

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Posible papel de los exosomas en los efectos del alcohol en el cerebro adolescente**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA**

ALUMNO/A: Francesc Ibáñez Cabanes

TUTOR/A: Consuelo Guerri

TUTOR/A: Máximo Ibo

*Curso Académico: 2016-2017*

**VALENCIA, 7 de Marzo del 2017**

# Índice

Introducción	3
Objetivos	4
Materiales y Métodos	5
Resultados	8
Discusión de los resultados	20
Conclusiones	20
Bibliografía	21
Anexos	24

## 1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud en su informe del 2014 (OMS o WHO, 2014) indica que el consumo y abuso de alcohol se considera uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de diferentes patologías, participando en un 6 a 9% de todas las enfermedades mentales, neurológicas y las asociadas al abuso de sustancias (WHO 2014). En los últimos años, se ha hecho popular entre los jóvenes el consumo tipo *binge drinking* o *atración* que consiste en la ingesta de elevadas cantidades de alcohol durante un corto periodo de tiempo. Además, el abuso de alcohol con el patrón de consumo tipo “*atración*” se inicia a edades muy tempranas (~15 años,) y tiene una alta prevalencia (16 %) en muchos países europeos y americanos (WHO, 2014). Este patrón de consumo se define como 5 copas para los chicos y 4 copas para las chicas, durante 2 horas (NIAAA, 2016) o cuando los niveles de alcoholemia en sangre y en cerebro sean superiores a 80 mg/dl (0.08%), (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism o NIAAA, 2016).

En España la práctica del botellón se ha establecido desde hace muchos años en la población joven, en donde el 26% de los chicos y 37% de las chicas (entre los 14 y 26 años) ha admitido realizar este tipo de práctica habitualmente [26].

Diversos estudios han demostrado que el consumo de alcohol, en forma de *atración*, durante los fines de semana, puede afectar la maduración del cerebro adolescente en los jóvenes, y alterar procesos importantes tales como memoria y aprendizaje, capacidad de mantener la atención y las tareas ejecutivas, conllevando al fracaso escolar [25].

Hay que destacar, que la adolescencia es un periodo de transición entre niñez y el periodo adulto, donde el cerebro pasa por gran número de cambios y de remodelaciones, aumentando su conectividad neuronal y la plasticidad sináptica hasta llegar al cerebro adulto [25, 26]. La corteza cerebral es la región encargada de coordinar los procesos del pensamiento, el procesamiento de la percepción, la comprensión y a tratar la información, lo que la convierte en una región vulnerable a los efectos deletéreos del alcohol en los individuos adolescentes. De hecho, se ha visto que, funciones que se encuentran reguladas por esta región, se ven alteradas en jóvenes que han ingerido alcohol tipo *botellón* en edades tempranas.

Aunque los mecanismos de la neurotoxicidad del alcohol no están bien establecidos, trabajos de los últimos años indican la participación de la respuesta del sistema inmunitario en cerebro [1, 2, 3]. Las células gliales, y en particular la astroglia y microglia son células del sistema inmunitario en cerebro, capaces de responder frente a patógenos, restos celulares o estrés, y producir inflamación [6]. Esta respuesta se produce mediante la activación de diferentes receptores del sistema inmunitario, incluyendo los receptores *Toll-like* o *TLRs*. Aunque la inflamación puede ser beneficiosa, si se mantiene durante un período de tiempo demasiado largo puede producir daños en el cerebro. Resultados del laboratorio de Patología Celular del CIPF han demostrado etanol es capaz activar a los receptores *Toll-like* o TLR4, e inducir una respuesta neuroinflamatoria, a través de la activación de cascadas de señalización que conllevan en la producción de mediadores y citoquinas proinflamatorias [15]. Este ambiente proinflamatorio, mantenido durante un largo periodo de tiempo, puede

producir gliosis, desmielinización y daños cerebrales, que pueden afectar al comportamiento de los sujetos. Los TLR4, se expresan en células gliales, como astrogía y microglía, y cuyo ligando específico es el lipopolisacárido, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas [7]. En los últimos años se ha demostrado la participación de los receptores TLRs y de procesos inflamatorios en varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple [22].

