-KO, al no generar una respuesta inflamatoria continuada y excesiva ante el consumo crónico de alcohol, estarían en cierto modo protegidos contra sus efectos tóxicos. Ante un estímulo agudo de etanol, las células gliales generarían una respuesta inmune efectiva para reducir los efectos adversos de las especies tóxicas generadas, como las especies reactivas del oxígeno (ROS). Precisamente las ROS son las que inducirían una activación de la maquinaria autofágica mediante la inhibición de mTOR observada en nuestros datos experimentales, así como en otros estudios (Ding *et al.*, 2011a), lo que favorecería la neuroprotección. Por el contrario, la exposición crónica al etanol generaría un ambiente oxidativo (Montoliu *et al.*, 1994) e inflamatorio continuado que resultaría perjudicial para la viabilidad neural. La activación de la cascada de señalización de TLR4, además de comprometer diferentes estructuras celulares, generaría una activación de diferentes vías metabólicas proinflamatorias como PI3K/Akt o MAPK/Erk1-2, que interferirían en la señalización de mTOR, provocando un aumento de su actividad y una disminución autofágica. Todo ello promovería la acumulación progresiva de compuestos tóxicos, produciéndose una retroalimentación positiva que potenciaría la respuesta inflamatoria de los TLRs, causando daño neural y finalmente neurodegeneración.

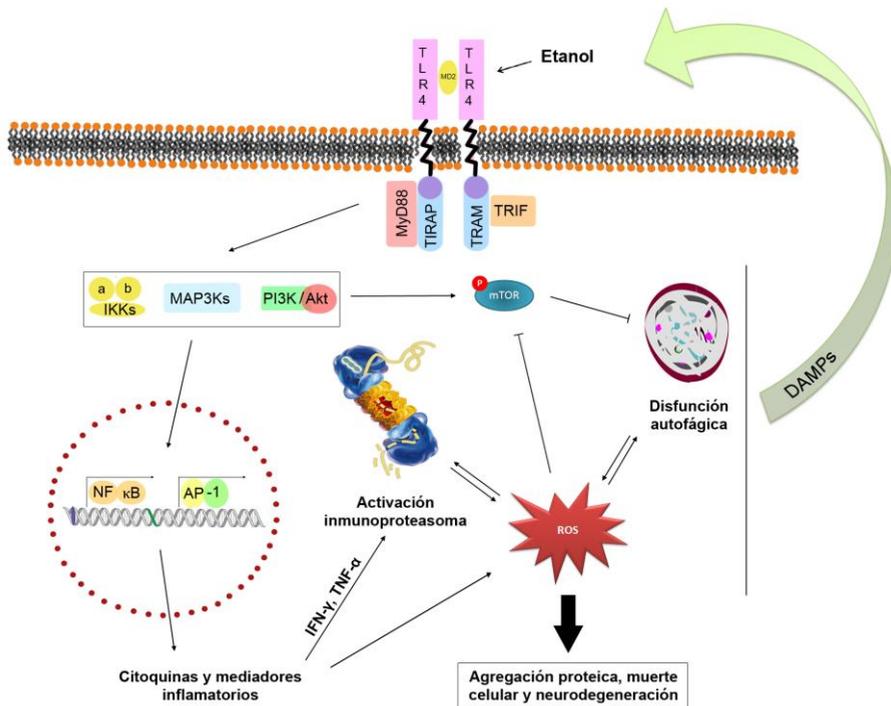


Figura 36. Representación esquemática de los efectos del etanol sobre las vías de degradación de proteínas a través de TLR4. El etanol produce un aumento de la señalización por TLR4, que se traduce en la expresión de citoquinas y otros mediadores inflamatorios. En concreto, la liberación de IFN- γ y TNF- α favorece la formación del inmunoproteasoma. Además, TLR4 activa la señalización de las vías Pi3k/Akt y MAPKs, que a su vez inducen la fosforilación de mTOR y por consiguiente la inhibición de la autofagia. Por otra parte, la producción de ROS genera un ambiente oxidativo que puede interferir en la proteólisis, por ejemplo a través de la inhibición de mTOR. Finalmente, la liberación de DAMPs (citoquinas, radicales libres, proteínas dañadas) provoca una retroalimentación positiva que amplifica la respuesta de TLR4. DAMPs, patrón molecular asociado a daño; ROS, especies reactivas del oxígeno.

En resumen, los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez el papel de TLR4 en las alteraciones producidas por el etanol en las vías del proteasoma y de la autofagia en corteza cerebral (Fig. 36), lo que lleva a una acumulación y agregación de proteínas, y la aparición de daño neural y neurodegeneración. Además, al bloquear este receptor se

reduce la neuroinflamación, y posiblemente la neurodegeneración, inducida por el etanol a través de la modulación del sistema ubiquitina-proteasoma y de la vía autofágica. Finalmente, estos resultados proponen nuevos mecanismos que podrían ayudar a entender mejor el daño cerebral causado por el abuso de etanol.

6 Conclusiones

- 1. Los resultados obtenidos en corteza cerebral de ratones demuestran que el consumo crónico de etanol altera el proteasoma y el inmunoproteasoma:**
 - a. Induciendo una acumulación de proteínas ubiquitinadas.
 - b. Incrementando los niveles de las subunidades del inmunoproteasoma $\beta 2i$, $\beta 5i$ y $PA28\alpha$, posiblemente a través de la sobreexpresión de IFN- γ .
 - c. Reduciendo las subunidades del proteasoma constitutivo 20S $\beta 5$ y $\alpha 2$.

