

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Caracterización del mecanismo molecular de activación de TLR4 por etanol: papel de la proteína HMGB1

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Luis Gómez Saiz

DIRIGIDO POR: Consuelo Guerri Sirera

TUTOR/A: José Salvador Vicente Antón

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, Julio de 2015





Datos personales

Nombre y apellidos: Luis Gómez Saiz

Datos del trabajo fin de grado

Título: Caracterización del mecanismo molecular de activación de TLR4 por etanol: papel de la proteína HMGB1.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a: José Salvador Vicente Antón

Cotutor/a: Consuelo Guerri Sirera

Fecha de lectura: Julio 2015

Resumen

Resultados recientes del laboratorio de Patología Celular del CIPF demuestran que el etanol, a concentraciones con relevancia fisiológica de etanol (10-50 mM), es capaz de activar la señalización y respuesta del receptor del sistema innato inmunitario, TLR4, en células gliales (microglia y astrogli) desencadenado una respuesta inflamatoria en cerebro que causa neuroinflamación y daño neural. De hecho, la eliminación genética de TLR4 protege contra el daño neuroinflamatorio causado por el etanol. Datos recientes postulan que la activación del TLR4 se produciría por la HMGB1 (high-mobility group box 1), proteína que se libera por las células neurales ante un insulto de daño tisular o inflamatorio. En base a estos últimos resultados, el objetivo de este trabajo es esclarecer el mecanismo molecular de la activación del TLR4 por parte del etanol y/o la proteína HMGB1 en la respuesta neuroinflamatoria causada por el etanol. Este objetivo se abordara en cultivos primarios corticales de neuronas y astrocitos procedentes de animales silvestres y se evaluará el mecanismo de liberación de HMGB1 en los diferentes tipos células neurales en presencia y ausencia de varias concentraciones de etanol (10, 25 y 50 mM).

Palabras clave

etanol, neuroinflamación, astrocitos, neuronas, inmunidad



Abstract

Recent results from the CIPF Cellular Pathology Laboratory demonstrate that ethanol, at physiologically relevant concentrations of ethanol (10-50 mM), is able to activate the response and signaling of the innate immune system toll-like 4 (TLR4) in glial cells (microglia and astroglial cells) triggering a neuroinflammatory response that leads to neural damage. Indeed, TLR4 genetic deletion protects against neuroinflammatory damage caused by ethanol. Recent data postulate that activation of TLR4 is produced by HMGB1 (high-mobility group box 1), a protein released by neural cells due to an insult or inflammatory damage. Following this line of thinking, the aim of this study is to elucidate the molecular mechanism of activation of TLR4 by ethanol and/or HMGB1 protein in neuroinflammatory response caused by ethanol. This objective is approached by using murine primary cultures of cortical neurons and astrocytes and HMGB1 release will be evaluated in both cell types after stimulation with various concentrations of ethanol (10, 25 and 50 mM).

Key words

Ethanol, neuroinflammation, astrocytes, neurons, immunity

AGRADECIMIENTOS

Pues parece que esto ha sido todo, hasta aquí han llegado los cuatro años de carrera, cuatro años que han dado para mucho... En este tiempo he notado como mi familia ha ido creciendo poco a poco hasta llegar a lo que es ahora. Esa familia que hace que eches la vista atrás y te salga una sonrisa en la cara de forma casi inconsciente.

Sinceramente, no me puedo imaginar cómo habría sido todo esto sin tener a toda esa gente al lado haciendo todo mucho más sencillo, llevadero y sobre todo más divertido. Madrugar cada mañana para ir a clase me habría resultado aún más difícil de no ser porque sabía que nada más llegar iba a haber alguien preparado para soltar la primera gracia de la mañana.

Si empiezo por el principio, me vienen a la mente esas tardes en las salas de estudio del Gali con Pablo y Miguel en las que se nos hacía de noche con todos esos problemas de física, química, estadística... Pero, aquí me falta alguien más imprescindible para los trabajos de grupos de cuatro, Manu. Y ahora sí, los Chachos al completo han sido un pilar básico de mi vida en estos años, esas comidas en el dominos hasta reventar, esos chinacos, y esa foto Chachos que no podía faltar en cada fiesta importante.

Y como no podía ser de otra forma, tengo que nombrar a Mendi y Prats, con los que he pasado los mejores momentos de las prácticas en toda la carrera. Creo que no se salva ninguna en la que no nos hayamos reído, y en la que no me lo haya pasado bien. Todo esto con la inestimable ayuda de Edgar, que siempre recordará el momento tapón, y Pablo, ese *socarrat* que me inició en el mundo del valenciano. Y hablando de valencianos, no puede faltar Joan, que me ha enseñado todo su vocabulario de puro tete valenciano y gracias al cual jugamos todos esos partidos de fútbol que nos han unido tanto a las dos clases.

Pero ya he nombrado muchos chicos, es el turno de las Chachis, ese grupillo de mujeres que nos hacía a los chicos ser los más envidiados de la discoteca, y que han sido las que han animado todo desde el principio hasta el final.

Me he dejado para el final a ese grupillo tan unido que conocí más tarde de lo que me hubiera gustado y que me acogió como uno más, la Xixofamily. Cada uno ha sido para mí un auténtico miembro más de mi familia, y sentirme parte ello me ha hecho muy feliz.

Y por supuesto, todos aquellos que han estado conmigo desde siempre, mis padres, mi hermana preferida, y toda mi familia que siempre me han dado lo mejor. Tampoco me olvido de mis amigos de Almansa, los de toda la vida, los de siempre y para siempre.

Y por último, quiero dar las gracias a Chelo, por aceptarme en su laboratorio y a toda la gente que ha estado conmigo en él, ayudándome y guiándome cuando me encontraba un poco perdido: Silvia, Toni, María, Majo y sobre todo Jorge, el que más me ha enseñado, mas paciencia ha tenido y sobre todo el que más me ha ayudado con este trabajo.

Gracias a todos por lo que habéis hecho y sido, la carrera ha terminado, pero todo lo demás continúa...

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El etanol y sus efectos	1
1.1.1 Efectos generales e incidencia del alcohol.....	1
1.1.2 Sistema neuroinmunitario y alcohol	2
1.2 Componentes celulares del sistema neuroinmunitario	3
1.2.1 Microglía.....	5
1.2.2 Astrocitos	5
1.2.3 Neuronas	6
1.3 TLR4, neuroinflamación y alcohol	7
1.3.1 Receptores tipo Toll.	7
1.3.2 TLR4 y su relación con el alcohol.....	9
1.4. HMGB1 y su función inflamatoria	10
2. Objetivos	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Animales de experimentación.....	14
3.2 Cultivo primario de astrocitos	14
3.3 Cultivo primario de neuronas.....	15
3.4 Estimulación con etanol de las células	15
3.5 Precipitación de la proteína a partir del medio de cultivo.....	15
3.5.1 Separación de fases.....	16
3.5.2 Precipitación.....	16
3.6 Extracción de proteína de las células	17
3.7 Electroforesis e inmunotransferencia	17
4. Resultados	20
4.1 Astrocitos y neuronas en cultivo primario responden frente a etanol liberando HMGB120	
4.2 El estimulación con etanol desencadena un proceso inflamatorio en las células mediado por TLR4	23
4.3 Análisis de la apoptosis inducida por el etanol en las células.....	26
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	30
5.1 Liberación de HMGB1 en cultivos de astrocitos y neuronas estimulados con etanol	30
5.2 Vía de liberación de HMGB1: activa o pasiva.....	31

5.3 El etanol induce un aumento de la muerte celular por apoptosis.....	32
5.4 Papel de TLR4 en la respuesta al alcohol	32
5.5 Perspectivas futuras	34
5.5 Conclusiones.....	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Relación de anticuerpos y diluciones utilizadas en la detección de proteínas mediante inmunotransferencia.....	19
Tabla II. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.....	19
Figura 1. Distribución global de todas las causas de muerte atribuibles al alcohol.....	1
Figura 2. Esquema general de la cascada de señalización intracelular de la estimulación de TLRs (dependiente de la proteína de diferenciación mieloide 88 - MyD88).....	8
Figura 3. Vías de liberación de HMGB1.....	11
Figura 4. Proceso seguido para la precipitación de la proteína extracelular a partir del medio de cultivo.....	16
Figura 5. La enzima fosfatasa alcalina cataliza la reacción de eliminación del grupo fosfato de BCIP, cuyo producto reacciona con NBT formando un precipitado con coloración.....	18
Figura 6. La estimulación de astrocitos con etanol induce la liberación de HMGB1 al medio extracelular.....	21
Figura 7. La estimulación con etanol induce la liberación de HMGB1 al medio extracelular en neuronas.....	22
Figura 8. El etanol aumenta los niveles de expresión de la subunidad p65 fosforilada de NFκB en astrocitos.....	24
Figura 9. El etanol aumenta los niveles de expresión de la subunidad p65 fosforilada de NFκB en neuronas.....	25
Figura 10. El tratamiento con etanol aumenta la expresión de Caspasa3 activa en astrocitos..	27
Figura 11. Expresión de la enzima Caspasa3 activa en neuronas tratadas con etanol.....	28

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AP-1: proteína activadora tipo 1

ARN: ácido ribonucleico

BCA: ácido bicinconínico

BCIP: Sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolisfosfato

BSA: albúmina sérica bovina

C3: caspasa3

COX2: ciclooxigenasa 2

DAMP: patrones moleculares asociados al daño

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco

ECL: ElectroChemiLuminescence

ET: etanol

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HMGB1: high mobility group box-1

IFN: interferón- β

IKK: quinasa de I κ B

IL: interleucina

IL-1R: receptor de la IL-1

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IRAK: quinasa asociada a IL-1R

iRNA: RNA interferente

I κ B: inhibidor del factor κ B

LPC: lisofosfatidilcolina

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MHC: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88

NFκB: factor nuclear kappa B

NMDA: N-metil D-aspartato

NO: óxido nítrico

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: tampón fosfato salino

PM: peso molecular

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RAGE: receptor para productos de glicosilación avanzada

SBF: suero bobino fetal

SDS: dodecilsulfato sódico

siRNA: RNA interferente pequeño

SNC: sistema nervioso central

SNC: sistema nervioso central

SPF: libre de patógenos

TBS: tampón Tris salino

TBS-T: tampón Tris salino con Tween 20

TIR: dominio Toll/IL-1R

TLR: receptores tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TRAF: factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

TRIF: proteína adaptadora asociada al dominio TIR

Tris: Trisaminometano

WT: fenotipo silvestre

ÍNDICE DE UNIDADES

μg: microgramos

μL: microlitros

μM: micromolar

g: fuerza g

h: horas

kDa: kiloDalton

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

°C: grados centígrados

p/v: peso/volumen

rpm: revoluciones por minuto

v/v: volumen/volumen

V: voltios

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El etanol y sus efectos

1.1.1 Efectos generales e incidencia del alcohol

El alcohol es una sustancia psicoactiva capaz de producir dependencia. El abuso de alcohol conduce a graves problemas sanitarios y sociales, tanto por la elevada incidencia de su consumo como por las diferentes patologías asociadas a él. Es la causa de más de 200 enfermedades y lesiones participando también en el número de accidentes y suicidios. Existe también una relación entre el consumo de alcohol y una serie de trastornos mentales y de comportamiento además de los traumatismos.

El Informe de la Organización Mundial de la Salud de 2012, estima que se produjeron 3,3 millones de muertes a consecuencia del consumo de alcohol (Figura 1), lo que representa el 5,9% del total de todas las muertes producidas en dicho año, además de ser la tercera causa de muerte prevenible de muerte en muchos países.

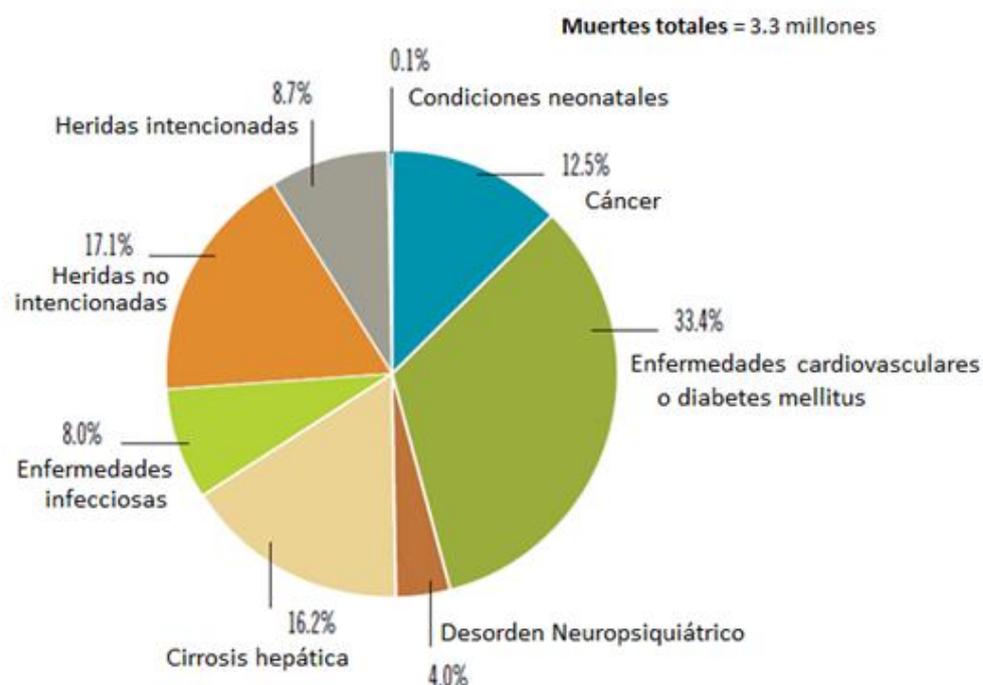


Figura 1. Distribución global de todas las causas de muerte atribuibles al alcohol (adaptado del Informe del Estado Global sobre Alcoholismo de la OMS 2012)

El consumo de alcohol a medio y largo plazo produce disfunciones en diversos órganos y de formas muy diferentes. A nivel cardiovascular, la exposición a altos niveles de alcohol durante periodos prolongados puede causar hipertensión y aumento de la frecuencia cardíaca, conduciendo a la disfunción cardíaca progresiva (cardiomiopatía alcohólica) (Guzzo-Merello, 2014). El consumo agudo da lugar a una reducción aguda de la función contráctil del corazón y a la aparición de arritmias cardíacas (Urbano-Márquez *et al.*, 1989). También puede estar relacionado con el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, metabólicas y endocrinas, pudiendo ser causa de enfermedades como la pancreatitis, diabetes tipo II o gota, y aumenta los niveles de secreción de ácido gástrico pudiendo derivar en gastritis, úlceras, cáncer de estómago, esófago, colon y páncreas (Bujanda, 2000; Kaufman y Kaye, 1978). Puede también alterar el ciclo menstrual femenino y desencadenar impotencia masculina e infertilidad (Battaglia *et al.*, 2011). Además, pueden producirse cambios de la expresión génica, apareciendo patrones anormales de metilación de ADN (hipometilación) y de la cromatina, junto con la formación de radicales libres (Guo y Ren, 2010).