Los mecanismos por los cuales el etanol altera la funcionalidad cerebral durante la adolescencia y consecuentemente la conducta no están bien establecidos. Recientemente se han descrito nuevas funciones para un tipo de microvesículas denominadas *exosomas*, como mediadores intercelulares y como transportadores de sustancias de desecho [10]. Los *exosomas* son vesículas formadas a partir de la invaginación de la membrana de los cuerpos multivesiculares endosomales, en cuyo interior se pueden encontrar proteínas, ARN, microARN y lípidos entre otras moléculas. Una vez que el exosoma alcanza su maduración, son liberados al espacio intercelular, por el cual viajarán hasta ser captados por otras células que internalizarán su contenido [11, 29]. La función de los exosomas es importante para el control de las funciones fisiológicas entre las células, pero también se ha demostrado su importancia como mecanismo de comunicación en situaciones de estrés o daño celular. Por tanto, en el presente trabajo se estudiará el papel de los exosomas y su transporte de sustancias tóxicas o moléculas bioactivas implicadas en inflamación (proteínas, citoquinas, quemoquinas, receptores, kinasas, etc.) en los efectos del alcohol en el cerebro adolescente y el papel de los exosomas astrogiales en estos procesos. También se evaluará el papel de los receptores TLR4 en estos mecanismos.

## 2. Objetivos

Como ya se ha demostrado previamente en este grupo, el cerebro adolescente es muy vulnerable a los efectos tóxicos del etanol, siendo capaz de inducir una respuesta inmune inflamatoria a través de los receptores TLR4 [8]. Por tanto, la hipótesis de este trabajo es “*si la exposición intermitente a altas cantidades de etanol durante el periodo adolescente es capaz de modificar el contenido en los exosomas en el cerebro de animales adolescentes, y si los procesos inflamatorios, a través del receptor TLR4, están implicados en estos procesos*”.

Para ello, se han abordado los siguientes objetivos:

- 1.- Utilizando ratones silvestres (o wild type, WT) y ratones deficientes (o knock-out, KO) en el receptor TLR4 (TLR4-KO) tratados o no de forma intermitente con etanol durante la adolescencia, se purificarán exosomas de la corteza cerebral y se realizará un análisis proteómico de estos en los 4 grupos estudiados.

2.- Utilizando cultivos primarios de astrocitos de la corteza cerebral de animales WT y TLR4-KO se analizará la liberación de exosomas producida tras una dosis fisiológica de etanol (50 mM) en las células en cultivo durante 24 horas.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Modelo animal

Se han utilizado ratones C57BL/6, tanto WT como deficientes para la proteína TLR4. Dichos ratones fueron sometidos a un modelo establecido de tratamiento con etanol en atracón de forma intermitente durante la etapa adolescente de los animales. El patrón de intermitencia fue desarrollado imitando el abuso de alcohol al que se someten los adolescentes durante los fines de semana [26]. Se inyectaron 8 dosis mediante vía intraperitoneal (3 g/kg, diluido al 25% en suero fisiológico). Se inyectó una dosis diaria durante dos días, luego se dejó descansar al ratón durante dos días más y se volvió a inyectar, siguiendo este patrón hasta alcanzar las 8 dosis. Al día siguiente de finalizar el tratamiento el ratón fue sacrificado, y a continuación se procedió a la extracción del tejido perteneciente a la corteza cerebral. Todos los animales han sido criados bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad (60%), luz (fotoperiodo de 12 horas de duración) y en un ambiente libre de patógenos.

#### 3.2 Cultivo celular

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos a partir de ratones recién nacidos pertenecientes a la cepa previamente nombrada. Se realizó un cultivo por cada camada nacida, siempre y cuando los ratones neonatos no pasaran de las 24 horas después de su nacimiento. Una vez que las crías son sacrificadas, la extracción de las cortezas cerebrales se realiza en campana de flujo laminar vertical en condiciones de esterilidad.

Una vez que las cortezas cerebrales fueron diseccionadas, éstas fueron disgregadas mediante aspiración con una pipeta de vidrio en 10 ml de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y se depositaron en un tubo de vidrio. A continuación se agitó dicho recipiente en un vórtex durante 1 min para eliminar las neuronas. El contenido del tubo fue filtrado en una malla estéril con un tamaño de poro de 80 µm. El extracto fue entonces mezclado con medio DMEM complementado con suero bovino fetal (20%), penicilina/estreptomina (1%, 100 unidades/ml), funguizona (1%, 2,5µg/ml), glutamina (1%, 2mM) y glucosa (1%, 1g/l) y sembrado en 6 placas de 15 cm de diámetro.