- 2. La inhibición de la subunidad $\beta 5i$ con la administración de bortezomib previene la producción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios inducidos por el consumo crónico de alcohol en corteza cerebral de ratones WT, lo que corrobora el papel del etanol en la disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma.**

- 3. La incubación de células gliales en cultivo primario con una dosis de etanol corrobora gran parte de los resultados obtenidos *in vivo*. Específicamente, se produce un incremento en la expresión de $\beta 1i$, $\beta 5i$ y $PA28\alpha$ en astrocitos, y de $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ y $PA28\alpha$ en microglía.**

- 4. El consumo crónico de etanol también afecta a la vía de la autofagia en corteza cerebral:**
 - a. Incrementando el volumen de las vacuolas autofágicas.

- b. Reduciendo la expresión de las proteínas ATG5, ATG12 y LC3-II, implicadas en la formación de los autofagosomas, y de la hidrolasa lisosomal catepsina B.
- c. Disminuyendo la expresión de la proteína p62, proteína clave que dirige los agregados ubiquitinados hacia la maquinaria autofágica, así como de su colocalización con LC3.

5. La exposición *in vitro* de células gliales a una única dosis de etanol (50 mM) produce un aumento de los niveles de autofagia:

- a. Induciendo la sobreexpresión de ATG12, LC3-II y catepsina B en células gliales en cultivo.
- b. Causando un aumento en el número de vacuolas autofágicas en astrocitos.
- c. Promoviendo un incremento de la masa y el pH de los lisosomas en astrocitos en cultivo.

6. Las alteraciones observadas tanto *in vitro* en células gliales como *in vivo* tras el consumo crónico en corteza cerebral podrían estar reguladas por la actividad de mTOR. Tras una dosis aguda, la disminución de sus niveles de fosforilación produce un aumento de la autofagia. Por el contrario, el consumo prolongado o crónico induce la fosforilación de mTOR y causa una disminución de la autofagia.

- a. La administración del inhibidor de mTOR, rapamicina, previene la inducción de IL-1 β e iNOS causada por el consumo de etanol en corteza cerebral.

- 7. Las alteraciones inducidas por el etanol en ambas vías proteolíticas se asocian con la función y señalización mediada por TLR4, ya que los efectos del etanol sobre dichas vías prácticamente desaparecen tanto en corteza cerebral como en células gliales procedentes de animales TLR4-KO.**

Finalmente, nuestros resultados demuestran por primera vez que el etanol altera el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de la autofagia en cerebro, y apoyan el papel de los receptores TLR4 en dichos procesos. Estos resultados proponen nuevos mecanismos que podrían ayudar a entender mejor el daño cerebral causado por el abuso de alcohol.

7 Bibliografía

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. *9*, 143-150.

Akira, S. and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499-511.

Alers, S., Loffler, A.S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell Biol.* *32*, 2-11.

Alexander-Kaufman, K., James, G., Sheedy, D., Harper, C., and Matsumoto, I. (2006). Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. *Mol. Psychiatry* *11*, 56-65.

Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A.M., Sanchez-Vera, I., and Guerri, C. (2010). Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci.* *30*, 8285-8295.

Alirezaei, M., Kiosses, W.B., Flynn, C.T., Brady, N.R., and Fox, H.S. (2008). Disruption of neuronal autophagy by infected microglia results in neurodegeneration. *PLoS. One.* *3*, e2906.

Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* *36*, 165-179.

Alves-Rodrigues, A., Gregori, L., and Figueiredo-Pereira, M.E. (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* *21*, 516-520.

Amano, A., Nakagawa, I., and Yoshimori, T. (2006). Autophagy in innate immunity against intracellular bacteria. *J. Biochem.* *140*, 161-166.

Angeles, A., Fung, G., and Luo, H. (2012). Immune and non-immune functions of the immunoproteasome. *Front Biosci.* *17*, 1904-1916.

Araque, A. and Perea, G. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia* *47*, 241-248.

Arimoto, T. and Bing, G. (2003). Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* *12*, 35-45.

Aschner, M. (1998). Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* *19*, 269-281.

Aschner, M., Sonnewald, U., and Tan, K.H. (2002). Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol.* *12*, 475-481.

Bal-Price, A. and Brown, G.C. (2001). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J. Neurosci.* *21*, 6480-6491.

Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* *319*, 916-919.

Bar-Shavit, Z. (2008). Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity* *41*, 195-203.

Bardag-Gorce, F., Oliva, J., Lin, A., Li, J., French, B.A., and French, S.W. (2011). Proteasome inhibitor up regulates liver antioxidative enzymes in rat model of alcoholic liver disease. *Exp. Mol. Pathol.* *90*, 123-130.

Basler, M., Dajee, M., Moll, C., Groettrup, M., and Kirk, C.J. (2010). Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. *J. Immunol.* *185*, 634-641.

Basler, M., Kirk, C.J., and Groettrup, M. (2012). The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.*

Bauer, P.O. and Nukina, N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J. Neurochem.* *110*, 1737-1765.

Ben-Neriah, Y. (2002). Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* *3*, 20-26.

Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552-1555.

Bendotti, C., Marino, M., Cheroni, C., Fontana, E., Crippa, V., Poletti, A., and De, B.S. (2012). Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* 97, 101-126.

Benveniste, E.N. (1998). Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 259-275.

Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603-614.

Blanco, A.M. and Guerri, C. (2007). Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. *Front Biosci.* 12, 2616-2630.

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., Perez-Arago, A., Fernandez-Lizarbe, S., and Guerri, C. (2008). Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J. Neurochem.* 106, 625-639.