Sin embargo, los efectos del alcohol más estudiados y que ocurren con una mayor frecuencia son los que se producen a nivel hepático, sistema inmune y cerebro. Los efectos sobre el hígado comprenden desde la esteatosis hepática, a hepatitis alcohólica y cirrosis hepática, que pueden entenderse como diferentes estadios de la hepatopatía alcohólica, y comprometen la integridad funcional del hígado con efectos pleiotrópicos sobre el organismo (Altamirano y Bataller, 2011). El alcohol genera trastornos neurológicos debido a la depresión que genera en las funciones neuronales, junto a la disminución del metabolismo de la glucosa en el cerebro (Wang *et al.*, 2000) y a la reducción de la masa cerebral (Krill y Halliday, 1999). Por ello está relacionado con una disminución de la función cognitiva, epilepsia y ansiedad.

1.1.2 Sistema neuroinmunitario y alcohol

El sistema inmunitario, está integrado por distintas líneas de defensa principales, éstas son la inmunidad innata (natural o inespecífica), la inmunidad adquirida (adaptativa o específica) y las barreras naturales.

Diferentes evidencias clínicas y experimentales sugieren que el etanol afecta al sistema inmunitario y a su respuesta, lo que causa una variación en los niveles de mediadores inflamatorios. El consumo tanto crónico como agudo se ha asociado con un aumento en el riesgo de padecer infecciones por bacterias y virus. Así, el consumo de etanol aumenta el

riesgo a padecer neumonía (Boe *et al.*, 2003; Quinton *et al.*, 2005), contraer infecciones sistémicas e incluso retrovirales (Szabo, 1999; Szabo y Mandrekar, 2009).

Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que el alcohol interacciona y desencadena una respuesta del sistema inmunitario permanecen sin elucidarse. Además, los efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario son muy complejos, debido a la variabilidad de factores que participan, como pueden ser la dosis, tiempo de exposición (agudo ó crónico) o tipo celular. Algunos autores proponen que puede bloquear la activación celular del endotelio durante la infección produciéndose un descenso en las interacciones de las células del endotelio con los leucocitos y, por lo tanto, un menor reclutamiento de las células efectoras al lugar de la infección (Saeed *et al.*, 2004). Otros autores proponen que el etanol bloquea la capacidad de responder a las infecciones de distintas células del sistema inmunitario, como monocitos y macrófagos (Mandrekar *et al.*, 2002), células dendríticas (Lau *et al.*, 2006), linfocitos T (Szabo *et al.*, 2004) y neutrófilos (Bautista y Wang, 2001).

El tratamiento agudo de etanol también modula la respuesta inmunitaria adquirida. Se ha observado que éste es capaz de disminuir la presentación antigénica en macrófagos (tanto humanos como de ratón), la proliferación de los linfocitos T y provoca un descenso en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Szabo *et al.*, 2004). Dosis moderadas de etanol afectan a la diferenciación y maduración de las células dendríticas *in vitro* y a la proliferación de linfocitos T. (Lau *et al.*, 2006).

La exposición crónica al etanol, tanto en humanos como en modelos animales, provoca alteraciones en la respuesta inmunitaria adquirida. A pesar de la mayor susceptibilidad a padecer infecciones, paradójicamente se ha descrito un aumento en la activación de células T en humanos alcohólicos (Cook *et al.*, 1995) y en ratones con consumo crónico (Cook *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2002).

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la inflamación producida por una infección, hemorragia o daño, suele asociarse con la activación del sistema inmune innato y se manifiesta por una estimulación de las células gliales residentes (Griffiths *et al.*, 2007; Valles *et al.*, 2004).

1.2 Componentes celulares del sistema neuroinmunitario

En el SNC se pueden clasificar las células en dos tipos, las neuronas y las células gliales. Las células gliales las componen los astrocitos, los oligodendrocitos y las células de microglía, de

las cuales astrocitos y microglía se consideran los responsables principales de las funciones inmunitarias del cerebro.

El término “glía” proviene del griego y significa “unión o pegamento” (Allen y Barres, 2009). Las células gliales representan aproximadamente el 80-90% de las células totales del SNC (Rao *et al.*, 1998), sin embargo, han sido consideradas durante mucho tiempo como meras células de soporte estructural, metabólico y trófico de las neuronas. Actualmente se conoce que no es así, y que la glía participa en la formación, operación y modulación de los circuitos sinápticos.

La glía es un grupo heterogéneo de células que cumplen diversas funciones en la fisiología del cerebro y que a diferencia de las neuronas, no son capaces de generar un potencial de acción. En el sistema nervioso adulto, las células gliales pueden controlar la intensidad o fuerza de la actividad sináptica, es decir, pueden cambiar el potencial de membrana que ocurre cuando se activan los receptores de neurotransmisores post-sinápticos, también pueden participar en el procesamiento de la información al coordinar la actividad entre grupos de neuronas. De manera inversa, las neuronas también pueden regular un amplio rango de actividades gliales como son la proliferación, diferenciación y mielinización (Pfrieger, 2002).

En condiciones normales, tanto astrocitos como microglía se encuentran en un estado desactivado o quiescente. Sin embargo, ambos tipos celulares son susceptibles de responder frente a distintos estímulos: factores de origen exógeno como estructuras microbianas, constituyentes intracelulares que han alcanzado una concentración crítica indicando daño celular o tisular, agregados proteicos que están presentes en una estructura diferente o por la unión ligando-receptor (Buchanan *et al.*, 2010; Glass *et al.*, 2010). Esta activación provoca un cambio morfológico y la adquisición de diversas funciones, incluyendo fagocitosis, expresión de moléculas señalizadoras de superficie y producción y secreción de mediadores inflamatorios (Hanisch y Kettenman, 2007).

La activación de las vías de señalización no sólo ocurre en respuesta a organismos infecciosos, sino también si se produce daño cerebral o bajo ciertas condiciones fisiopatológicas como Alzheimer, Parkinson o Esclerosis Lateral Amiotrófica (Markiewicz y Lukomska, 2006). Esta activación puede ser transitoria hasta el final del estímulo, o alcanzarse un estado de sobre-activación en el cual se desencadena un proceso inflamatorio crónico con efectos perjudiciales para la supervivencia neural y correcto funcionamiento del cerebro (Yang *et al.*, 2007). Diversos estudios indican que tanto la microglía como la astroglia expresan unos receptores denominados TLR, que actúan como sensores en las infecciones y en el daño (Jack *et al.*, 2005).

1.2.1 Microglía

Las células de la microglía son de pequeño tamaño presentando prolongaciones cortas e irregulares y capacidad fagocitaria. Estas células inmunes del sistema nervioso, protegen al cerebro de daños e infecciones, fagocitando células muertas y detritus.

La activación de la microglía se caracteriza por dos cambios principales. Primero, la célula pasa de tener una morfología altamente ramificada a una forma ameboide, y segundo, en presencia de patógenos estas células ameboides se convierten en fagocitos activos (Hanisch and Kettenmann, 2007). En su estado activado se observa un incremento en la expresión de varias moléculas de superficie (CD14, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o receptores de quimiocinas) (Rivest, 2009). Durante la activación, se producen cambios en la expresión genética que incluyen la secreción de citoquinas y quimiocinas, que modulan el entorno del SNC y regulan la infiltración leucocitaria (Stoll *et al.*, 2002; Owens *et al.*, 2005).

Las células de la microglia, una vez activadas, pueden secretar una gran variedad de sustancias neuroactivas, como factores trópicos, citoquinas o neurotransmisores, que son rápidamente dirigidas a la neurona, cambiando su capacidad e intensidad de excitación (Hanisch y Kettenmann, 2007). También pueden secretar efectores antiinflamatorios, como IL-4 e IL-13 quienes pueden aumentar la supervivencia neuronal (Shin *et al.*, 2014). Además, en el cerebro maduro, la microglía facilita la reparación guiando la migración de células madre hasta el sitio de inflamación o daño, pudiendo estar implicada en la neurogénesis. (Hanisch y Kettenmann, 2007).

Aunque la activación de la microglía puede ser, en ciertos casos, beneficiosa, ya que puede reparar el daño o eliminar patógenos, su activación de forma crónica es un componente importante en las enfermedades neurodegenerativas y contribuye a la disfunción neuronal y al daño asociado con estas patologías (Streit *et al.*, 2004; Kim y de Vellis, 2005).

1.2.2 Astrocitos

Dentro del grupo de células gliales, los astrocitos son los que aparecen en mayor porcentaje, siendo cinco veces superior al número de neuronas. Son células pequeñas de aspecto estrellado que se encuentran en todo el SNC. Se entrelazan alrededor de la neurona para formar una red de sostén y poder responder de forma rápida al daño.

Los astrocitos varían enormemente en forma y tamaño en las diferentes áreas del cerebro y se encargan de diferentes funciones además de las estructurales que son determinantes para el

desarrollo, funcionamiento y supervivencia neuronal. Están estrechamente relacionados con el control de la homeostasis iónica y molecular del cerebro, detoxificación, neuroprotección y mantienen la integridad de la barrera hemato-encefálica (Markiewicz y Lukomska, 2006). En estudios recientes se ha descubierto que los astrocitos producen y liberan varios mediadores moleculares, como prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y ácido araquidónico, que incrementan o disminuyen el diámetro de los vasos y el flujo sanguíneo en el cerebro (Koehler *et al.*, 2009). Los astrocitos son células dinámicas que responden de forma rápida ante un daño, y juegan un papel relevante en la regulación de la inflamación cerebral (Dietrich *et al.*, 2005). También expresan numerosos receptores que les permiten responder a varios compuestos neuroactivos, incluyendo neurotransmisores, neuropéptidos, factores de crecimiento, citoquinas, moléculas pequeñas y toxinas (Barbeito *et al.* 2004).

En cuanto a la respuesta a etanol, en el laboratorio de la Dra. Guerri se han realizado estudios que demuestran que los astrocitos liberan citoquinas y otros mediadores inflamatorios, contribuyendo a la generación de un ambiente neuroinflamatorio (Blanco *et al.* 2004). De hecho, se ha demostrado que el etanol a concentraciones fisiológicas relevantes (10-50 mM) es capaz de actuar como un agonista de los receptores TLR4/IL-1R y activar su vía de señalización de forma parecida a como ocurre cuando estos astrocitos son estimulados con sus ligandos, lipopolisacárido bacteriano (LPS) y IL-1 β . Tras la estimulación de los astrocitos con etanol, se observa una rápida fosforilación de los factores de transcripción factor nuclear kappa B (NF- κ B) y proteína activadora tipo 1 (AP-1), y el aumento de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) tras 30 minutos. Finalmente, a las 3h se observa un aumento en la muerte celular (Blanco *et al.* 2005)

1.2.3 Neuronas

Las neuronas son las responsables de transmitir las señales del sistema nervioso. Su estructura se divide en cuerpo neural o soma y dos tipos de prolongaciones, las dendritas y los axones. El soma es el centro metabólico donde se encuentra el núcleo y los demás componentes celulares. Las múltiples prolongaciones citoplasmáticas del soma dan lugar a las dendritas cuya función es recibir información de las demás neuronas y el medio externo. Por último, el axón conduce los impulsos nerviosos a otras neuronas o células musculares.

Las neuronas se caracterizan por su capacidad para responder a los estímulos con una descarga eléctrica, un impulso nervioso, y, además, por su conducción rápida del impulso nervioso a través de largas distancias. De esta manera, las señales se pueden transmitir en

milisegundos de un lugar a otro, ya sea dentro SNC o entre éste y órganos en otros sistemas del organismo. Cuando el impulso nervioso llega a la sinapsis, una sustancia llamada neurotransmisor se libera de la terminal del axón que transmite una señal química de una neurona a la siguiente.

Los mecanismos por los que el etanol es capaz de generar cambios en neuronas son complejos. Por una parte el etanol inhibe la función del receptor para glutamato, NMDA (N-metil D-aspartato), receptor asociado a un canal de Ca^{2+} , lo que conllevaría a una menor entrada de calcio en la célula y a una disminución de la actividad glutamatérgica. Al mismo tiempo, el etanol activa al receptor ácido gamma-aminobutírico (GABA), principal receptor inhibitorio en el SNC.

Las neuronas no participan directamente en la inflamación, ya que no se consideran células del sistema inmunitario, sin embargo si son capaces de liberar HMGB1 como respuesta al estímulo generado por el alcohol (Crews *et al.* 2014). Otras acciones del etanol en el cerebro incluyen: disminución de los factores tróficos y ácido fólico, aumento de la degeneración neuronal, que se relaciona con un fallo en la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), alteraciones en el proceso de mielinización, deficiencias en tiamina que altera el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial y el metabolismo oxidativo (Harper y Matsumoto, 2005; Guerrini *et al.*, 2009).

1.3 TLR4, neuroinflamación y alcohol

1.3.1 Receptores tipo Toll.

Los receptores de tipo Toll (Toll-like receptors, TLR) son una familia de receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRR) que reconocen amplios grupos de patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) como los LPS, las flagelinas, los mananos o los ácidos nucleicos de virus y bacterias. Actualmente se han identificado 11 receptores TLRs en el genoma humano, mientras que en el genoma del ratón se han descrito 13 TLRs, cada uno de ellos codificado por un gen diferente (Dunne y O'Neill, 2003). El TLR4, cuyo ligando específico es la endotoxina bacteriana LPS, es el miembro de la familia TLR que primero se descubrió en mamíferos y el que mejor se ha caracterizado (Beutler, 2000). Medzhitov lo identificó y demostró que activaba NF κ B y la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Medzhitov *et al.*, 1997). Actualmente se conoce que la familia de los TLR desempeña un papel crucial en la inmunidad innata.