Dichas placas fueron incubadas en un incubador Heracell con las siguientes condiciones: 37°C de temperatura, CO<sub>2</sub> al 5% (siendo el 95% restante aire). Dicho medio fue cambiado a los 4 días, por un medio de las mismas características y otra vez a los 7 y 10 días de crecimiento por un medio de diferenciación que consta de suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomina al 1% (1000 unidades/ml), funguizona al 1% (2,5µg/ml) y glutamina al 1% (2mM) y DMEM al 86%. Al día 14, el medio de

cultivo fue sustituido por un medio sin suero bovino fetal y suplementado con BSA (1mg/ml).

Ese mismo día se realizó el estímulo con etanol a la mitad de las placas (3 placas control y 3 placas con estímulo de etanol de 50 mM durante 24 h). Al día siguiente, se recogió el medio de cultivo para el inicio del protocolo de purificación de exosomas a partir de cultivo primario de astrocitos.

### 3.3 Purificación de exosomas

#### 3.3.1 Purificación de exosomas a partir de cultivo primario de astrocitos

Una vez que se recolectó el medio de cultivo mediante pipeta, se depositaron en tubos específicos para ultracentrífuga.

Los tubos se sometieron a una primera ultracentrifugación a 17000 g (10 minutos, 4°C) en la ultracentrífuga Optima L-100XP Beckman Coulter, utilizando un rotor 50.2 Ti. Pasado este tiempo, se recogieron los tubos, se recuperó el sobrenadante, que tras ser filtrado mediante filtros de jeringa con un poro de 0,2 µm, fue depositado de nuevo en tubos nuevos de ultracentrífuga, y se centrifugó a 100000 g (2 horas, 4°C). De forma previa a la ultracentrifugación, los tubos fueron equilibrados en balanza para no tener problemas de descompensación [12, 13].

Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado (donde se encontraba la fracción enriquecida en exosomas) con PBS frío. Para asegurarnos que hay extracto proteico en la muestra, se realizó una cuantificación de proteína utilizando el método descrito en el apartado 3.4.2.

#### 3.3.2 Purificación de exosomas a partir de corteza cerebral

Para la purificación de exosomas a partir de tejido fresco se utilizaron ratones adolescentes sometidos al modelo previamente descrito. Dichos ratones fueron sacrificados mediante dislocación y posteriormente los cerebros fueron sometidos a la disección de la corteza cerebral.

Se cogió la corteza cerebral de un hemisferio por animal, a la que fue añadida 3 ml de una disolución que contenía 20 unidades/ml de papaína, disuelta en medio HIBERNATE (La disolución fue realizada en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar). Se dejaron incubando en un baño a 37°C durante 15 minutos. Al finalizar este tiempo, se añadieron 6 ml de HIBERNATE frío para parar la reacción de la papaína y se homogenizó con pipeta de vidrio. La solución homogeneizada fue filtrada con una malla estéril con un tamaño de poro de 80 µm, y posteriormente fue filtrada otra vez pero utilizando filtros de jeringa de un tamaño de poro de 0,2 µm.

El extracto resultante fue centrifugado a 300 g (10 minutos, 4 °C), tras la cual se desechó el precipitado y se obtuvo el sobrenadante, que volvió a ser centrifugado pero esta vez a 2000 g (10 minutos, 4°C). Estas centrifugaciones se realizaron en una centrífuga LED GmbH (Thermo Fisher D-3720). Se desechó el precipitado nuevamente y se recuperó el sobrenadante en tubos de ultracentrífuga. Estos volúmenes fueron sometidos a una ultracentrifugación a 10000 g (30 minutos, 4°C) tras la cual se desechó el precipitado y se recuperó el sobrenadante, que fue sometido otra vez a ultracentrifugación a 100000 g (70 minutos, 4°C), descartando esta vez el sobrenadante

y recuperando el precipitado. Ese precipitado fue resuspendido en 30 ml de PBS frío y sometido a una ultracentrifugación de 100000 g (70 minutos, 4°C).