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.

Boland, B., Kumar, A., Lee, S., Platt, F.M., Wegiel, J., Yu, W.H., and Nixon, R.A. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 28, 6926-6937.

Bolanos-Meade, J., Zhou, L., Hoke, A., Corse, A., Vogelsang, G., and Wagner, K.R. (2005). Hydroxychloroquine causes severe vacuolar myopathy in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Am. J. Hematol.* *78*, 306-309.

Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* *1*, 221-226.

Canu, N., Barbato, C., Ciotti, M.T., Serafino, A., Dus, L., and Calissano, P. (2000). Proteasome involvement and accumulation of ubiquitinated proteins in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J. Neurosci.* *20*, 589-599.

Canu, N., Tufi, R., Serafino, A.L., Amadoro, G., Ciotti, M.T., and Calissano, P. (2005). Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* *92*, 1228-1242.

Carpentier, P.A., Duncan, D.S., and Miller, S.D. (2008). Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav. Immun.* *22*, 140-147.

Caso, J.R., Pradillo, J.M., Hurtado, O., Lorenzo, P., Moro, M.A., and Lizasoain, I. (2007). Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* *115*, 1599-1608.

Cecarini, V., Bonfili, L., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Rossi, G., Buizza, L., Uberti, D., Angeletti, M., and Eleuteri, A.M. (2012). Crosstalk between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in a human cellular model of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1822*, 1741-1751.

Cecarini, V., Ding, Q., and Keller, J.N. (2007). Oxidative inactivation of the proteasome in Alzheimer's disease. *Free Radic. Res.* *41*, 673-680.

Chandler, L.J., Sutton, G., Norwood, D., Sumners, C., and Crews, F.T. (1997). Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Mol. Pharmacol.* *51*, 733-740.

Chavarria, A. and Alcocer-Varela, J. (2004). Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun. Rev.* *3*, 251-260.

Chen, F.T., Liu, Y.C., Yang, C.M., and Yang, C.H. (2012a). Anti-inflammatory effect of the proteasome inhibitor bortezomib on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *53*, 3682-3694.

Chen, G. *et al.* (2012b). Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity. *Autophagy.* *8*, 1577-1589.

Cheung, Z.H. and Ip, N.Y. (2011). Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. *J. Neurochem.* *118*, 317-325.

Ciechanover, A. (2003). *Current Seminars in Cancer Biology.* *13*, pp1-89. Academic Press and Elsevier Science, Ltd., The Netherlands.

Ciechanover, A. and Brundin, P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* *40*, 427-446.

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.

Crews, F.T. *et al.* (2005). Alcoholic neurobiology: changes in dependence and recovery. *Alcohol Clin. Exp. Res.* *29*, 1504-1513.

Crews, F. T. and Chandler, L. J. (1993). Excitotoxicity and the neuropathology of ethanol. In W. A. Hunt, & S. J. Nixon (Eds.). *Alcohol-Induced Brain Damage* (Vol. 22, pp. 355-371). Rockville, MD: NIH Publications.

Crews, F.T. *et al.* (2004). Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin. Exp. Res.* *28*, 350-364.

Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* *14*, 70-77.

Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* *305*, 1292-1295.

Cui, J., Gong, Z., and Shen, H.M. (2013). The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 15-26.

Dasuri, K., Ebenezer, P., Zhang, L., Fernandez-Kim, S.O., Bruce-Keller, A.J., Markesbery, W.R., and Keller, J.N. (2010). Increased protein hydrophobicity in response to aging and Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 1330-1337.

Dasuri, K., Zhang, L., and Keller, J.N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 170-185.

de la Monte, S.M. (1988). Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch. Neurol.* 45, 990-992.

De Vrij, F.M., Sluijs, J.A., Gregori, L., Fischer, D.F., Hermens, W.T., Goldgaber, D., Verhaagen, J., van Leeuwen, F.W., and Hol, E.M. (2001). Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J.* 15, 2680-2688.

de, S.R. *et al.* (2003). Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29, 288-302.

Deretic, V. and Klionsky, D.J. (2008). How cells clean house. *Sci. Am.* 298, 74-81.

Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F., Martin-Aparicio, E., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Castano, J.G., Ferrer, I., Avila, J., and Lucas, J.J. (2003). Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23, 11653-11661.

Diaz-Hernandez, M., Valera, A.G., Moran, M.A., Gomez-Ramos, P., Alvarez-Castelao, B., Castano, J.G., Hernandez, F., and Lucas, J.J. (2006). Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. *J. Neurochem.* 98, 1585-1596.

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.

Ding, W.X., Li, M., Chen, X., Ni, H.M., Lin, C.W., Gao, W., Lu, B., Stolz, D.B., Clemens, D.L., and Yin, X.M. (2010). Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology* 139, 1740-1752.

Ding, W.X., Li, M., and Yin, X.M. (2011a). Selective taste of ethanol-induced autophagy for mitochondria and lipid droplets. *Autophagy*. 7, 248-249.

Ding, W.X., Manley, S., and Ni, H.M. (2011b). The emerging role of autophagy in alcoholic liver disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 236, 546-556.

Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.* 171, 513-524.

Dong, Y. and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* 36, 180-190.

Du, Y., Wooten, M.C., and Wooten, M.W. (2009). Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* 35, 302-310.

Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., Gascon, M.S., Blanco, A., and Guerri, C. (2008). Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol. Immunol.* 45, 2007-2016.

Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., and Guerri, C. (2009). Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J. Immunol.* 183, 4733-4744.

Forloni, G. *et al.* (2002). Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol. Aging* 23, 957-976.