Existen dos vías distintas de señalización asociadas con los TLRs: la que requiere el factor de diferenciación mieloide 88(MyD88), y la MyD88-independiente. Todos los TLRs menos TLR-3 señalan por la vía dependiente de MyD88 (Kawai y Akira, 2007). En la figura 2, se muestra un esquema de la ruta:

1) Se presenta el reconocimiento de PAMPs o estímulos externos por un TLR o una combinación de TLRs que genera una cascada de señalización intracelular, 2) bajo estimulación, la MyD88 recluta la kinasa asociada al receptor de interleukina 1 (IRAK) a través de la interacción de los dominios de muerte de ambas moléculas. El IRAK es activado por la fosforilación y se asocia con el factor asociado al receptor del factor de necrosis (TRAF), el TRAF6; 3) la oligomerización del TRAF6 activan la proteína kinasa activada por mitógeno (MAP3K), la cual indirectamente genera la activación de la kinasa I κ B (IKK) 4) la IKK es capaz de fosforilar los residuos de serina de la I κ B (inhibidor de NF- κ B) para su degradación, provocando la liberación NF κ B y 5) La activación del NF κ B provoca la fosforilación de p65. La proteína p65 forma parte del complejo NF- κ B, cuando es fosforilada, p65 se trasloca al núcleo para hacer efectiva la respuesta, estimulando la expresión de genes de moléculas proinflamatorias (citoquinas).

La vía MyD88-independiente, empleada en la señalización de TLR-3 y TLR-4, involucra el adaptador TRIF, que contiene un dominio TIR. Como MyD88, la proteína adaptadora asociada al dominio TIR (TRIF) activa TRAF-6 y promueve la producción de NF κ B (Kawai y Akira, 2007).

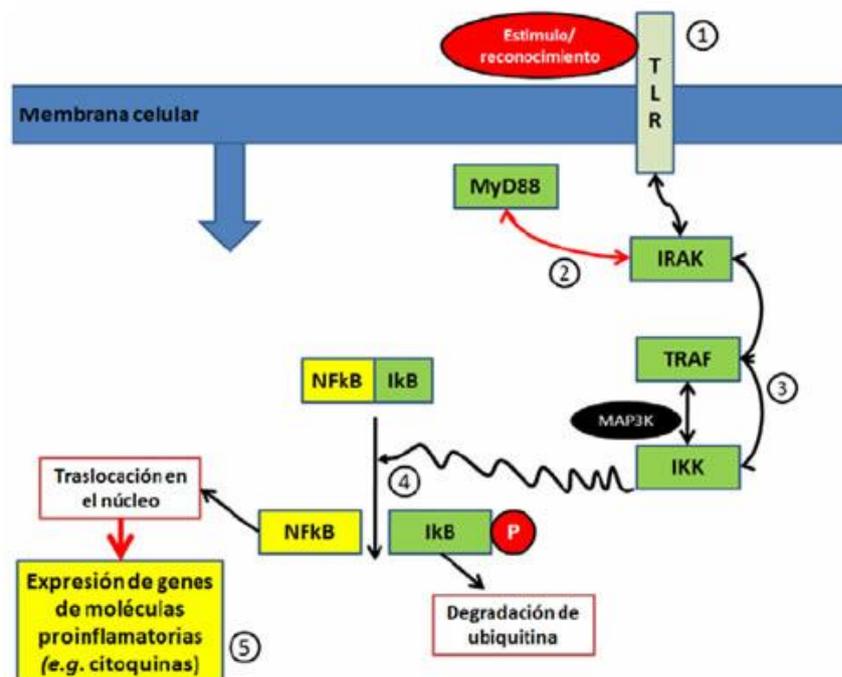


Figura 2. Esquema general de la cascada de señalización intracelular de la estimulación de TLRs (dependiente de la proteína de diferenciación mieloide 88 - MyD88). (Rondón-Barragán, 2009)

Todos los receptores TLR se expresan en el SNC, principalmente en células gliales. Los astrocitos en cultivo expresan todos los miembros de los TLR, exceptuando el TLR7 (Jack *et al.*, 2005). La microglía expresa los TLR 1-9, mientras que los oligodendrocitos expresan predominantemente el TLR2 y TLR3 (Okun *et al.*, 2008). En el caso de las neuronas, los TLR expresados son 2, 3, 4 y 8 (Tang *et al.*, 2007). La estimulación de los TLR en las células gliales activa funciones que son importantes para la eliminación de patógenos, pero que también pueden ser tóxicas para otras células que tienen limitada su capacidad regenerativa (Rivest, 2009). Se ha propuesto que la activación del TLR4 incrementa la apoptosis de células microgliales a través de la producción de interferón- β (IFN- β) (Jung *et al.*, 2005). La señalización de TLR inducida por el alcohol culmina en una mayor expresión de genes inmunes pro-inflamatorios a través de NF- κ B (Mao *et al.*, 2009).

1.3.2 TLR4 y su relación con el alcohol

Respecto a los mecanismos moleculares por los que el etanol induce la neuroinflamación, se ha demostrado que el etanol estimula una respuesta inmune innata específicamente a través del receptor TLR4 y de IL-1R de la membrana de las células gliales (Blanco y Guerri, 2007; Blanco *et al.*, 2005; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2008). La activación de los TLR4 activa a NF- κ B y la inducción de genes que codifican moléculas asociadas a la inflamación y citoquinas (Akira y Takeda, 2004).

Los hallazgos más relevantes han sido la demostración de que el alcohol es capaz de activar las rutas de señalización mediadas por TLR4 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). Esta activación desencadena una liberación de citoquinas que no sólo se ha detectado en cerebro, sino también en hígado de animales tratados con alcohol (Qin *et al.*, 2008).

La relevancia de la activación de los receptores TLR4 por el etanol y su respuesta inflamatoria y neuroinflamación se demostró bloqueando el receptor TLR4 con anticuerpos específicos (Blanco y Guerri, 2007), con ARN de interferencia en cultivo de astrocitos (Alfonso-Loeches, 2010) o aislando astrocitos o microglía de ratones deficiente en el TLR4 *-/-* (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2008). De esta forma se observó que ratones deficientes en TLR4 estaban protegidos frente al daño ocasionado por el consumo crónico de alcohol.

Además se observó un incremento de la expresión de las proteínas TLR2, TLR3 y TLR4 en cerebro alcohólico post-mortem y cerebro de ratón después del tratamiento con etanol (Crews

et al., 2012). También hay evidencia en humanos para la participación del sistema de NF- κ B en la corteza prefrontal de los alcohólicos (Okvist *et al.*, 2007).

Estos resultados sugieren que la activación de este tipo de los receptores TLR4 por parte del etanol podría constituir un mecanismo fundamental en la producción de citoquinas y en la aparición de daño inflamatorio.

1.4. HMGB1 y su función inflamatoria

High mobility group box 1 (HMGB1), es el primer miembro de la familia de proteínas HMGB. Es una proteína nuclear implicada en varios aspectos de de la inmunidad innata, como patrón molecular del daño y posterior mediador de la inflamación, interviniendo en la autofagia o también en la apoptosis. Esta proteína suele permanecer en el núcleo de las células eucariotas, donde desempeña el papel de chaperona de ADN, facilitando la replicación, transcripción y reparación de ADN, así como estabilizando la estructura de doble hélice del DNA (Stros, 2010; Min *et al.*, 2013). Cuando HMGB1 es liberada al citoplasma debido a una señal de daño o infección, muestra actividad como citoquina, participando en la activación de la inflamación, regulando la autofagia y manteniendo el equilibrio entre la autofagia y la apoptosis (Lee *et al.* 2014). La liberación de HMGB1 por parte de las células en proceso de muerte se piensa que dirige la respuesta inflamatoria a necrosis (Yang *et al.*, 2010).

Existen dos maneras principales de liberación de HMGB1 (Figura 3). La liberación pasiva, que engloba la secreción instantánea por células infectadas por un patógeno o a la liberación proveniente de células necróticas (Scaffidi, 2002). Esta liberación se produce por una rotura de las membranas de la célula, tanto la plasmática como la nuclear. Por otro lado, la secreción activa de HMGB1 se inicia a través de una señal de transducción mediante la interacción de los receptores de membrana plasmática con productos extracelulares, como LPC, esta liberación se realiza de una forma más lenta y el HMGB1 liberado esta en forma acetilada (Gardella, 2002). Esta liberación de HMGB1 celular activa implica la migración desde el núcleo a vesículas-lisosoma que protegen HMGB1 de la proteólisis en el citoplasma (Evankovich *et al.*, 2010).

Los estímulos para la secreción de HMGB1 por parte de las células inmunes son diversos e incluyen PAMPs, citoquinas y ciertos estreses moleculares.

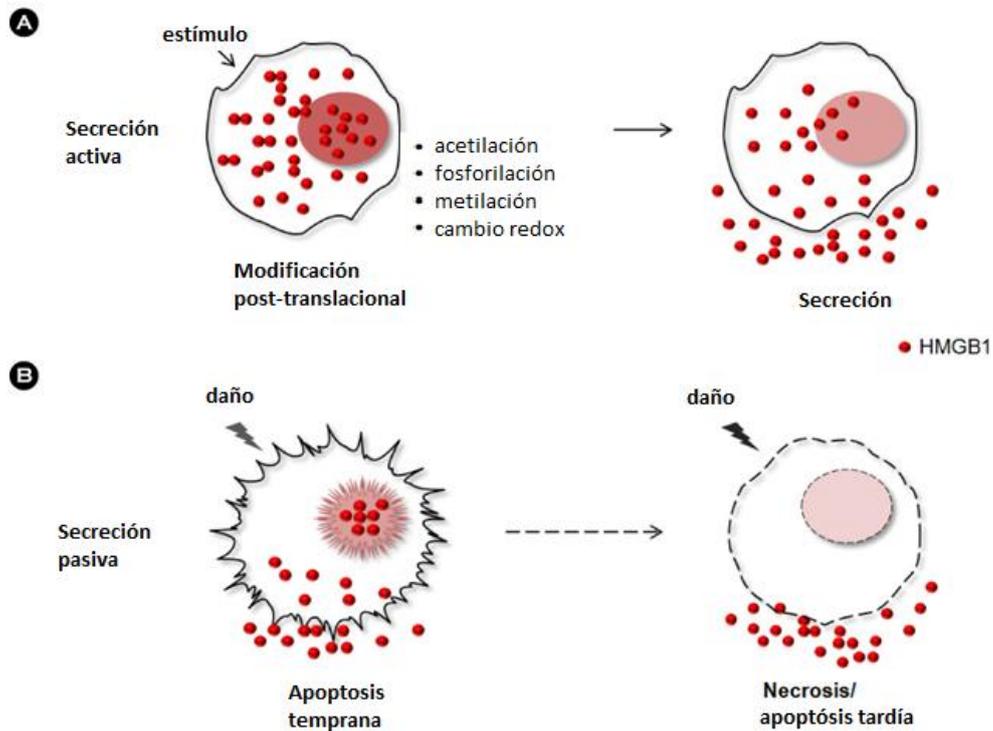


Figura 3. Vías de liberación de HMGB1. (A) HMGB1 es secretado activamente en respuesta a estímulos inflamatorios exógenos o endógenos. (B) HMGB1 es liberada pasivamente por células muertas por necrosis o apoptosis causada por el daño. (Imagen modificada de Kwak y Shin, 2013)

Cuando HMGB1 no está acetilada, ésta permanece en el núcleo y no es secretada ni liberada como durante la apoptosis (Scaffidi, 2002). En otros estudios, concretamente con el factor de necrosis tumoral (TNF- α) de macrófagos activados, la secreción de HMGB1 es dependiente de fosforilación mediada por la kinasa C (Youn y Shin, 2006).

La liberación activa de HMGB1 implica la señalización del receptor sin muerte celular y se ha estudiado principalmente en las células inmunes, como los monocitos (Gardella *et al.*, 2002; Lotze y Tracey, 2005) y en los hepatocitos (Evankovich *et al.*, 2010). Estudios recientes sugieren que HMGB1 en cerebro es altamente expresado en neuronas y es liberada por ellas (Kim *et al.*, 2008; Maroso *et al.*, 2010). HMGB1 extracelular funciona como una citoquina proinflamatoria, activando la microglía, y por lo tanto estimulando la liberación de otras citoquinas, agravando la lesión cerebral (Kim *et al.*, 2006). HMGB1 puede unirse a varios receptores de superficie incluyendo TLR2, TLR4, TLR9, RAGE, y también interactúa con CXCL12, que se une al receptor CXCR4 (Lee *et al.*, 2014).

Estos resultados son consistentes con que la liberación en el cerebro HMGB1 afecta a la señalización neuronal. Las dosis altas de HMGB1 provocan diferentes efectos, entre las que se incluyen fiebre, la pérdida de peso, anorexia, la lesión pulmonar aguda, disfunción de la barrera epitelial, la artritis pudiendo provocar la muerte (Harris *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2005).

El tratamiento crónico con etanol en cultivos de cerebro de ratón induce un aumento de HMGB1 en el medio de cultivo y la expresión de TLRs. Este incremento de la expresión de la proteína y TLRs también se ha observado *in vivo* en cerebro de ratón después del tratamiento con etanol y en cerebro de alcohólicos post mortem (Crews *et al.*, 2012). El aumento de HMGB1, TLR3 y TLR4 es también observado en ratas expuestas al alcohol de forma intermitente utilizando un modelo de consumo masivo ocasional (Vetreno y Crews, 2012).

La exposición al etanol provoca la liberación de HMGB1 en los medios de cultivo y la HMGB1 liberada lo hace principalmente de forma acetilada, es decir, a través de un mecanismo activo. (Zou y Crews, 2014).

Otros estudios corroboran la liberación de HMGB1 por neuronas en proceso de muerte en cultivos tratados con LPS (Gao *et al.*, 2011), demostrando que la activación de TLR4 provoca la liberación de HMGB1. Ese HMGB1 puede ser un importante mediador para la degeneración de neuronas, manteniendo una inflamación prolongada que induce neurodegeneración crónica. A través de un bucle formado entre las neuronas dañadas y la neuroinflamación no regulada, la neurodegeneración continúa progresando incluso después de que se retiren los desencadenantes tóxicos iniciales (Gao *et al.*, 2011).