Paralelamente, se realizaron gradientes de sacarosa, tantos como muestras hubiera. Dichos gradientes debían estar formados por 6 fases de distintas concentraciones de sacarosa (2M, 1,65M, 1,3M, 0,95M, 0,6M y 0,25M). Para hacer el gradiente se fueron echando fracciones de 1,7 ml por cada solución, empezando en la base del tubo por la de mayor concentración, 2M, hasta llegar a la de 0,25M.

Una vez terminada la anterior ultracentrifugación, el precipitado se resuspendió en la solución de sacarosa 0,95M, que fue añadida en los tubos de gradiente después de la dilución de 1,3M y antes de la dilución 0,6M. Una vez finalizados los gradientes, los tubos se introdujeron en un rotor oscilante (SW 40 Ti) y se pusieron en la ultracentrífuga a 200000 g (16 horas, 4°C).

Pasado este tiempo, se recogen las fracciones donde se encuentran los exosomas purificados, que son las dos fracciones intermedias entre 0,6M y 0,95M. Estas fracciones se lavaron con PBS frío, y de nuevo se centrifugaron en la ultracentrífuga a 100000 g (70 minutos, 4°C). El precipitado resultante (conteniendo los exosomas) se resuspendió en 200 µl de PBS [12, 13].

### 3.4 Cuantificación de los exosomas

#### 3.4.1 Análisis por Western Blot

Con el fin de observar proteínas exosomales y comprobar diferencias cuantitativas entre los diferentes grupos, se llevó a cabo un análisis por Western Blot sobre las muestras conteniendo exosomas purificados.

Para ello, Las muestras fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 15% y transferidas a membranas de polivinilideno, sobre las cuales se incubaron los siguientes anticuerpos: anti CD9 (rabbit), anti CD63 (rabbit) y anti CD81 (mouse) (Santa Cruz Biotechnology, USA). La detección se realizó utilizando anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa y el kit ECL Plus (Pierce, Thermofisher).

Tras este proceso, se cuantificaron los resultados utilizando el software de análisis de imagen ImageJ [25].

#### 3.4.2 Cuantificación de proteína por espectrofotometría

Tras los procesos de purificación de exosomas (tanto los obtenidos de tejido cerebral como de cultivo de astrocitos) se realizó un ensayo con el fin de determinar la presencia/ausencia de proteínas en el extracto y su concentración proteica. Para ello, se utilizó el kit basado en el reactivo de BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermofisher). La reacción colorimétrica fue procesada en un espectrofotómetro donde fueron obtenidas las absorbancias relativas a cada muestra.

#### 3.4.3 Análisis del tamaño de los exosomas

El tamaño de los exosomas liberados fue analizado mediante un NanoSight NS300, en el que se obtuvo el tamaño y cantidad de exosomas liberados en cada condición. Al ser partículas en movimiento, el nanosight mide diámetro hidrodinámico, por lo que las medidas obtenidas no son tan exactas como las obtenidas por microscopia electrónica y pueden inferir cierto error.



#### 3.4.4 Análisis proteómico

El estudio proteómico presente en los exosomas obtenido de las cortezas cerebrales de ratón, fue llevado a cabo por el Servicio de proteómica de la Universidad de Valencia (ProteoRed, PRB2-ISCII). La interacción de las distintas proteínas obtenidas por espectrometría de masas fue analizada por diferentes plataformas de transcriptómica [4, 18, 24].

#### 3.4.5 Análisis mediante microscopia electrónica de transmisión

Las muestras de exosomas en PBS fueron procesadas para ser analizadas por el servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Los exosomas tras ser fijados con formaldehído y glutaraldehído, fueron incubados con una solución de oxalato de uranilo y posteriormente observadas al microscopio.

#### 3.4.6 Ensayo de actividad acetilcolinesterasa

La liberación de exosomas también fue medida mediante un ensayo de actividad acetilcolinesterasa, enzima presente en dichas vesículas. Para ello, se añadieron 30  $\mu$ l de fracción enriquecida en exosomas resuspendida en tampón fosfato a una placa multipocillo de 96. A continuación, sobre los pocillos que contenían los exosomas, se añadieron 250  $\mu$ l de una disolución 1,25 mM de acetiltiocolina y 0,1 mM de DTNB (5-5'-di-thio-bis (2 ácido nitrobenzoico)). Se monitorizaron los cambios en absorbancia a 412 nm durante 30 minutos a 37°C [12, 13].