Franco, R., Pacheco, R., Lluís, C., Ahern, G.P., and O'Connell, P.J. (2007). The emergence of neurotransmitters as immune modulators. *Trends Immunol.* *28*, 400-407.

Funk, K.E., Mrak, R.E., and Kuret, J. (2011). Granulovacuolar degeneration (GVD) bodies of Alzheimer's disease (AD) resemble late-stage autophagic organelles. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *37*, 295-306.

Gaczynska, M., Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* *365*, 264-267.

Gaczynska, M., Rock, K.L., Spies, T., and Goldberg, A.L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 9213-9217.

Gavilan, M.P., Castano, A., Torres, M., Portavella, M., Caballero, C., Jimenez, S., Garcia-Martinez, A., Parrado, J., Vitorica, J., and Ruano, D. (2009). Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *J. Neurochem.* *108*, 260-272.

Ge, W., Guo, R., and Ren, J. (2011). AMP-dependent kinase and autophagic flux are involved in aldehyde dehydrogenase-2-induced protection against cardiac toxicity of ethanol. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 1736-1748.

Ge, W. and Ren, J. (2012). mTOR-STAT3-notch signalling contributes to ALDH2-induced protection against cardiac contractile dysfunction and autophagy under alcoholism. *J. Cell Mol. Med.* *16*, 616-626.

Giasson, B.I. and Lee, V.M. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* *114*, 1-8.

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.

Giulian, D. and Baker, T.J. (1986). Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* *6*, 2163-2178.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* **140**, 918-934.

Glezer, I., Lapointe, A., and Rivest, S. (2006). Innate immunity triggers oligodendrocyte progenitor reactivity and confines damages to brain injuries. *FASEB J.* **20**, 750-752.

Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* **82**, 373-428.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623.

Goldberg, A.L. (2007). Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 12-17.

Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T., and Rock, K.L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol. Immunol.* **39**, 147-164.

Gondi, C.S. and Rao, J.S. (2013). Cathepsin B as a cancer target. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **17**, 281-291.

Graziotto, J.J., Cao, K., Collins, F.S., and Krainc, D. (2012). Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders. *Autophagy.* **8**, 147-151.

Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M.E., Van Nostrand, W.E., and Goldgaber, D. (1995). Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J. Biol. Chem.* **270**, 19702-19708.

Griffiths, M., Neal, J.W., and Gasque, P. (2007). Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int. Rev. Neurobiol.* **82**, 29-55.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* *386*, 463-471.

Groll, M., Huber, R., and Moroder, L. (2009). The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J. Pept. Sci.* *15*, 58-66.

Guo, R., Hu, N., Kandadi, M.R., and Ren, J. (2012). Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts. *Autophagy*. *8*, 593-608.

Gusella, J.F. and MacDonald, M.E. (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 109-115.

Haberg, A., Qu, H., Saether, O., Unsgard, G., Haraldseth, O., and Sonnewald, U. (2001). Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival. *J. Cereb. Blood Flow Metab* *21*, 1451-1463.

Hanisch, U.K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* *40*, 140-155.

Hara, T. *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* *441*, 885-889.

Hardy, J. and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353-356.

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.

Harper, C. and Matsumoto, I. (2005). Ethanol and brain damage. *Curr. Opin. Pharmacol.* *5*, 73-78.

Harper, C. G. and Kril, J. J. (1993). Neuropathological changes in alcoholics. In W. A. Hunt, & S. J. Nixon (Eds.). *Alcohol-Induced Brain Damage* (Vol. 22, pp. 39-69). Rockville, MD: NIH Publications.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Hoebe, K. *et al.* (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-748.

Hornig, T., Barton, G.M., Flavell, R.A., and Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329-333.

Huang, Q. and Figueiredo-Pereira, M.E. (2010). Ubiquitin/proteasome pathway impairment in neurodegeneration: therapeutic implications. *Apoptosis*. 15, 1292-1311.

Hunot, S. and Hirsch, E.C. (2003). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 *Suppl* 3, S49-S58.

Ikegami, Y., Goodenough, S., Inoue, Y., Dodd, P.R., Wilce, P.A., and Matsumoto, I. (2003). Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neurosci. Lett.* 349, 201-205.

Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, E. (2006). Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J. Biol. Chem.* 281, 4035-4041.

Janen, S.B., Chaachouay, H., and Richter-Landsberg, C. (2010). Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia* 58, 1766-1774.

Jernigan, T.L., Butters, N., DiTraglia, G., Schafer, K., Smith, T., Irwin, M., Grant, I., Schuckit, M., and Cermak, L.S. (1991). Reduced cerebral grey matter observed in alcoholics using magnetic resonance imaging. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 15, 418-427.

Jin, M.S. and Lee, J.O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 29, 182-191.

John, G.R., Lee, S.C., and Brosnan, C.F. (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*. *9*, 10-22.

Jones, M.D. *et al.* (2010). A proteasome inhibitor, bortezomib, inhibits breast cancer growth and reduces osteolysis by downregulating metastatic genes. *Clin. Cancer Res*. *16*, 4978-4989.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A.M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol*. *3*, 499.

Kaisho, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Hoshino, K., and Akira, S. (2001). Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J. Immunol*. *166*, 5688-5694.

Kandadi, M.R., Hu, N., and Ren, J. (2013). ULK1 plays a critical role in AMPK-mediated myocardial autophagy and contractile dysfunction following acute alcohol challenge. *Curr. Pharm. Des* *19*, 4874-4887.

Kapoor, P., Ramakrishnan, V., and Rajkumar, S.V. (2012). Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin. Hematol*. *49*, 228-242.

Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., and Ullrich, O. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. *85*, 115-122.

Keller, J.N., Gee, J., and Ding, Q. (2002). The proteasome in brain aging. *Ageing Res. Rev*. *1*, 279-293.

Keller, J.N., Hanni, K.B., and Markesbery, W.R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J. Neurochem*. *75*, 436-439.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys*. *462*, 245-253.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol*. *13*, 132-141.

Kim, Y.J., Sapp, E., Cuiffo, B.G., Sobin, L., Yoder, J., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Detloff, P., Aronin, N., and Difiglia, M. (2006). Lysosomal proteases are involved in generation of N-terminal huntingtin fragments. *Neurobiol. Dis.* 22, 346-356.

Kisselev, A.F., Callard, A., and Goldberg, A.L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* 281, 8582-8590.

Klionsky, D.J. *et al.* (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 8, 455-544.

Kloetzel, P.M., Soza, A., and Stohwasser, R. (1999). The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol. Chem.* 380, 293-297.

Knecht, E. *et al.* (2012). Malin knockout mice support a primary role of autophagy in the pathogenesis of Lafora disease. *Autophagy.* 8, 701-703.

Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res. Rev.* 10, 205-215.

Komatsu, M. *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.

Korbo, L. (1999). Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23, 164-168.

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.

Kwak, J., Workman, J.L., and Lee, D. (2011). The proteasome and its regulatory roles in gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1809, 88-96.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., and Pickart, C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* *416*, 763-767.

Lam, Y.A., Pickart, C.M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., Mayer, R.J., and Layfield, R. (2000). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 9902-9906.

Lancaster, F.E. (1992). Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?--a review. *Alcohol Clin. Exp. Res.* *16*, 539-541.

Laplane, M. and Sabatini, D.M. (2012a). mTOR Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Laplane, M. and Sabatini, D.M. (2012b). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* *149*, 274-293.

Laurin, N., Brown, J.P., Morissette, J., and Raymond, V. (2002). Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 1582-1588.

Lauw, F.N., Caffrey, D.R., and Golenbock, D.T. (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol.* *26*, 509-511.

Le, W. (2014). Role of iron in UPS impairment model of Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* *20 Suppl 1*, S158-S161.

Ledesma, J.C., Balino, P., and Aragon, C.M. (2013). Reduction in Central H O Levels Prevents Voluntary Ethanol Intake in Mice: A Role for the Brain Catalase-H O System in Alcohol Binge Drinking. *Alcohol Clin. Exp. Res.*

Lee, H.J., Suk, J.E., Bae, E.J., Lee, J.H., Paik, S.R., and Lee, S.J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 1835-1849.

Lee, J.H. *et al.* (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* *141*, 1146-1158.

Lehnardt, S., Henneke, P., Lien, E., Kasper, D.L., Volpe, J.J., Bechmann, I., Nitsch, R., Weber, J.R., Golenbock, D.T., and Vartanian, T. (2006). A

mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia. *J. Immunol.* *177*, 583-592.

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.

Leroy, E. *et al.* (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* *395*, 451-452.

Letiembre, M., Hao, W., Liu, Y., Walter, S., Mihaljevic, I., Rivest, S., Hartmann, T., and Fassbender, K. (2007). Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience* *146*, 248-254.

Letiembre, M., Liu, Y., Walter, S., Hao, W., Pfander, T., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., and Fassbender, K. (2009). Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol. Aging* *30*, 759-768.

Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature* *446*, 745-747.

Levine, B. and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* *132*, 27-42.

Levite, M. (2008). Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* *8*, 460-471.

Lewohl, J.M., Wixey, J., Harper, C.G., and Dodd, P.R. (2005). Expression of MBP, PLP, MAG, CNP, and GFAP in the Human Alcoholic Brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* *29*, 1698-1705.

Li, J. and Rechsteiner, M. (2001). Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. *Biochimie* *83*, 373-383.

Li, X.J., Li, H., and Li, S. (2010). Clearance of mutant huntingtin. *Autophagy*. *6*.

Lilienbaum, A. (2013). Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* *4*, 1-26.

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.

Liu, C.W., Millen, L., Roman, T.B., Xiong, H., Gilbert, H.F., Noiva, R., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (2002). Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* *277*, 26815-26820.

Liu, J., Lewohl, J.M., Harris, R.A., Iyer, V.R., Dodd, P.R., Randall, P.K., and Mayfield, R.D. (2006). Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology* *31*, 1574-1582.

Lopez, S.M., Morelli, L., Castano, E.M., Soto, E.F., and Pasquini, J.M. (2000). Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* *62*, 302-310.

Lopez, S.M., Pasquini, L., Besio, M.M., Pasquini, J.M., and Soto, E. (2003). Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Exp. Neurol.* *180*, 131-143.

Lotharius, J. and Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 932-942.

Lovinger, D.M. (1993). Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin. Exp. Res.* *17*, 19-27.

Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* *120*, 237-248.

Lunemann, J.D., Schmidt, J., Schmid, D., Barthel, K., Wrede, A., Dalakas, M.C., and Munz, C. (2007). Beta-amyloid is a substrate of autophagy in sporadic inclusion body myositis. *Ann. Neurol.* *61*, 476-483.

Ma, Y., Haynes, R.L., Sidman, R.L., and Vartanian, T. (2007). TLR8: an innate immune receptor in brain, neurons and axons. *Cell Cycle* *6*, 2859-2868.

Ma, Y., Li, J., Chiu, I., Wang, Y., Sloane, J.A., Lu, J., Kosaras, B., Sidman, R.L., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2006). Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* 175, 209-215.