2. Objetivos

Datos anteriores del laboratorio de Patología Celular del CIPF indican que el alcohol promueve procesos inflamatorios en hígado y en cerebro y sugieren que el alcohol estimula la respuesta innata inmunitario y, en particular a los receptores TLR4 (Blanco et al., 2004; Valles et al., 2004). Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con etanol induce la liberación de HMGB1 en el cerebro e hígado, que contribuye a patología inducida por el alcohol en ambos órganos (Ge et al., 2014; Vetreno et al., 2013).

En el presente trabajo se pretende ***evaluar los mecanismos moleculares y celulares de la liberación de la citoquina proinflamatoria HMGB1 tras la estimulación con etanol en cultivos primarios de astrocitos y neuronas.***

En concreto, los objetivos que se plantean son:

- Estudiar y comparar la cinética de liberación de HMGB1 en neuronas y astrocitos a distintas dosis de etanol con relevancia fisiológica (10, 25, 50 mM).
- Analizar la activación de la vía de señalización de TLR4 midiendo la fosforilación de p65-NF- κ B en neuronas y astrocitos y su papel en la liberación de HMGB1.
- Evaluar la implicación de la muerte celular por apoptosis en la liberación de HMGB1, tanto en neuronas como astrocitos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Para el desarrollo de este proyecto de investigación, se utilizaron crías de ratones C57BL/6 silvestres o *wild type* (WT) (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Todos los animales han sido criados bajo condiciones controladas SPF (libres de gérmenes y patógenos), con fotoperiodo de 12 horas de duración, temperatura de 23 °C y humedad del 60%. Para la obtención de crías, las hembras preñadas se separaron y se mantuvieron en jaulas aisladas durante el periodo de gestación. Todos los experimentos animales se realizaron de acuerdo a las directrices establecidas por la Directiva Europea (2010/63/UE) y por el *Real Decreto 53/2013*.

3.2 Cultivo primario de astrocitos

Los cultivos primarios de astrocitos se prepararon a partir de corteza cerebral. Por cada cultivo se usó una camada de crías recién nacidas, dentro de las 24 horas tras su nacimiento. En una cabina de flujo laminar vertical (Master Bio48), las crías se sacrificaron, y tras extraer los cerebros en condiciones estériles, las cortezas cerebrales se diseccionaron, eliminando las meninges y otras partes de cerebro, y las células se disgregaron mediante aspiración con una pipeta de 10 mL en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, medio Eagle modificado por Dulbecco). El extracto celular se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante un minuto, para eliminar las neuronas, y se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 90 µm, para eliminar los agregados celulares. El extracto se mezcló con medio de proliferación (DMEM conteniendo 20% de suero bovino fetal (SBF), 1% de penicilina/estreptomicina (concentración final: 1000 unidades/mL), 1% de fungizona (2.5 µg/mL), 1% de glutamina (2 mM) (Invitrogen-Gibco) y 1 g/L de glucosa extra), y se sembró en placas de 100 y 60 cm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron en un incubador Heraeus (Heraeus) a 37 °C, al 5% de CO₂/95% aire. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana, y tras 7 días de crecimiento, el medio de cultivo se cambió a medio de diferenciación [DMEM con 10% SBF, 1% de penicilina/estreptomicina (concentración final: 1000 unidades/mL), 1% de fungizona (2.5 µg/mL) y 1% de glutamina (2 mM)]. Los astrocitos se dejaron crecer hasta su confluencia, aproximadamente hasta día 10.

3.3 Cultivo primario de neuronas

El cultivo primario de neuronas de ratón se preparó a partir de fetos en el día 16 de gestación. Tras la obtención del útero, se extraen los fetos y se lavan con PBS a 37 °C. Las crías se sacrificaron, y tras extraer los cerebros en condiciones estériles las cortezas se disgregaron mecánicamente y se pasaron por una malla de 90 µm. La suspensión se centrifugó a 200 g durante 3 min, a 25 °C. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo Neurobasal suplementado con glutamato 25 µM, GlutaMAX™ (1:100), B-27R (1:50) y 50 µg/mL de penicilina; estreptomicina, a 37 °C. Este medio favorece el crecimiento de las neuronas e inhibe el crecimiento de otros tipos celulares como los astrocitos.

Las células se sembraron en placas previamente tratadas con poli-D-lisina (12,5 µg/mL) y se mantuvieron hasta 7 y 14 días en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y aire 95%, a 37 °C. Se cambió parte del medio cada 3 días

3.4 Estimulación con etanol de las células

Los cultivos de astrocitos y neuronas se estimularon con diferentes concentraciones de etanol (10, 25 y 50 mM). En el caso de los astrocitos, es necesario que hayan permanecido previamente un mínimo de 16h en medio idéntico al de diferenciación pero sin SBF y con BSA 1mg/mL. Para la estimulación, el medio empleado fue DMEM sin SBF para evitar la precipitación de proteínas del medio, suplementado con L-glutamina 2 mM, fungizona al 1% (v/v) y antibiótico (AST). Una vez estimuladas las células con el nuevo medio de cultivo con etanol se incubaron a 37 °C durante diferentes tiempos

Tras permanecer en el incubador el tiempo correspondiente se transfirió el medio a un tubo eppendorf, se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 5 min para eliminar la posible debris, se transfirió el sobrenadante a un eppendorf nuevo, se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80 °C hasta su uso. También se recogieron las células de las placas raspando con PBS a 4 °C, se centrifugaron a 3000 rpm 5 min y se congeló el pellet en nitrógeno líquido.

3.5 Precipitación de la proteína a partir del medio de cultivo.

El medio que ha sido congelado en nitrógeno líquido y mantenido a -80C° se deja descongelar en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas.

3.5.1 Separación de fases

Se añadió 1 mL de metanol y 250 μL de cloroformo por mL de medio utilizado y se agitó vigorosamente durante 15 segundos. La mezcla se centrifugó a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos a una velocidad de 13.000g. Se eliminó el sobrenadante con precaución de no arrastrar la fase intermedia formada donde se encuentran las proteínas de interés.

3.5.2 Precipitación

Se añadieron 500 μL de metanol al resto de muestra retenida en el tubo y se transfirió a un tubo eppendorf donde se mezcló durante 15 segundos utilizando el vórtex. Se centrifugó a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min a 13.000g y se eliminó todo el sobrenadante quedando un pellet de proteínas. Se dejó secar al aire durante 3 min. Tras ello, se resuspendió el pellet en un volumen de 60 μL de tampón de carga (Tris 350mM pH 6.8, glicerol al 30% (v/v), β -mercaptoetanol al 30% (v/v), dodecil sulfato sódico (SDS) 100g/L y azul de bromofenol 200 mg/L), la mezcla se hirvió a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 min. Este proceso está representado en la Figura 4.

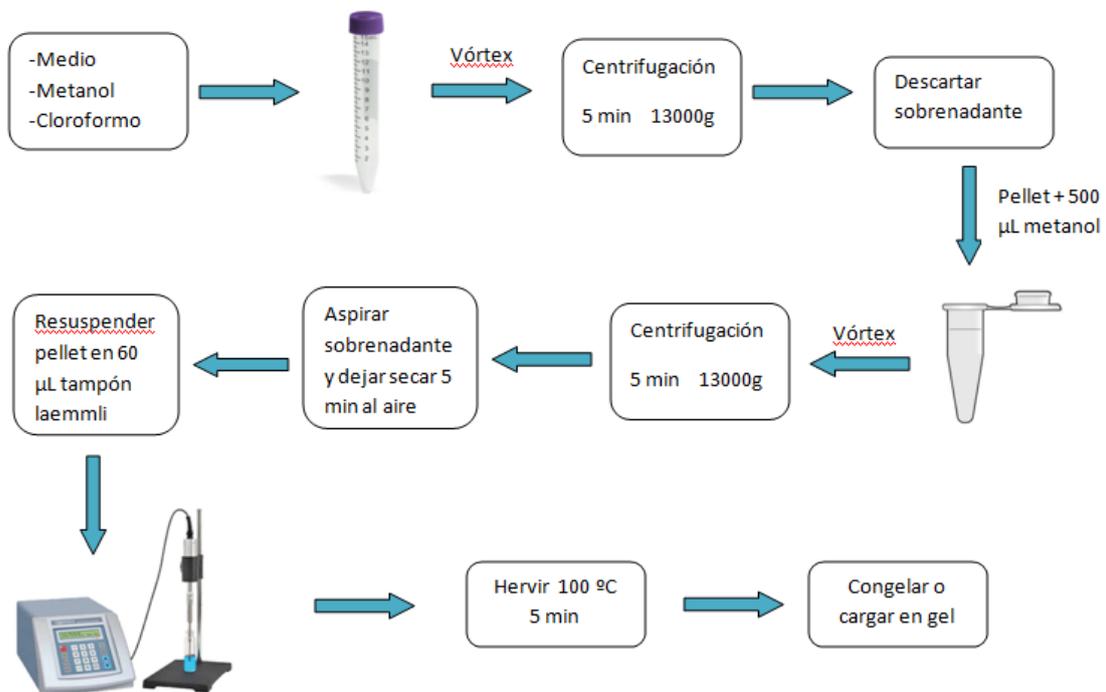


Figura 4. Proceso seguido para la precipitación de la proteína extracelular a partir del medio de cultivo.

3.6 Extracción de proteína de las células

Las células recogieron por centrifugación y se lisaron para extraer las proteínas presentes en el interior de las neuronas estimuladas con las diferentes concentraciones de alcohol. Se preparó un tampón de extracción compuesto por: Tris-HCl 20mM pH 8, Nonidet P-40 al 1% (v/v), cloruro sódico 4 mM, flúoruro sódico 40 mM, aprotinina 10 µg/mL, leupeptina 40 µM, DTT 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, y PMSF 1 mM.

Se añadió un volumen de 50 µL de Buffer a cada muestra y se mantuvo en hielo durante 30 min agitando en vórtex cada 10 min. El extracto celular se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificó la cantidad de proteína del extracto obtenido por el método BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

3.7 Electroforesis e inmunotransferencia

Para la realización de la electroforesis en condiciones desnaturizantes (PAGE), se utilizaron geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Para separar las proteínas mediante electroforesis, se utilizó el sistema Mini Protean de BioRad en tampón de electroforesis (Tris 3 g/l, glicina 14,4 g/l y SDS 1 g/l) a pH 8,3. Los geles de poliacrilamida se prepararon con dos fases: una inicial al 4.5% de poliacrilamida para conseguir que las proteínas se agrupen y penetren a la vez en la segunda fase, separadora, con unos porcentajes de acrilamida superiores. Una vez polimerizado el gel, se colocó en la cubeta con tampón de electroforesis inicialmente a 80 V mientras la muestra recorre la fase de inicial, y a 120 V por la fase separadora durante 1-2 h, controlando el avance gracias al colorante azul de bromofenol que posee el tampón de carga. Como patrón de peso molecular se utilizó BlueStar Protein Marker (Genetics).

Los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (INMOVILION) previamente activada en metanol durante 5 min y equilibrada en tampón de transferencia [Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v)]. Para realizar dicha transferencia, se puso en contacto el gel con la membrana y se colocó a ambos lados papel de filtro y esponjas tras haberlos humedecido con el tampón de transferencia evitando la presencia de burbujas que interfiriesen en el proceso. La electrotransferencia se realizó a 4 °C durante 75 min a 110 V o toda la noche a 30 V. Finalizada la transferencia, las membranas se

incubaron durante al menos 30 min en BSA 5% con TBS-T (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 Mm, y Tween-20 0,1%) a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas.

Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 1) preparado en BSA 1% en TBS-T y, tras varios lavados en el tampón de lavado TBS-T, fueron incubados con un anticuerpo secundario apropiado (Tabla 2) a temperatura ambiente durante una hora.

Las proteínas se visualizaron con un sistema quimioluminiscente (ECL Plus de Amersham Pharmacia Biotech). En el caso de que el anticuerpo secundario estaba fusionado a fosfatasa alcalina, se usó una mezcla de BCIP/NBT (1:2) diluida en tampón de fosfatasa alcalina (Tris 12.1 g/L, MgCl₂ 1.01 g/L, NaCl 5.8 g/L pH 9.2) que es transformada por acción de la fosfatasa en un precipitado con coloración (Figura 5).

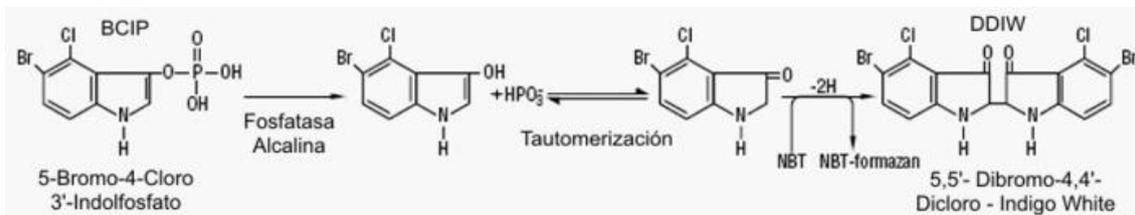


Figura 5. La enzima fosfatasa alcalina cataliza la reacción de eliminación del grupo fosfato de BCIP, cuyo producto reacciona con NBT formando un precipitado con coloración. (Imagen modificada de Chen et al., 2013)

En algunos casos se eliminaron los anticuerpos de las membranas (stripping) con un tratamiento de glicina 200 mM pH 2,5 y SDS al 0,4% (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación, se bloquearon y se incubaron de nuevo con otros anticuerpos diferentes. Para cuantificar la densidad de las bandas se utilizó el software de análisis de imagen ImageJ.

Para la expresión de la proteína p-p65 se normalizó con respecto a los niveles de la proteína p65, y la expresión de la proteína caspasa3 activa se normalizó respecto a los niveles de la proteína de expresión constitutiva GAPDH.

Tabla I. Relación de anticuerpos y diluciones utilizadas en la detección de proteínas mediante inmunotransferencia.

ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN INMUNOTRANSFERENCIA				
Antígeno	PM(kDa)	Organismo	Dilución	Casa Comercial
HMGB1	27	Conejo	1:500	Abcam
NFκβ-p65	65	Conejo	1:500	Cell Signaling Technology
p-NFκβ-p65	65	Conejo	1:500	Cell Signaling Technology
Caspasa3 activa	19	Conejo	1:200	Abcam
GAPDH	35	Ratón	1:10000	Millipore

Tabla II. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS		
Anticuerpo-HRP	Dilución	Casa Comercial
Anti-conejo-HRP	1:20.000	Sigma-Aldrich
Anti-ratón-HRP	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ratón-fosfatasa alcalina	1:1000	Sigma-Aldrich

4. Resultados

4.1 Astrocitos y neuronas en cultivo primario responden frente a etanol liberando HMGB1

Para estudiar y comprobar la liberación de HMGB1 provocada por la presencia de alcohol, los cultivos de astrocitos procedentes de corteza cerebral fueron tratados con diferentes concentraciones de etanol HMGB1 a diferentes horas tras su estimulación (Figura 6). Por primera vez, se evaluó la presencia de la proteína HMGB1 en cultivo primario de astrocitos. La respuesta generada por los astrocitos varía dependiendo de la concentración de etanol utilizada, manteniéndose al mismo nivel que el control durante las 7 primeras horas y aumentando hasta casi duplicarse tras 24 h para las concentraciones de 10 mM y 25 mM. Sin embargo, cuando la concentración de etanol para la estimulación es de 50 mM, la respuesta de los astrocitos es notablemente más rápida, apreciándose un aumento de HMGB1 tras la primera hora que posteriormente sufrirá una bajada para finalmente incrementarse progresivamente hasta las 24 h.

Para profundizar en los efectos generados por el etanol en el cerebro, se utilizaron neuronas en cultivo primario y se estimularon con etanol a diferentes dosis (Figura 7). Los resultados obtenidos muestran que se aprecia un cambio significativo en los niveles de HMGB1 liberado en las neuronas a la hora de la exposición. Cuando la concentración de etanol presente en el medio fue de 10 mM, se produjo una importante liberación al medio extracelular de HMGB1 a 1 h, disminuyendo de nuevo a niveles del control a las 3 h y manteniéndose así de forma continua, indicando que a esta concentración se produce una recuperación de los niveles basales del cultivo tras la liberación inicial. Para las concentraciones de 25 y 50 mM las curvas de respuesta al etanol muestran una tendencia común, en la que se repite un aumento de los niveles de HMGB1 durante la primera hora posterior a la estimulación, seguida de un descenso a las 3 h aunque superado este tiempo la liberación de HMGB1 vuelve a aumentar significativamente hasta las 7 h, manteniéndose a ese nivel hasta las 24 h.

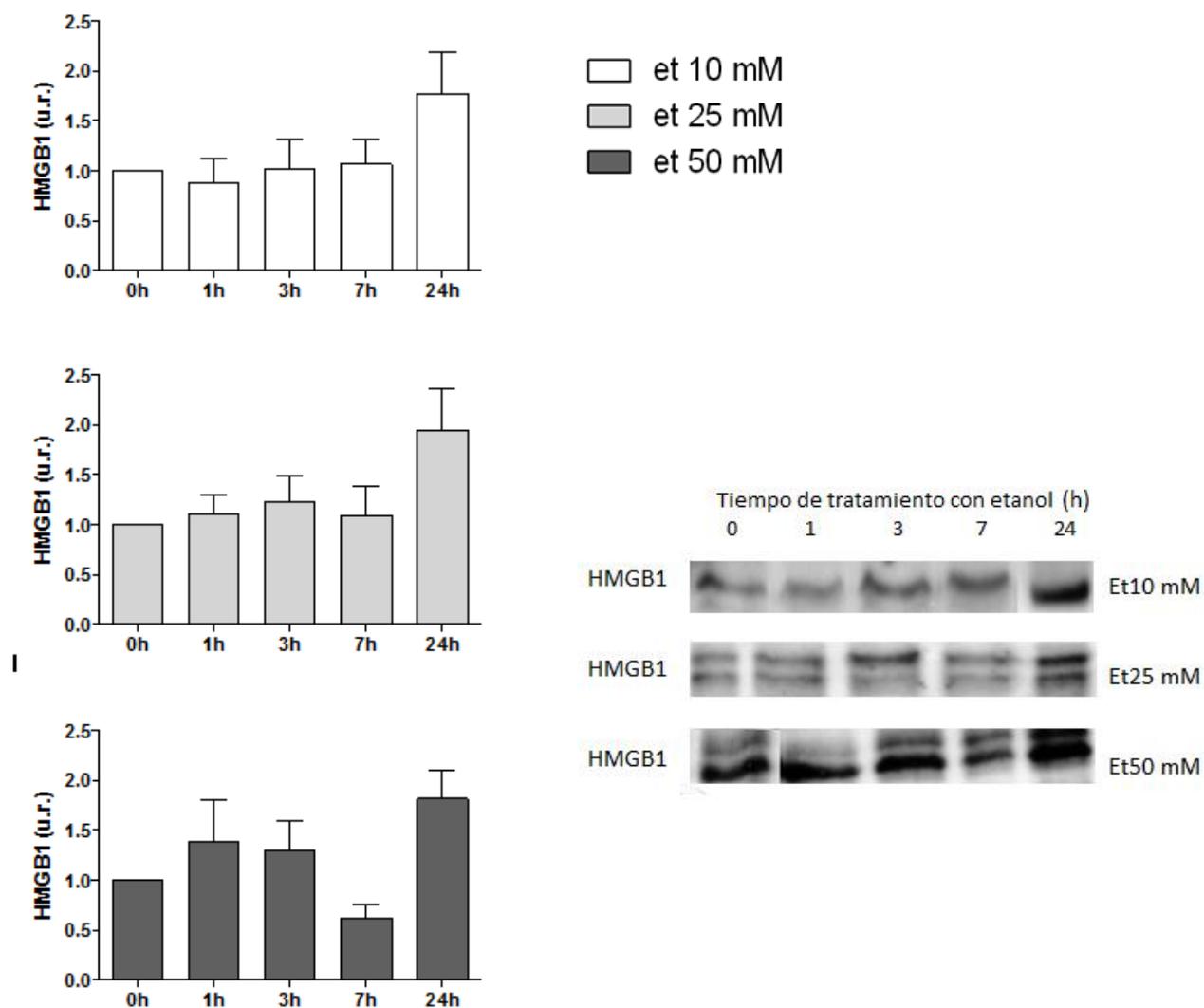


Figura 6. La estimulación de astrocitos con etanol induce la liberación de HMGB1 al medio extracelular. Los astrocitos fueron analizados tras una incubación con etanol (10, 25 y 50 mM), a diversos tiempos y se evaluaron los cambios en la liberación de HMGB1 al medio extracelular mediante inmunotransferencia. Se muestra una inmunotransferencia representativa de los experimentos. La cuantificación corresponde a la media \pm S.E.M.

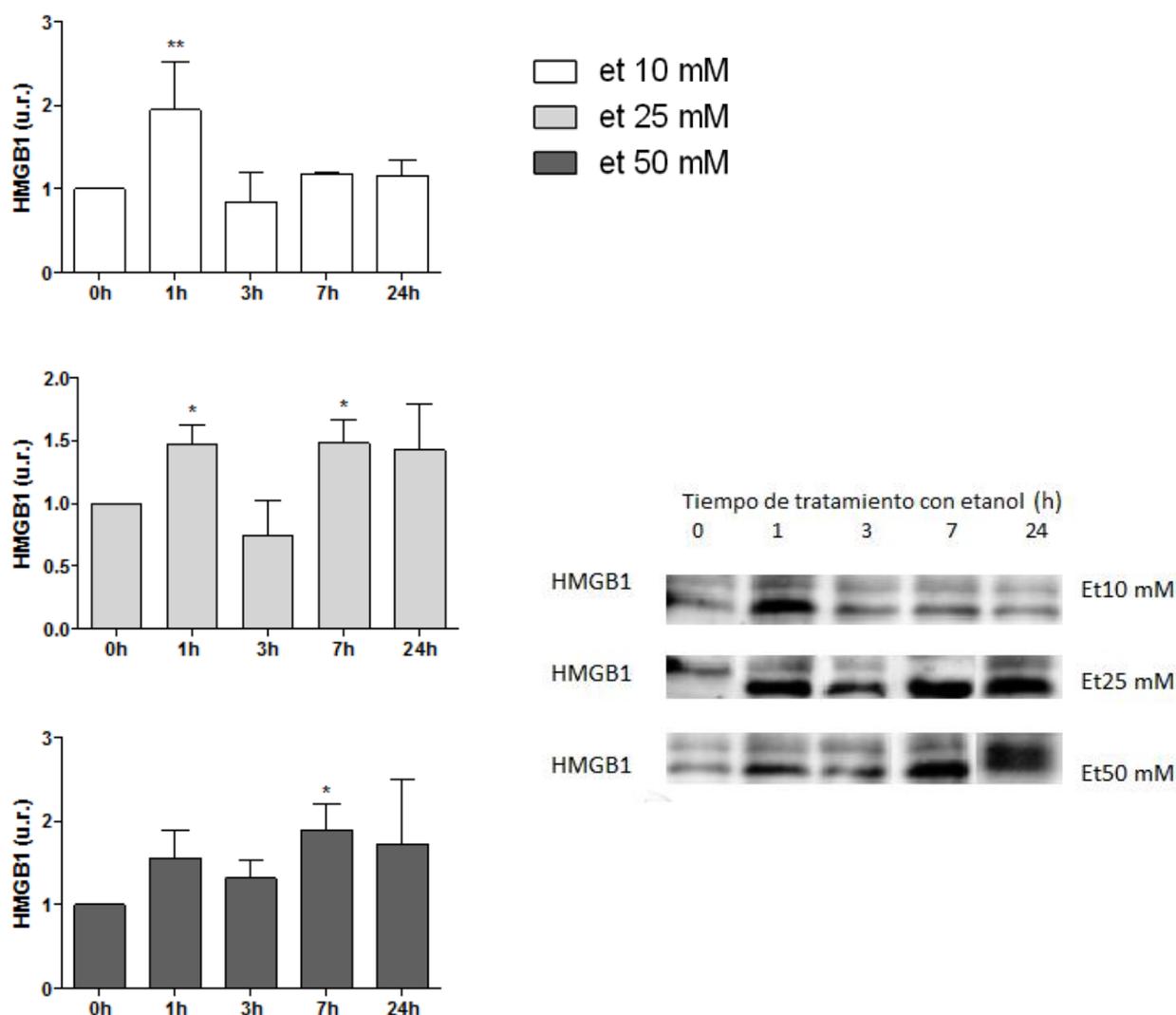


Figura 7. La estimulación con etanol induce la liberación de HMGB1 al medio extracelular en neuronas. Las neuronas fueron analizadas tras una incubación con etanol (10, 25 y 50 mM), a diversos tiempos y se evaluaron los cambios en la liberación de HMGB1 al medio extracelular mediante inmunotransferencia. Se muestra una inmunotransferencia representativa de los experimentos. La cuantificación corresponde a la media \pm S.E.M. ($p^* < 0.05$ y $p^{**} < 0.01$ respecto al valor control con un t-test).

A partir de estos resultados, se puede deducir que la liberación de HMGB1 se produce de forma más rápida en neuronas que en astrocitos, ya que para las primeras se observa un aumento con respecto al nivel basal tras la primera hora posterior a la estimulación, y a partir de ahí, la presencia de HMGB1 extracelular se mantiene hasta tiempos largos. Sin embargo, en

el caso de los astrocitos, se aprecian cambios poco significativos a tiempos cortos, que se ven aumentados conforme avanza la duración de la estimulación con el etanol, dándose a las 24 h la máxima concentración de HMGB1 liberada al medio extracelular.

Estas diferencias detectadas entre las neuronas y los astrocitos podrían deberse a una mayor sensibilidad de las neuronas frente al etanol, lo que desencadena una respuesta mucho más rápida de éstas al mismo activando el proceso de inflamación de una forma más inmediata.

Además, la cinética de liberación de HMGB1 se ve influenciada por la dosis de etanol empleada, ya que dependiendo de la concentración adicionada, varían los tiempos a los que se produce la liberación al medio extracelular.

Los resultados obtenidos sugieren que la activación de la liberación de HMGB1 en neuronas ocurre con dosis de etanol inferiores que en astrocitos. Pues en todas las dosis utilizadas (10, 25, 50 mM) encontramos liberación de HMGB1 en neuronas a tiempos cortos. Por el contrario, a tiempos cortos en astrocitos, sólo a 50mM es capaz de inducir la liberación de HGMB1. Sin embargo, también es importante comentar que a tiempos largos, tanto en astrocitos como neuronas, observamos liberación de HMGB1. Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad de las neuronas a los efectos del etanol.

4.2 El estimulación con etanol desencadena un proceso inflamatorio en las células mediado por TLR4

Tras el tratamiento de los astrocitos con las distintas concentraciones de etanol y las medidas a diferentes tiempos de incubación, se aislaron dichas células para la detección de p65 fosforilado (Figura 8) ya que la presencia de p65 fosforilado es indicativa de que se está produciendo una respuesta inflamatoria, a través de NF-κB

Los astrocitos responden de forma casi inmediata a la presencia de etanol en el medio, ya que a tiempos cortos de exposición comienzan a activarse las rutas de activación de la inflamación. Se observa un máximo cuando ha transcurrido una hora de la exposición. Para las concentraciones de 25 y 50 mM, este pico va seguido de un ligero descenso tras el cual, los valores de p-p65 se estabilizan entorno a un 50% por encima de su nivel habitual. . La cinética seguida en la que se registra una subida inicial, seguida de un descenso tras el cual los niveles de p-p65 se vuelven a incrementar, podría estar relacionado con la naturaleza cíclica de estos procesos inflamatorios. Por otro lado, cuando la concentración de etanol utilizada fue menor,

se produce una recuperación de los astrocitos hasta casi el nivel basal a tiempos más largos. Estos resultados sugieren que a bajas concentraciones de etanol, los astrocitos son capaces de recuperarse y restaurar las condiciones previas al daño.