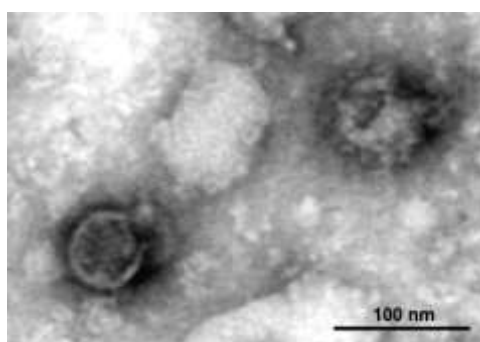
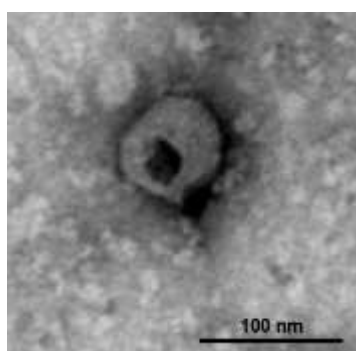
#### 3.4.7 Análisis estadístico

Todos los resultados de los análisis fueron sometidos a tests de la T utilizando el software estadístico Graphpad Prism 5.

## 4. Resultados

### **El etanol induce una mayor liberación de exosomas en células astrogliales de ratones WT, y además se observa una mayor cantidad del receptor TLR4 en los exosomas procedentes de los cultivos tratados con etanol.**

Los exosomas son vesículas intraluminales que se encuentran dentro de cuerpos multivesiculares y son liberadas al medio extracelular cuando dichos cuerpos se fusionan con la membrana plasmática [10]. Se realizaron cultivos primarios de astrocitos, y tras someter el medio de cultivo a diferentes ultracentrifugaciones, mediante microscopía electrónica pudimos observar que los atrociotos eran capaces de liberar exosomas, puesto que el tamaño de las microvesículas obtenidas era de  $\sim$ 70 nm (Fig. 1)

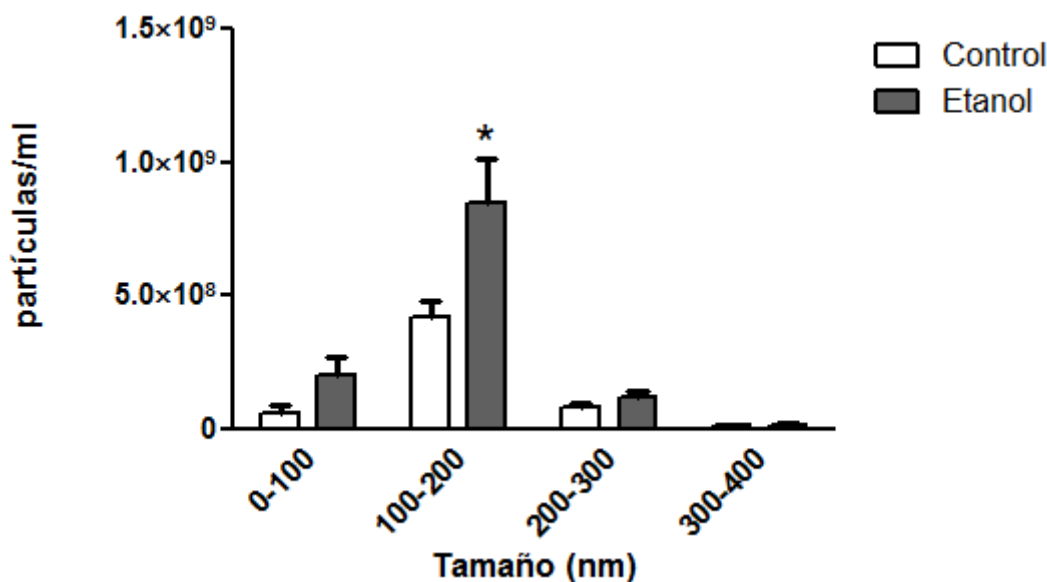




**Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de exosomas aislados a partir del medio de cultivo de astrocitos.**

Clásicamente se asociaba esta liberación con la eliminación por parte de la célula de elementos de desecho como proteínas no deseadas, pero últimamente se ha observado que pueden tener una función de comunicación entre células mediante el transporte de proteínas [10, 11], especialmente de proteínas involucradas en la interacción entre células, ARN, micro ARN y lípidos.