Madeo, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2010). Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* 12, 842-846.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741-752.

Mak, S.K., McCormack, A.L., Manning-Bog, A.B., Cuervo, A.M., and Di Monte, D.A. (2010). Lysosomal degradation of alpha-synuclein in vivo. *J. Biol. Chem.* 285, 13621-13629.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 961-967.

McNaught, K.S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C.W. (2003). Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 179, 38-46.

McNaught, K.S., Belizaire, R., Jenner, P., Olanow, C.W., and Isacson, O. (2002). Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 326, 155-158.

McNaught, K.S. and Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 297, 191-194.

McNaught, K.S. and Olanow, C.W. (2003). Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 *Suppl 3*, S73-S84.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Meijer, A.J. and Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol. Aspects Med.* 27, 411-425.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat. Immunol.* 5, 503-507.

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.

Mishra, B.B., Gundra, U.M., and Teale, J.M. (2008). Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J. Neuroinflammation.* 5, 53.

Mishto, M. *et al.* (2010). Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop multiple sclerosis in Italian female population. *PLoS. One.* 5, e9287.

Mishto, M., Ligorio, C., Bellavista, E., Martucci, M., Santoro, A., Giulioni, M., Marucci, G., and Franceschi, C. (2011). Immunoproteasome expression is induced in mesial temporal lobe epilepsy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 65-70.

Mishto, M., Luciani, F., Holzhutter, H.G., Bellavista, E., Santoro, A., Textoris-Taube, K., Franceschi, C., Kloetzel, P.M., and Zaikin, A. (2008). Modeling the in vitro 20S proteasome activity: the effect of PA28-alpha-beta and of the sequence and length of polypeptides on the degradation kinetics. *J. Mol. Biol.* 377, 1607-1617.

Miyake, K. (2003). Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int. Immunopharmacol.* 3, 119-128.

Mizushima, N. and Klionsky, D.J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 19-40.

Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 3, 542-545.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107-132.

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.

Moore, D.J., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2003). Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular. Med.* 4, 95-108.

Morimoto, R.I. (2008). Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 22, 1427-1438.

Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., and Wooten, M.W. (2007). Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* 32, 95-100.

Muchamuel, T. *et al.* (2009). A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.* 15, 781-787.

Neumann, H. (2001). Control of glial immune function by neurons. *Glia* 36, 191-199.

Ni, H.M., Du, K., You, M., and Ding, W.X. (2013). Critical Role of FoxO3a in Alcohol-Induced Autophagy and Hepatotoxicity. *Am. J. Pathol.* 183, 1815-1825.

Niedzwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Dept, and Deptula, W. (2013). Autophagy in physiological and pathological processes--selected aspects. *Pol. J. Vet. Sci.* 16, 173-180.

Nijholt, D.A., de Graaf, T.R., van Haastert, E.S., Oliveira, A.O., Berkers, C.R., Zwart, R., Ovaa, H., Baas, F., Hoozemans, J.J., and Scheper, W. (2011a). Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome

in neuronal cells: implications for Alzheimer's disease. *Cell Death. Differ.* **18**, 1071-1081.

Nijholt, D.A., De, K.L., Elfrink, H.L., Hoozemans, J.J., and Scheper, W. (2011b). Removing protein aggregates: the role of proteolysis in neurodegeneration. *Curr. Med. Chem.* **18**, 2459-2476.

Nilsson, C., Kagedal, K., Johansson, U., and Ollinger, K. (2003). Analysis of cytosolic and lysosomal pH in apoptotic cells by flow cytometry. *Methods Cell Sci.* **25**, 185-194.

Nishikawa, K. *et al.* (2003). Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 176-183.

Nishiya, T. and DeFranco, A.L. (2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **279**, 19008-19017.

Nixon, R.A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J. Cell Sci.* **120**, 4081-4091.

Nixon, R.A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **19**, 983-997.

Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A.M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 113-122.

Okun, E., Griffioen, K.J., Lathia, J.D., Tang, S.C., Mattson, M.P., and Arumugam, T.V. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* **59**, 278-292.

Orre, M. *et al.* (2013). Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain* **136**, 1415-1431.

Osaka, H. *et al.* (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1945-1958.

Oscar-Berman, M. and Hutner, N. (1993). Frontal lobe changes after chronic alcohol ingestion. In W. A. Hunt, & S. J. Nixon (Eds.). *Alcohol-Induced Brain Damage* (Vol. 22, pp. 121-155). Rockville, MD: NIH Publications.

Osna, N.A. and Donohue, T.M., Jr. (2007). Implication of altered proteasome function in alcoholic liver injury. *World J. Gastroenterol.* *13*, 4931-4937.

Osna, N.A., Thomes, P.G., and Jr, T.M. (2011). Involvement of autophagy in alcoholic liver injury and hepatitis C pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* *17*, 2507-2514.

Owens, T. (2003). The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. *Curr. Opin. Neurol.* *16*, 259-265.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., and Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 13766-13771.

Pacheco, R., Prado, C.E., Barrientos, M.J., and Bernales, S. (2009). Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* *216*, 8-19.

Pandey, U.B. *et al.* (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* *447*, 859-863.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 24131-24145.

Parsons, O. A. (1993). Impaired neuropsychological cognitive functioning in sober alcoholics. In W. A. Hunt, & S. J. Nixon (Eds.). *Alcohol-Induced Brain Damage* (Vol. 22, pp. 173-194). Rockville, MD: NIH Publications.