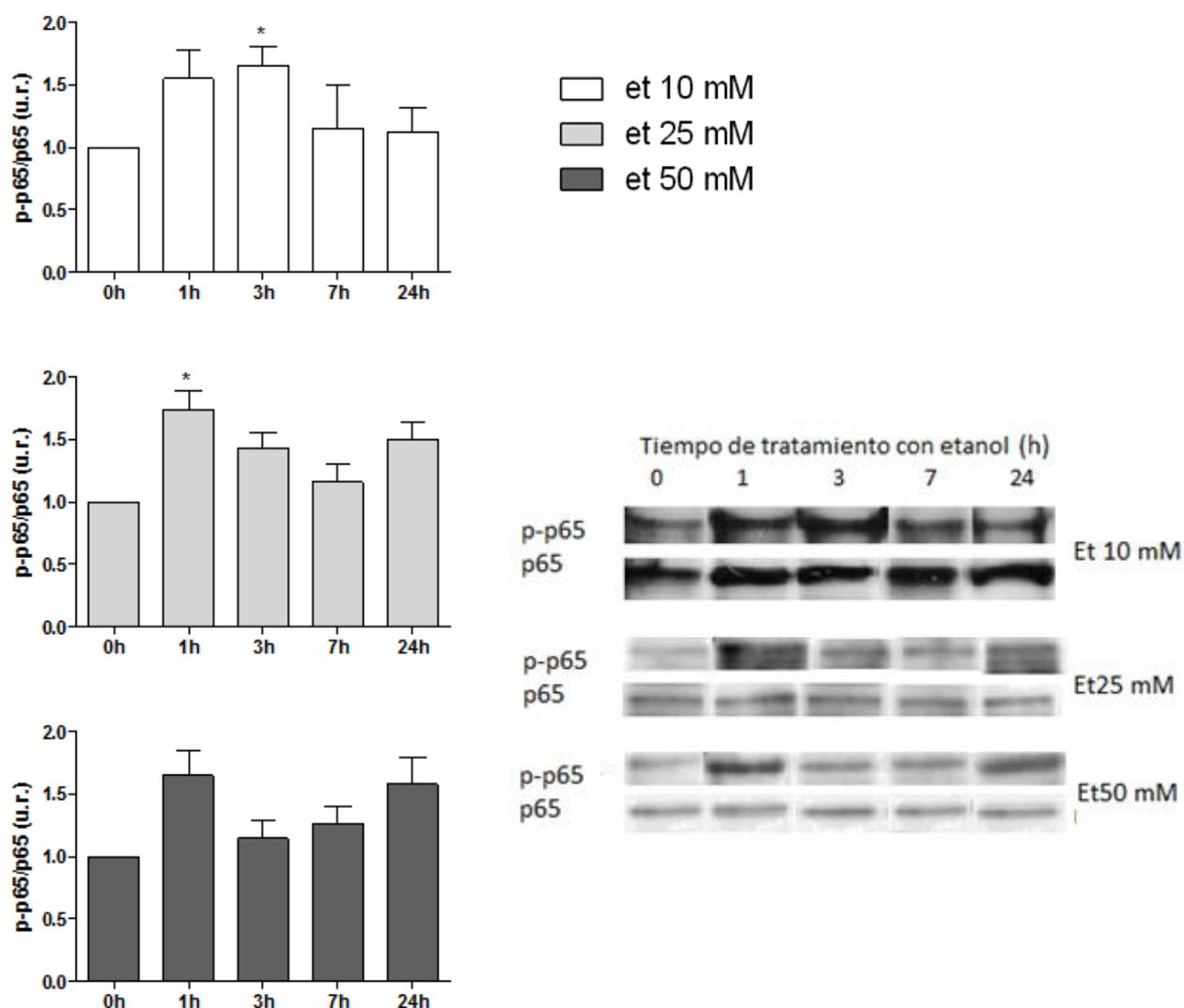


Figura 8. El etanol aumenta los niveles de expresión de la subunidad p65 fosforilada de NFκB en astrocitos. La presencia de la subunidad p65 de NFκB se evaluó en extractos celulares. El tratamiento con etanol produce un aumento en la fosforilación de p65 en astrocitos. Se muestra una inmunotransferencia representativa de los experimentos. Los resultados de la cuantificación reflejan la media \pm S.E.M. (* $p < 0.05$ respecto al valor del control respecto al valor control).

En el caso de las neuronas (Figura 9), para las tres concentraciones se apreció un progresivo incremento en la fosforilación de p65 que se hizo notable en las neuronas a partir de las 3 h de incubación con el etanol. Alcanzado ese tiempo, el aumento de p-p65 continúa hasta las 24 h donde se observó la máxima presencia.

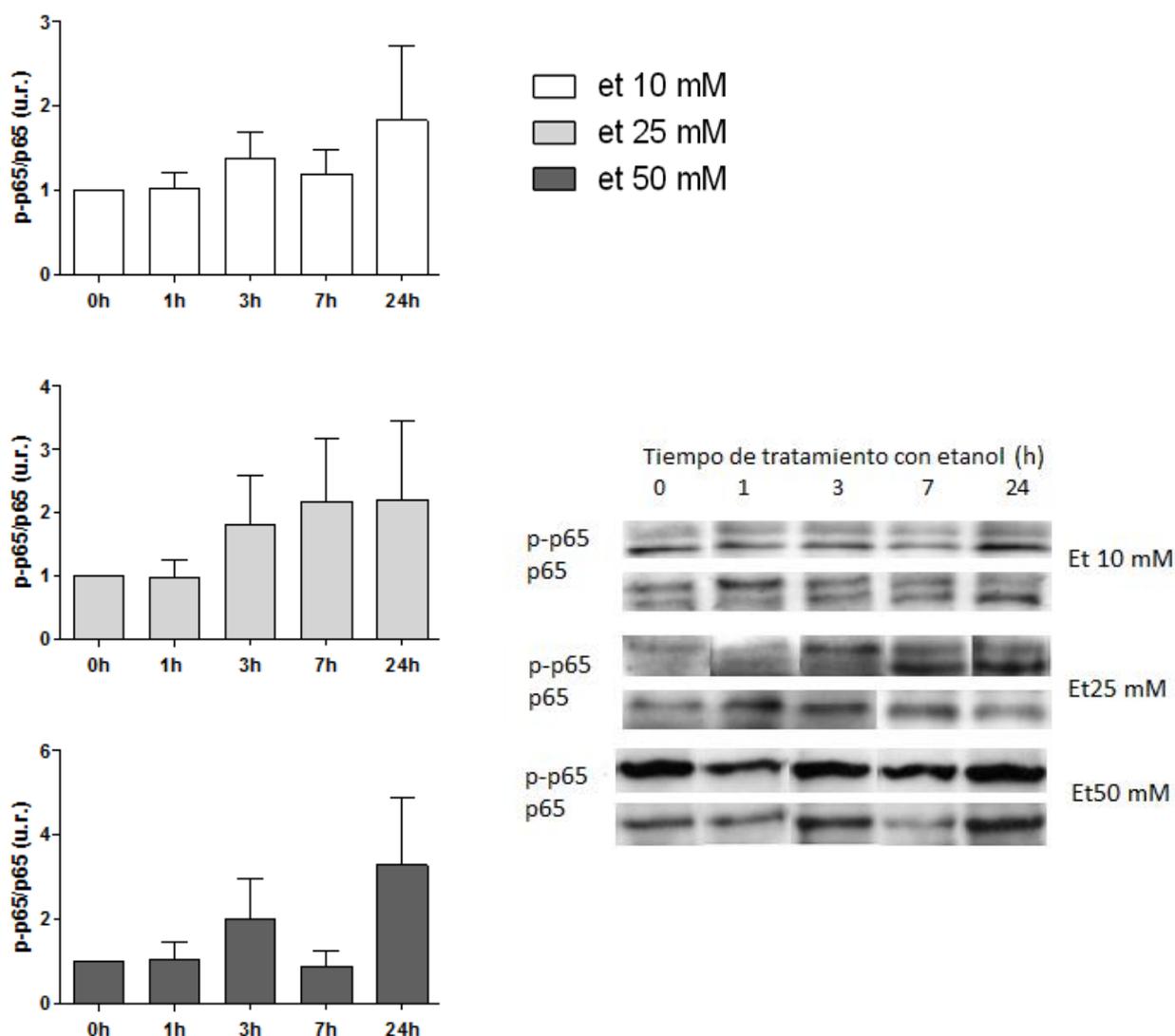


Figura 9. El etanol aumenta los niveles de expresión de la subunidad p65 fosforilada de NFκB en neuronas. La presencia de la subunidad p65 de NFκB se evaluó en extractos celulares. El tratamiento con etanol produce un aumento en la fosforilación de p65 en neuronas. Se muestra una inmunotransferencia representativa de los experimentos. Los resultados de la cuantificación reflejan la media \pm S.E.M.

4.3 Análisis de la apoptosis inducida por el etanol en las células.

Tras incubar los cultivos de astrocitos y neuronas con medios en el que se les añade el etanol, las células son sometidas a un estrés que desemboca en un aumento de la caspasa3 activa. La caspasa3 activada sufre una modificación estructural de la que se escinden dos subunidades, p17 y p12, de las cuales mediremos p17. La presencia de esta enzima tiene un importante efecto en la supervivencia de las células debido a su relación con el proceso de la apoptosis.

Los astrocitos sometidos al estrés del alcohol (Figura 10) presentan un aumento de la presencia de caspasa3 activa a tiempos cortos siendo perceptibles a tiempos de una hora. Este incremento es significativo para las 3 h en el caso de las concentraciones 10 y 50 mM. Una vez superadas las 3 h tras la estimulación los niveles de caspasa3 activa vuelven a decrecer aunque no se llegan a recuperar los niveles basales.

Para las tres concentraciones, los niveles alcanzados de caspasa3 activa en los astrocitos son bastante similares, por lo que no se observa una relación directa entre la cantidad de etanol utilizado con la caspasa3 activa detectada.

En el caso de las neuronas (Figura 11), la respuesta al tratamiento con etanol sigue una tendencia muy similar. Los cambios en la concentración de caspasa3 activa en la célula se aprecian también a tiempos cortos. La activación de la caspasa3 se hace menos notable para tiempos más largos, pero estos resultados pueden verse influenciados por el efecto de otras circunstancias simultáneas, como puede ser la necrosis. Del mismo modo, cuando la estimulación de las neuronas se realiza con una concentración de etanol de 50 mM, las neuronas podrían haber sufrido en mayor medida los efectos de la necrosis afectando a las señales que generarían las neuronas apoptóticas.

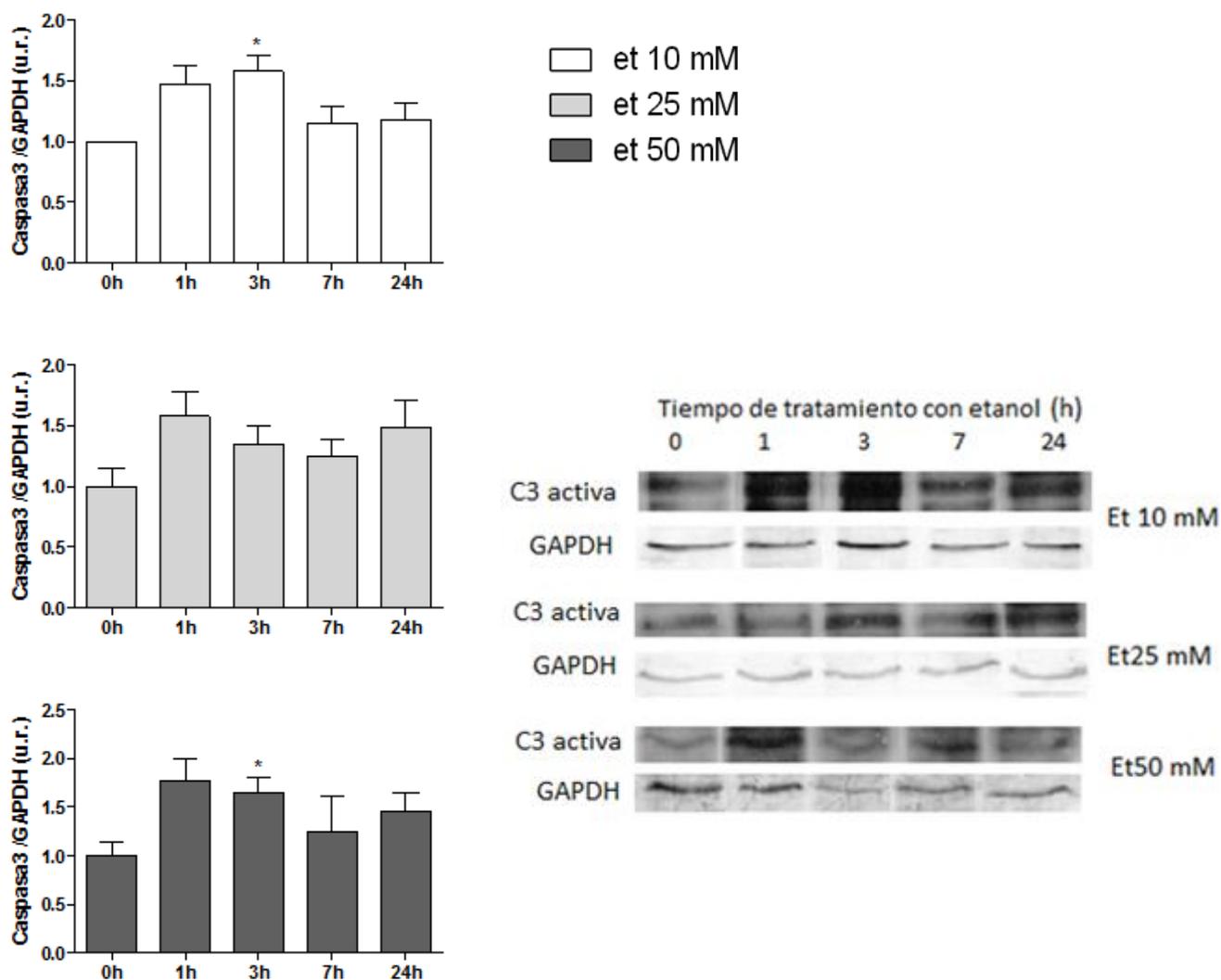


Figura 10. El tratamiento con etanol aumenta la expresión de Caspasa3 activa en astrocitos.

Las neuronas se incubaron con etanol (10, 25 y 50 mM) y se determinaron los niveles de caspasa3 activa en el intracelular mediante inmunotransferencia y las mismas membranas se reincubaron para detectar GAPDH como control de carga. Se muestra una inmunotransferencia representativa de los experimentos. Los resultados se presentan como la media \pm S.E.M. (* $p < 0.05$ respecto al valor del control).