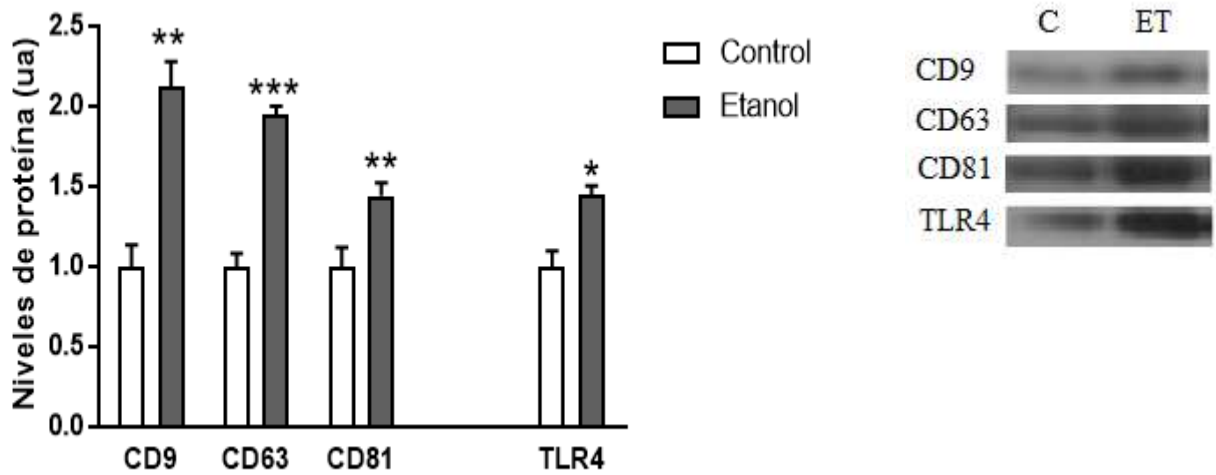
Posteriormente se estudió el efecto del etanol (50 mM) durante 24 horas en cultivos primarios de astrocitos procedentes de la corteza cerebral de animales WT. Los sobrenadantes de los cultivos con o sin etanol se sometieron a ultracentrifugación y el precipitado se obtuvo fracciones enriquecidas en exosomas. Dichas fracciones fueron analizadas mediante NanoSight con el fin de determinar la cantidad de vesículas liberadas por los astrocitos en diferentes intervalos de tamaño de partículas. (Nótese que la técnica utilizada analiza el diámetro de las partículas en movimiento, denominado diámetro hidrodinámico, y por tanto el diámetro obtenido es superior (100-200 nm) al obtenido por microscopía electrónica). En la Figura 2 podemos observar que el número de microvesículas es significativamente mayor en los rangos de 0-100 nm y de 100-200 nm, rangos de tamaños donde podemos encontrar los exosomas. Además el etanol produce un incremento significativo en la liberación de exosomas en el rango de 100-200 nm.



**Figura 2: Medida por NanoSight NS300 del número de partículas por mililitro presentes en las muestras de ambos grupos.**

Al mismo tiempo también se realizó un Western Blot para detectar 3 proteínas que son marcadores exosomales específicos, las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 [12, 13]. Mediante esta técnica pudimos observar que la cantidad de proteína era mayor en las muestras tratadas con etanol respecto a las muestras control, por lo que es un indicativo de que en dichas muestras la cantidad de exosomas liberados era mayor (Fig. 3).

Puesto que resultados de este laboratorio han demostrado el papel del receptor TLR4 en los procesos inflamatorios inducidos por el alcohol [2, 8, 15], y ya que los exosomas también pueden ser capaces de mediar daño celular entre las células [17], analizamos la expresión del receptor TLR4 en los exosomas procedentes de astrocitos control y tratados con etanol. En la Figura 3 podemos observar que los exosomas liberados de los astrocitos tratados con etanol poseen una mayor expresión del receptor TLR4 en comparación con las muestra control (Fig. 3).