Pastore, A. and Temussi, P. (2012). Protein aggregation and misfolding: good or evil? *J. Phys. Condens. Matter* *24*, 244101.

Paul, S. (2008). Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. *Bioessays* 30, 1172-1184.

Pickart, C.M. and Cohen, R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 177-187.

Pickford, F. *et al.* (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest* 118, 2190-2199.

Pintado, C., Gavilan, M.P., Gavilan, E., Garcia-Cuervo, L., Gutierrez, A., Vitorica, J., Castano, A., Rios, R.M., and Ruano, D. (2012). Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus. *J. Neuroinflammation.* 9, 87.

Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., and Antel, J.P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36, 145-155.

Pyo, J.O., Yoo, S.M., Ahn, H.H., Nah, J., Hong, S.H., Kam, T.I., Jung, S., and Jung, Y.K. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat. Commun.* 4, 2300.

Qin, L., He, J., Hanes, R.N., Pluzarev, O., Hong, J.S., and Crews, F.T. (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J. Neuroinflammation.* 5, 10.

Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S., Knapp, D.J., and Crews, F.T. (2007). Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55, 453-462.

Qureshi, N., Morrison, D.C., and Reis, J. (2012). Proteasome protease mediated regulation of cytokine induction and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 2087-2093.

Ramachandran, N. *et al.* (2009). VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* 137, 235-246.

Rami, A. (2009). Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *35*, 449-461.

Ravikumar, B. *et al.* (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* *90*, 1383-1435.

Ravikumar, B. *et al.* (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* *36*, 585-595.

Renau-Piqueras, J., Zaragoza, R., De, P.P., Bagueña-Cervellera, R., Megias, L., and Guerri, C. (1989). Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* *37*, 229-240.

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.

Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., and Schwartz, M. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1081-1088.

Romero, A.M., Esteban-Pretel, G., Marin, M.P., Ponsoda, X., Ballestin, R., Canales, J.J., and Renau-Piqueras, J. (2010). Chronic ethanol exposure alters the levels, assembly, and cellular organization of the actin cytoskeleton and microtubules in hippocampal neurons in primary culture. *Toxicol. Sci.* *118*, 602-612.

Rosenbloom, M., Sullivan, E.V., and Pfefferbaum, A. (2003). Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. *Alcohol Res. Health* *27*, 146-152.

Ross, C.A. and Tabrizi, S.J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol.* *10*, 83-98.

Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* *443*, 780-786.

Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., and Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 304-312.

Saeki, Y., Isono, E., Oguchi, T., Shimada, M., Sone, T., Kawahara, H., Yokosawa, H., and Toh-e A (2004). Intracellularly inducible, ubiquitin hydrolase-insensitive tandem ubiquitins inhibit the 26S proteasome activity and cell division. *Genes Genet. Syst.* 79, 77-86.

Sarkar, S. and Rubinsztein, D.C. (2008). Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Mol. Biosyst.* 4, 895-901.

Saura, J., Tusell, J.M., and Serratoso, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44, 183-189.

Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.

Schultzberg, M., Lindberg, C., Aronsson, A.F., Hjorth, E., Spulber, S.D., and Oprica, M. (2007). Inflammation in the nervous system--physiological and pathophysiological aspects. *Physiol Behav.* 92, 121-128.

Seifert, U. *et al.* (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142, 613-624.

Shah, I.M. and Di, N.M. (2007). The ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibitors in central nervous system diseases. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 7, 250-273.

Shang, F., Gong, X., Palmer, H.J., Nowell, T.R., Jr., and Taylor, A. (1997). Age-related decline in ubiquitin conjugation in response to oxidative stress in the lens. *Exp. Eye Res.* 64, 21-30.

Sieradzan, K.A., Mehan, A.O., Jones, L., Wanker, E.E., Nukina, N., and Mann, D.M. (1999). Huntington's disease intranuclear inclusions contain truncated, ubiquitinated huntingtin protein. *Exp. Neurol.* 156, 92-99.

Smith, D.M., Chang, S.C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y., and Goldberg, A.L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol. Cell* 27, 731-744.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638-647.

Sokolov, B.P., Jiang, L., Trivedi, N.S., and Aston, C. (2003). Transcription profiling reveals mitochondrial, ubiquitin and signaling systems abnormalities in postmortem brains from subjects with a history of alcohol abuse or dependence. *J. Neurosci. Res.* 72, 756-767.

Spencer, B., Potkar, R., Trejo, M., Rockenstein, E., Patrick, C., Gindi, R., Adame, A., Wyss-Coray, T., and Masliah, E. (2009). Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J. Neurosci.* 29, 13578-13588.

Streit, W.J., Mrak, R.E., and Griffin, W.S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J. Neuroinflammation.* 1, 14.

Sullivan, E.V. and Pfefferbaum, A. (2005). Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)* 180, 583-594.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von, F.K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-906.

Tang, S.C. *et al.* (2007). Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 13798-13803.

Terman, A. and Brunk, U.T. (2004a). Aging as a catabolic malfunction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2365-2375.

Terman, A. and Brunk, U.T. (2004b). Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1400-1404.

Terman, A. and Brunk, U.T. (2005). Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology. *Cardiovasc. Res.* 68, 355-365.

Thomes, P.G., Ehlers, R.A., Trambly, C.S., Clemens, D.L., Fox, H.S., Tuma, D.J., and Donohue, T.M. (2013). Multilevel regulation of autophagosome content by ethanol oxidation in HepG2 cells. *Autophagy*. *9*, 63-73.

Todde, V., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1792*, 3-13.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *76*, 4350-4354.