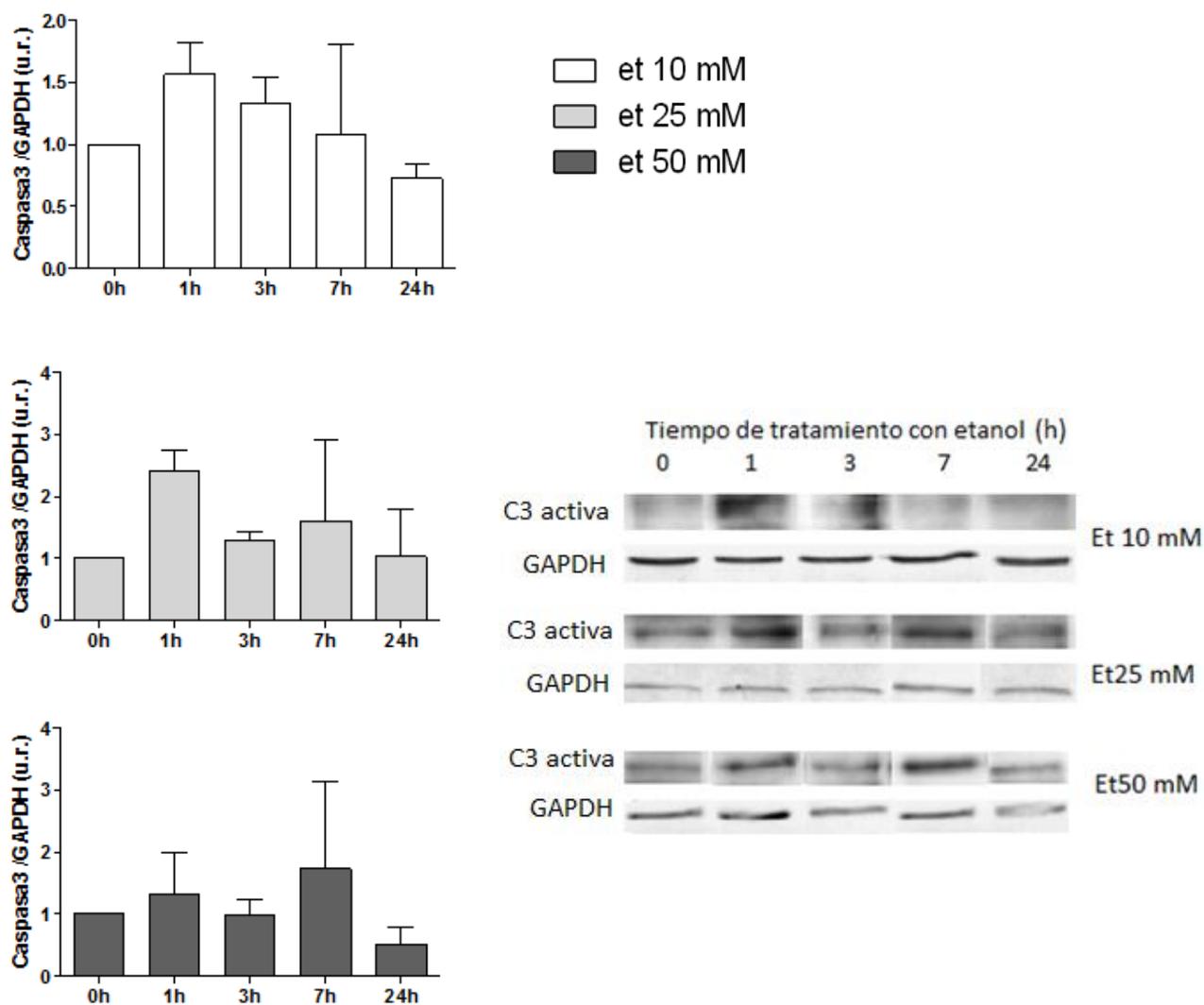


Figura 11. Expresión de la enzima Caspasa3 activa en neuronas tratadas con etanol. Las neuronas se incubaron con etanol (10, 25 y 50 mM) y se determinaron los niveles de caspasa3 activa en el intracelular mediante inmunotransferencia y las mismas membranas se reincubaron para detectar GAPDH como control de carga. Se muestra una inmunotransferencia representativa de los experimentos. Los resultados se presentan como la media \pm S.E.M.

Teniendo en cuenta todas las alteraciones inducidas por el etanol, se puede inferir una relación entre el proceso de apoptosis, la cascada inflamatoria y la liberación de HMGB1.

En el caso de las neuronas, se observa que a tiempos cortos se produce un aumento de la presencia de caspasa3 activa en la célula. Puesto que esta enzima está relacionada con procesos apoptóticos, esta respuesta puede desencadenar que se produzcan otras respuestas

a tiempos largos. De hecho, la activación de la caspasa3 se acompaña de la liberación de la proteína HMGB1 a la que se relaciona con la inflamación, aunque también tiene un papel en la regulación de la apoptosis. La liberación activa de HMGB1 es la que se inicia debido a la interacción de los receptores de membrana con productos como el etanol, pero esta liberación se realiza de forma lenta. Una aparición tan rápida en el medio extracelular de HMGB1 sería más propia de células necróticas que secretan esta proteína de forma pasiva. Además, la liberación de HMGB1 también es anterior a la activación de p-p65, lo cual podría explicarse por una liberación no controlada de HMGB1 que puede deberse a que se está produciendo necrosis y la salida al medio HMGB1 de forma pasiva.

En relación a los astrocitos, los primeros cambios detectados tienen que ver con un aumento de la proteína p65 fosforilada que ocurre de forma simultánea a la aparición de caspasa3 activa a niveles superiores a los detectados en condiciones basales. Estas proteínas contribuirían a desencadenar reacciones inflamatorias dando lugar a la liberación de HMGB1 que se observa en mayor medida a las 24 h. Ello sugiere que la liberación de HMGB1 en astrocitos esté mediada por la activación de TLR4, es decir, una liberación de HMGB1 controlada (activa).

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1 Liberación de HMGB1 en cultivos de astrocitos y neuronas estimulados con etanol

La proteína HMGB1 es tanto un factor nuclear como una proteína secretada. En el núcleo de la célula actúa como un factor de unión de la cromatina, en cambio, fuera de la célula, HMGB1 es un potente mediador de la inflamación (Scaffidi et al., 2002).

La exposición al etanol en cerebro desencadena un proceso mediante el cual se produce una liberación de la proteína HMGB1. Dicha liberación se produce como respuesta al daño generado por el etanol en las células y se puede dar de dos maneras, como resultado de un proceso activo estimulado por procesos de señalización celular o como resultado de la muerte celular. La liberación de HMGB1 al medio extracelular, que forma parte de los conocidos como patrones moleculares asociados al daño (DAMP), por parte de células necróticas favorece la neuroinflamación (Andersson y Tracey, 2011).

Algunos estudios actuales señalan que la expresión y liberación de HMGB1 en el cerebro inducida por la exposición al etanol están mediados principalmente por las neuronas (Kim *et al.*, 2008; Crews *et al.*, 2012). En base a estos estudios, se propuso estudiar si estos procesos se daban únicamente en neuronas, o si por el contrario también podían apreciarse estos cambios en astrocitos.

Nuestros resultados realizados en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de embriones de ratones demuestran que la exposición etanol en ambos tipos celulares desencadena la activación de un proceso que desemboca en la liberación al medio extracelular de la proteína HMGB1.

Existen diferencias reseñables entre ambos tipos celulares, como la concentración necesaria para producir una respuesta apreciable o el tiempo de exposición necesario tras la estimulación con el etanol para la liberación de HMGB1. Estas diferencias sugieren una mayor sensibilidad de las neuronas al etanol que a tiempos cortos de exposición ya muestran una liberación al medio extracelular de HMGB1.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que la liberación de HMGB1 no se restringe únicamente a las neuronas, sino que los astrocitos también participan activamente en esta

liberación y pueden tener un papel esencial los procesos neuroinflamatorios generados por el alcohol.

5.2 Vía de liberación de HMGB1: activa o pasiva.

La vía de liberación seguida por la célula, que lleva a la presencia de HMGB1 extracelular, aporta información relativa acerca de la presencia de necrosis y/o de restos celulares en las células estudiadas.

La liberación pasiva se inicia con el daño a la integridad de la célula, y se produce de forma rápida. La secreción activa se inicia con una señal de transducción a través de interacción con un receptor de la membrana plasmática, esta secreción es más lenta y la proteína HMGB1 liberada se encuentra acetilada, lo que puede facilitar su diferenciación respecto a la liberada pasivamente (Andersson y Tracey, 2011).

Estudios recientes muestran que la principal ruta de liberación de HMGB1 tras la estimulación con etanol es la vía activa (Quin et al., 2008; Crews et al., 2012). La secreción activa de la proteína implica que no se está produciendo necrosis neuronal, es decir, que la liberación es independiente de la muerte celular.

Sin embargo, a concentraciones elevadas de etanol de 100 mM, con una escasa relevancia fisiológica, es difícil pensar que no se produzca muerte neuronal. De hecho en el presente estudio solo se utilizan concentraciones de 50 mM, con mayor relevancia a nivel fisiológica, aunque no se ha determinado si se produce necrosis durante el proceso tras la estimulación con etanol. Otros experimentos anteriores muestran la presencia de esta necrosis neuronal *in vitro* e *in vivo* a concentraciones de etanol de 10, 50 y 100 mM (Alfonso-Loeches et al., 2014; Narashiman et al., 2011). La realización de experimentos que permitan esclarecer si se da o no necrosis en nuestras células sería de interés en estudios futuros.

A partir de los resultados obtenidos mediante la realización de las cinéticas de liberación de HMGB1, observamos que para concentraciones de etanol 50 mM, la liberación se produce a tiempos cortos tanto para astrocitos como para neuronas. En el caso de las neuronas, la liberación al medio se aprecia de manera casi inmediata a la estimulación incluso a bajas concentraciones de etanol. Esta liberación de HMGB1 se produce anteriormente a la detección del aumento de la caspasa3 activa, lo que sugiere que la forma de liberación ha sido de forma pasiva, es decir, se ha producido necrosis neuronal. La hipótesis de una liberación de HMGB1

en presencia de necrosis contrastaría con otras teorías propuestas en las que se defiende la liberación de HMGB1 únicamente por la vía activa (Zou y Crews, 2014).

5.3 El etanol induce un aumento de la muerte celular por apoptosis.

Para explorar la posibilidad de que el aumento de mediadores inflamatorios inducidos por el etanol en los cultivos de células pueda intervenir en la muerte celular, hemos determinado los niveles de caspasa3 activa, una proteasa implicada como mediador de la apoptosis en células de mamíferos. Los resultados muestran un aumento de la caspasa3 activa presente en neuronas y astrocitos posteriormente a la estimulación con el etanol. Estos resultados sugieren que los mediadores inflamatorios activados por el etanol pueden contribuir al daño celular, y que TLR4 juega un papel crucial en estos eventos.

La neurodegeneración, el daño cerebral y la neuroinflamación no son eventos asociados únicamente a la apoptosis (Kothakota *et al.*, 1997; Krajewska *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2008). Sin embargo nuestros resultados para cultivos de células estimuladas con etanol revelan que los procesos inflamatorios ocurren de forma simultánea a la activación de la caspasa3, lo que sugiere que se está produciendo un incremento de la muerte celular programada.

5.4 Papel de TLR4 en la respuesta al alcohol

La neuroinflamación está implicada en muchas enfermedades del cerebro. Descubrimientos anteriores indican que TLR4 contribuye a dicha neuroinflamación (Trendelenburg, 2008; Sims *et al.*, 2010). HMGB1 es un citoquina proinflamatoria que actúa activando IL-1 y TLRs (Sims *et al.*, 2010). Aunque la señalización de HMGB1 es compleja, existen hallazgos que prueban que la liberación de HMGB1 mediada por etanol, debido a su actividad como citoquina inflamatoria, activa los receptores de TLR4 en ratones con tratamiento crónico de etanol, en cerebros post mortem de alcohólicos y en cultivos de cerebro de rata (Quin *et al.*, 2008; Crews *et al.*, 2012). Esta expresión prueba la hipótesis de que la activación neuroinmune en cerebro de alcohólicos se ve afectada por la activación de las señales de peligro de TLR4 y HMGB1.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el consumo de altas cantidades de etanol en ratones adolescentes aumenta el nivel de la proteína HMGB1 citosólica en la corteza prefrontal de ratones. Para ello se analizaron los niveles de HMGB1 en fracciones nucleares y

citosólicas que habían sido aisladas. Esta mayor presencia de la proteína en el citosol evidencia que se ha producido una liberación activa, aunque no descarta la liberación pasiva, ya que no se ha medido la liberación al exterior de la célula. A partir de estos datos tampoco se puede saber si la liberación se ha dado en astrocitos o neuronas. También se encontró que los niveles de esta proteína permanecen altos en adultos jóvenes, sugiriendo la regulación persistente de señales DAMP (Montesinos *et al.*, 2015).

Usando cultivos de neuronas y astrocitos, hemos encontrado que el etanol aumenta HMGB1 en el medio. La estrategia seguida para conocer si esta liberación está relacionada con la activación de los receptores TLR4 fue medir la presencia de p65 fosforilado. Cuando se activa TLR4 se inicia una cascada de transducción en la que interviene NF- κ B. En este complejo proteico se encuentra adherido p65, que cuando se activa es fosforilado y translocado al núcleo desencadenando la síntesis de genes implicados en la respuesta inmune innata.

Los resultados obtenidos en astrocitos muestran que se ha producido un incremento significativo de la proteína p65 fosforilada tras la estimulación con etanol. Esto sugiere que la liberación de HMGB1 puede estar mediada por la activación de TLR4 y la posterior cascada de señalización.

Estos resultados demuestran que el etanol, en ausencia de endotoxinas, es capaz de promover, en astrocitos en cultivo, la activación de la subunidad p65 de NF- κ B que conllevaría a una posterior translocación al núcleo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en este laboratorio con astrocitos y microglía en cultivo (Blanco *et al.*, 2005; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009).

Sin embargo, según nuestros resultados, en neuronas la liberación de HMGB1 se ha observado a tiempos anteriores a la activación de TLR4. Esto podría sugerir que esa liberación se ha producido a través de la vía de liberación pasiva siendo independiente de TLR4. A tiempos posteriores si se ha detectado fosforilación de p65, además esta activación se ve acompañada de un aumento en la cantidad de HMGB1, lo que podría significar que a tiempos largos podría combinarse la liberación de la proteína de forma activa y pasiva simultáneamente. De hecho, la liberación pasiva de HMGB1 hace que TLR4 señalice, y aumente a su vez la liberación de HMGB1.

5.5 Perspectivas futuras

Para verificar que las alteraciones provocadas han sido debidas al papel realizado por los TLR4, sería interesante evaluar los efectos del etanol en células de animales deficientes para este receptor. Existen numerosos precedentes en los que se ha realizado esta comprobación para verificar los resultados. Se ha inhibido el papel de TLR4 mediante anticuerpos bloqueantes o iRNA, o utilizando células procedentes de animales deficientes en estos receptores. En estos casos, se eliminaron los efectos inflamatorios causados por el alcohol, incluyendo la liberación de citoquinas al medio celular (Blanco *et al.*, 2005; Fernandez-Lizarbe *et al.*, 2009; Alfonso-Loeches *et al.*, 2010).

Para el caso concreto de HMGB1 existen estudios en los que se demuestra que TLR4 interviene en la liberación al medio extracelular de esta citoquina. La utilización de siRNA para TLR4 muestra una reducción significativa de HMGB1 liberado al medio mediante la inducción de genes de citoquinas proinflamatorias (Zou y Crews, 2014).

Nuestros resultados también indican que se producen procesos apoptóticos que intervendrían directamente en la liberación de la proteína HMGB1 de forma activa, siendo dependiente de TLR4. Por tanto, al mismo tiempo, la eliminación del receptor TLR4 nos permitiría analizar si se observan los mismos efectos para ratones deficientes de TLR4. Para corroborar estas afirmaciones, estudios previos validaron esta hipótesis utilizando ratones deficientes de este receptor, en los que no se apreciaban cambios significativos en los niveles de activación de la caspasa3 (Alfonso-Loeches *et al.*, 2010). Además, sería interesante realizar estudios complementarios mediante citometría de flujo que nos permitiesen discernir claramente el papel que juegan la necrosis y la apoptosis en la liberación de HMGB1.

La acetilación de HMGB1 en su liberación es otro aspecto clave para elucidar si la liberación producida se ha dado de forma activa o pasiva, puesto que HMGB1 únicamente se encontrará acetilada en el caso de que se haya producido una liberación activa.

Un estudio reciente en el que se utilizaron cultivos organotípicos del hipocampo de rata, sugiere que la inhibición de las histonas deacetilasas neuronales, provocan una movilización provocada por el etanol de HMGB1 desde el núcleo al citoplasma y posteriormente al medio extracelular, encontrándose dicha proteína en estado acetilado (Zou y Crews, 2014).

Sin embargo, aunque los procesos epigenéticos pueden contribuir al aumento de HMGB1, se requieren experimentos en mayor profundidad para demostrar estos mecanismos

moleculares. Por tanto, sería interesante realizar estos estudios enfocados a determinar si la liberación de HMGB1 se ha producido cuando se encontraba en estado acetilado o no.

5.5 Conclusiones

-El etanol induce una liberación de HMGB1 tanto en neuronas como en astrocitos con algunas diferencias.

- En neuronas, el etanol (10, 25, 50 mM) causa una liberación de la HMGB1 que ocurre principalmente a tiempos cortos (1 h) y posteriormente disminuye con el tiempo, mientras que en astrocitos la liberación de la HMGB1 al medio aumenta progresivamente con el tiempo de incubación alcanzando su máximo a las 24 h de incubación

-Nuestros resultados demuestran que en astrocitos el etanol, en ausencia de endotoxinas, es capaz de activar la vía de señalización de los TLR4/NFκB activación de la subunidad p65 de NF-κB en el núcleo de la célula.

- En neuronas, la liberación de HMGB1 a tiempos cortos sugiere que la liberación de HMGB1 ocurre de forma pasiva, independiente del TLR4, aunque a tiempos largos se ha detectado fosforilación de p65, lo que sugeriría que a tiempos largos podría combinarse la liberación de la proteína de forma activa y pasiva simultáneamente.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C (2010) Pivotal role of tlr4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 30(24): 8285–8295
- Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C (2014) Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Front Cell Neurosci* 8:216.
- Allen N, Barres B (2009) Glia – more than just brain glue. *Nature* 457, 5, 675-677
- Altamirano J, Bataller R (2011) Alcoholic liver disease: pathogenesis and new targets for therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 8(9):491-501
- Andersson, U., Tracey, K.J. (2011) HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 139–162.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estévez AG, Beckman JS (2004) A role of astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateras sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47(1-3):263-74.
- Battaglia C, Battaglia C, Mancini F, Nappi RE, Paradisi R, Venturoli S (2011) Moderate Alcohol Intake, Genital Vascularization, and Sexuality in Young, Healthy, Eumenorrheic Women. A Pilot Study. *J Sex Med* 8: 2334–2343
- Bautista A.P., and Wang E. (2001) Chronic ethanol intoxication enhances the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and macrophage inflammatory protein-2 by hepatocytes after human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 vaccination. *Alcohol*, 24, 35-44.
- Beutler B. (2000) TLR4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 12:20-6
- Blanco AM, Valles SL, Pascual M, 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(10):6893–6899.
- 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.
- Boe, D.M., Nelson, S., Zhang, P., Quinton, L. and Bagby, G.J. (2003) Alcohol-induced suppression of lung chemokine production and the host defense response to *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res*, 27, 1838-1845.
- Buchanan M, Hutchinson M, Watkins L, Yin H (2010) Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *Neurochem* 114(1):13-27
- Bujanda MD. (2000) The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *The American Journal of Gastroenterology* 95:3374–3382

- Chen Y, Cheng H, Tram K, Zhang S, Zhao Y, Han L, Chena Z, Huan S (2013) A paper-based surface-enhanced resonance Raman spectroscopic (SERRS) immunoassay using magnetic separation and enzyme-catalyzed reaction. *Analyst* 138, 2624
- Cook, R.T., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J., Vandersteen, D., LaBrecque, D.R. and Cook, B.L. (1995) Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, 19, 555-563.
- Cook, R.T., Zhu, X., Coleman, R.A., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J., Ray, N.B., LaBrecque, D.R. and Cook, B.L. (2004) T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol*, 33, 175-181.
- Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, Zou J (2012) High Mobility Group Box 1/Toll-like Receptor Danger Signaling Increases Brain Neuroimmune Activation in Alcohol Dependence. *Biological psychiatry* 38:45-58
- Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, Zou J (2013) High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biological Psychiatry* 73:62–72
- Crews FT, Zou J, Qin L (2011) Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Bain Behav Immun* 25 Suppl 1: S4–S12
- Dietrich J, Lacagnina M, Gass D, Richfield E, Mayer-Proschel M, Noble M, Torres C, Proschel C (2005) EIF2B5 mutations compromise GFAP astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat Med* 11:277–283
- Dunne A, O'Neill LA (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci* 355: 234-256
- Evankovich J, Cho SW, Zhang R, Cardinal J, Dhupar R, et al. (2010) High mobility group box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity. *Biol Chem* 285: 39888–39897
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M. and Guerri, C. (2009) Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J immunol.*
- 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.
- Gao HM, Zhou H, Zhang F, Wilson BC, Kam W, Hong JS (2011) HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *J Neurosci.* 31(3):1081-92
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, et al. (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports* 3: 995–1001
- Ge, X., Antoine, D.J., Lu, Y., Arriazu, E., Leung, T.M., Klepper, A.L., Branch, A.D., Fiel, M.I., Nieto, N. (2014) High mobility group box-1 (HMGB1) participates in the pathogenesis of alcoholic liver disease (ALD). *J. Biol. Chem.* 289, 22672–22691.
- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140(6):918-34
- Griffiths M, Neal JW, Gasque P (2007) Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* 82:29-55.
- Guerrini, I., Thomson, A.D. and Gurling, H.M. (2009) Molecular genetics of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol*, 44, 166-170.
- Guo R., Ren J. (2010) Alcohol and acetaldehyde in public health: from marvel to menace. *Int J Environ Res Public Health* 7:1285-1301

- Guzzo-Merello G, Cobo-Marcos M, Gallego-Delgado M, Garcia-Pavia P. (2014) Alcoholic cardiomyopathy. *World J Cardiol* 6(8): 771-781
- Hanisch, U.K. and Kettenmann, H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-1394.
- Harper, C. and Matsumoto, I. (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol*, 5, 73-78.
- Harris HE, Andersson U, Pisetsky DS (2012) HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat Rev Rheumatol* 8: 195–202.
- Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A. and Antel, J.P. (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol*, 175, 4320-4330.
- Jung, D.Y., Lee, H., Jung, B.Y., Ock, J., Lee, M.S., Lee, W.H. and Suk, K. (2005) TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J Immunol*, 174, 6467-6476.
- Kaufman SE, Kaye MD. (1978) Induction of gastroesophageal reflux by alcohol. *Gut* 19:336-338.
- Kawai, T. and Akira, S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 13, 460-469.
- Kim JB, Lim CM, Yu YM, Lee JK (2008) Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain. *J Neurosci Res* 86: 1125–1131
- Kim JB, Sig CJ, Yu YM, Nam K, Piao CS (2006) HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *J. Neurosci.* 26:6413–21
- Kim, S.U. and de Vellis, J. (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*, 81, 302-313.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR (2009) Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 32:160–169
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Sci* 278:294–298.
- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57:1605–1613
- Kril JJ, Halliday GM (1999) Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? *Prog Neurobiol* 58:381-387.
- Kwak M., Shin J. (2013) Current Understanding of HMGB1-mediated Autophagy. *J Bacteriol Virol.* 43 (2):148-154.
- Lau, A.H., Abe, M. and Thomson, A.W. (2006) Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, 79, 941-953.
- Lee S., Kwak M., Kim S., Shin J (2014) The Role of High Mobility Group Box 1 in Innate Immunity. *Yonsei Med J* 55(5):1165-1176
- Lotze MT, Tracey KJ (2005) High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immun* 5: 331–342

- Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Bellerose, G., Kodys, K., Romics, L., Nizamani, R. and Szabo, G. (2002) Acute alcohol inhibits the induction of nuclear regulatory factor kappa B activation through CD14/toll-like receptor 4, interleukin-1, and tumor necrosis factor receptors: a common mechanism independent of inhibitory kappa B alpha degradation? *Alcohol Clin Exp Res*, 26, 1609-1614.
- Mao XR, Moerman-Herzog AM, Chen Y, Barger SW (2009) Unique aspects of transcriptional regulation in neurons--nuances in nf-kappab and sp1-related factors. *J Neuroinflammation* 6:16.
- Markiewicz I, Lukomska B (2006) The role of astrocytes and pathology of the central nervous system. *Neurobiol* 66: 343-358
- Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, et al. (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 16: 413–419]
- 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.
- Min HJ, Ko EA, Wu J, Kim ES, Kwon MK, Kwak MS (2013) Chaperone-like activity of high-mobility group box 1 protein and its role in reducing the formation of polyglutamine aggregates. *J Immunol* 190:1797-806
- Montesinos J, Pascual M, Pla A, Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Guerri C. (2015) TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun.* 45:233-44
- Narasimhan M, Mahimainathan L, Rathinam ML, Riar AK, Henderson GI (2011) Overexpression of Nrf2 protects cerebral cortical neurons from ethanol-induced apoptotic death. *Mol Pharmacol* 80:988–999.
- 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.
- Okvist A, Johansson S, Kuzmin A, Bazov I, Merino-Martinez R, Ponomarev I, Mayfield RD, Harris RA, Sheedy D, Garrick T, Harper C (2007) Neuroadaptations in human chronic alcoholics: Dysregulation of the nf-kappab system. *PLoS One* 2 (9):e930.
- Owens T, Babcock AA, Millward JM, Toft-Hansen H (2005) Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 48:178-184.
- Pfriege FW. Role of glia in synapse development. *Curr Opin Neurobiol.* 2002;12:486-490
- Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT (2008): Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 5:10.
- Quinton, L.J., Nelson, S., Zhang, P., Happel, K.I., Gamble, L. and Bagby, G.J. (2005) Effects of systemic and local CXC chemokine administration on the ethanol-induced suppression of pulmonary neutrophil recruitment. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 1198-1205.
- Rao MS, Noble M, Mayer-Pröschel M. A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3996-4001.
- Rivest S (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol* 9:429-439
- Rondón-Barragán (2009) Toll-like receptors in fish: the beginning divergence. *In Vet* 11(1): 15-30
- Saeed, R.W., Varma, S., Peng, T., Tracey, K.J., Sherry, B. and Metz, C.N. (2004) Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. *J Immunol*, 173, 6376-6383.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418:191–195

- Shin-Ae Lee,¹ Man Sup Kwak,¹ Sol Kim,¹ and Jeon-Soo Shin (2014) The Role of High Mobility Group Box 1 in Innate Immunity. *Yonsei Med J.* 55(5):1165-76.
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ (2010): HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28:367–388.
- Song, K., Coleman, R.A., Zhu, X., Alber, C., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J. and Cook, R.T. (2002) Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol*, 72, 1109-1116.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M (2002) Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 513:87- 113.
- Streit, W.J., Mrak, R.E. and Griffin, W.S. (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, 1, 14.
- Stros M. (2010) HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1799:101-13
- Szabo, G. (1999) Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*, 34, 830-841.
- Szabo, G. and Mandrekar, P. (2009) A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res*, 33, 220-232.
- Szabo, G., Dolganiuc, A., Mandrekar, P. and White, B. (2004) Inhibition of antigen-presenting cell functions by alcohol: implications for hepatitis C virus infection. *Alcohol*, 33, 241- 249.
- Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol* 213:114 –121.
- Trendelenburg G (2008) Acute neurodegeneration and the inflammasome: Central processor for danger signals and the inflammatory response. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:867–881.
- Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont LI, Rubin E. (1989) The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 320: 409 – 415
- 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.
- Vetreno RP, Crews FT (2012). Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist hmgb1 and toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neurosci* 226:475–488.
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Franceschi, D., Fowler, J. S., Thanos, P. K., Scherbaum, N., Felder, C. A. (2000). Regional brain metabolism during alcohol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res.* (6):822-9.
- Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P (2010) Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(28):12611-6
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ (2005) The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 78: 1–8.
- Yang M, Min K, Joe E (2007) Multiple mechanisms that prevent excessive brain inflammation. *JNeurosci Res* 85(11):2298-305
- Youn JH, Shin JS. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J. Immunol.* 177:7889–97
- Zou J, Crews F (2014) Release of Neuronal HMGB1 by Ethanol through Decreased HDAC Activity Activates Brain Neuroimmune Signaling. *PLoS One.* 9(2): 234-254