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.

van Leeuwen, F.W., Fischer, D.F., Kamel, D., Sluijs, J.A., Sonnemans, M.A., Benne, R., Swaab, D.F., Salehi, A., and Hol, E.M. (2000). Molecular misreading: a new type of transcript mutation expressed during aging. *Neurobiol. Aging* *21*, 879-891.

van Noort, J.M. (2007). Toll-like receptors as targets for inflammation, development and repair in the central nervous system. *Curr. Opin. Investig. Drugs* *8*, 60-65.

Vergara, U. (2011). Sistema nervioso central y regulación de la respuesta inmune. *Avances en Ciencias Veterinarias* *26*, No. 1-2.

Verhoef, L.G., Lindsten, K., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 2689-2700.

Vidal-Donet, J.M., Carcel-Trullols, J., Casanova, B., Aguado, C., and Knecht, E. (2013). Alterations in ROS activity and lysosomal pH account for distinct patterns of macroautophagy in LINCL and JNCL fibroblasts. *PLoS. One.* *8*, e55526.

Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 23542-23556.

von Haefen, C., Sifringer, M., Menk, M., and Spies, C.D. (2011). Ethanol enhances susceptibility to apoptotic cell death via down-regulation of autophagy-related proteins. *Alcohol Clin. Exp. Res.* *35*, 1381-1391.

Wang, J., Du, H., Jiang, L., Ma, X., de Graaf, R.A., Behar, K.L., and Mason, G.F. (2013). Oxidation of ethanol in the rat brain and effects associated with chronic ethanol exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *110*, 14444-14449.

Wang, T., Lao, U., and Edgar, B.A. (2009a). TOR-mediated autophagy regulates cell death in *Drosophila* neurodegenerative disease. *J. Cell Biol.* *186*, 703-711.

Wang, Y. and Mandelkow, E. (2012). Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 644-652.

Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Kruger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.M., Cuervo, A.M., and Mandelkow, E. (2009b). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4153-4170.

Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 25009-25013.

Weinstein, J.R., Swarts, S., Bishop, C., Hanisch, U.K., and Moller, T. (2008). Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia* *56*, 16-26.

Weiss, J.M. and Berman, J.W. (1998). Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J. Neuroimmunol.* *91*, 190-197.

WHO. (2011). World Health Organization. Global status report on alcohol and health.

Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J. Mol. Biol.* *301*, 1-9.

Wong, E. and Cuervo, A.M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* *13*, 805-811.

Wooten, M.W., Hu, X., Babu, J.R., Seibenhener, M.L., Geetha, T., Paine, M.G., and Wooten, M.C. (2006). Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J. Biomed. Biotechnol.* *2006*, 62079.

Wrona, D. (2006). Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J. Neuroimmunol.* *172*, 38-58.

Wu, D., Wang, X., Zhou, R., Yang, L., and Cederbaum, A.I. (2012). Alcohol steatosis and cytotoxicity: the role of cytochrome P4502E1 and autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 1346-1357.

Wurmser, A.E., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2004). Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* *304*, 1253-1255.

Yamamoto, A. and Simonsen, A. (2011). The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* *43*, 17-28.

Yamamoto, M. *et al.* (2003a). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* *301*, 640-643.

Yamamoto, M. *et al.* (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* *420*, 324-329.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2003b). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* *4*, 1144-1150.

Yao, X., Liu, J., and McCabe, J.T. (2008). Alterations of cerebral cortex and hippocampal proteasome subunit expression and function in a traumatic brain injury rat model. *J. Neurochem.* *104*, 353-363.

Ye, H. *et al.* (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* *418*, 443-447.

Ying, Z., Wang, H., and Wang, G. (2013). The ubiquitin proteasome system as a potential target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des* 19, 3305-3314.

Yu, W.H. *et al.* (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 171, 87-98.

Yue, Z., Horton, A., Bravin, M., DeJager, P.L., Selimi, F., and Heintz, N. (2002). A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron* 35, 921-933.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.

Zhang, J., Cao, R., Cai, T., Aschner, M., Zhao, F., Yao, T., Chen, Y., Cao, Z., Luo, W., and Chen, J. (2013). The Role of Autophagy Dysregulation in Manganese-Induced Dopaminergic Neurodegeneration. *Neurotox. Res.*

8 Anexos

FINANCIACIÓN

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Proyecto SAF2012-33747 del Ministerio de Economía y Competitividad. “Importancia de los mecanismos de degradación de proteínas en la neurodegeneración causada por el etanol: papel de los receptores TLR4”.
- Beca predoctoral VALi+d para investigadores en formación de la “Conselleria d’Educació, Cultura i Esport”. ACIF/2011/030.

PUBLICACIONES

Derivadas de este trabajo:

Pla A., Pascual M., Renau-Piqueras J., and Guerri C. (2014). TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain. *Cell Death Dis. In press.*

Pascual M., Pla A., and Guerri C. (2014). *In vivo* brain imaging study of ethanol-induced alterations of protein degradation pathways through TLR4. *Biol Proceed Online. Under review.*

Otras:

Pascual M., Pla A., Minarro J., and Guerri C. (2013). Neuroimmune Activation and Myelin Changes in Adolescent Rats Exposed to High-Dose Alcohol and Associated Cognitive Dysfunction: A Review with Reference to Human Adolescent Drinking. *Alcohol Alcohol. Nov 10 [Epub ahead of print].*

Ferragud J., Avivar-Valderas A., Pla A., De Las R.J., and de Mora J.F. (2011). Transcriptional repression of the tumor suppressor DRO1 by AIB1. *FEBS Lett. 585, 3041-3046.*