**Figura 3: Cuantificación de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81 y el receptor TLR4 mediante análisis por Western Blot.**

Otro análisis que se realizó de estas muestras fue medir la cantidad de proteína total presente en las fracciones de exosomas aisladas mediante el kit BCA. En la Figura 4 podemos observar una mayor presencia de proteína en las muestras que habían sido estimuladas con etanol respecto al grupo control. Este dato iría en concordancia con los datos obtenidos en las Figuras 2-3.

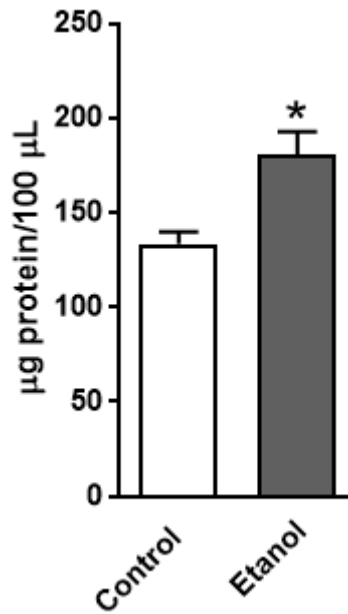


Figura 4: Cuantificación de la cantidad de proteína en ambos tratamientos mediante BCA.

Paralelamente se realizó un ensayo de la actividad acetilcolinesterasa con medida adicional de cantidad de exosomas en la muestra (Fig.5).

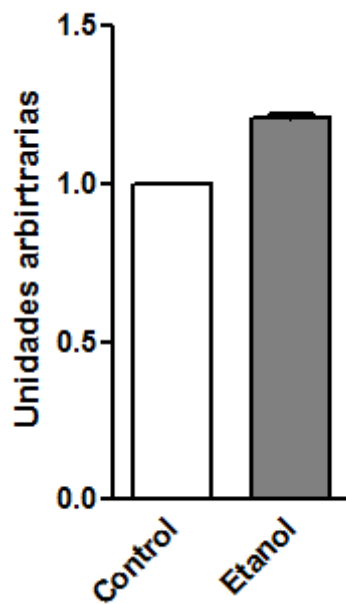


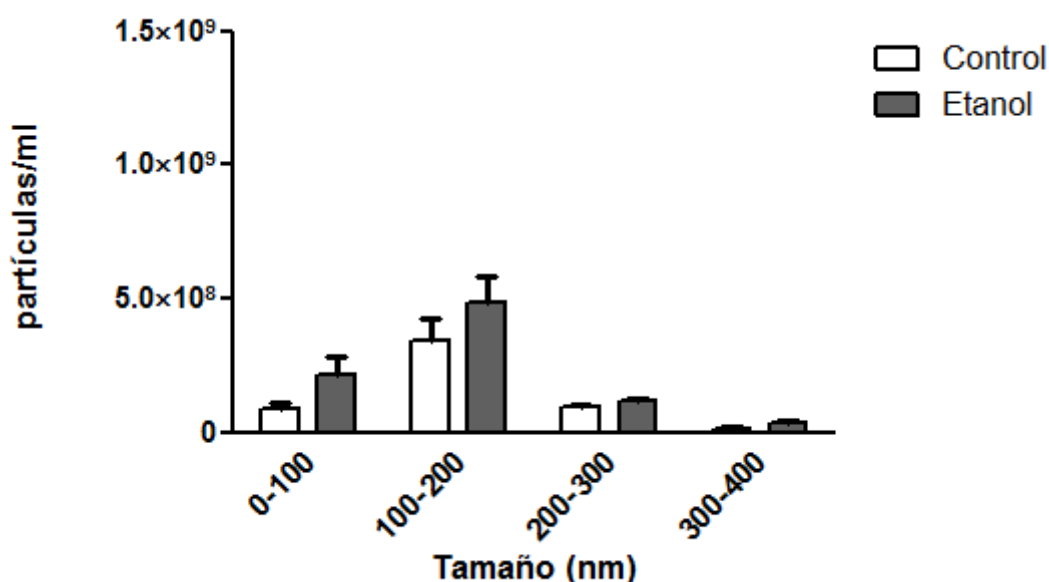
Figura 5. Ensayo de actividad acetilcolinesterasa.

### Efecto del receptor TLR4 sobre la liberación de exosomas en astrocitos TLR4-KO tratados con etanol.

Como ya se ha comentado, la proteína TLR4 es un receptor de membrana que se encuentra principalmente en las células de la glía y se ve activado por la presencia de

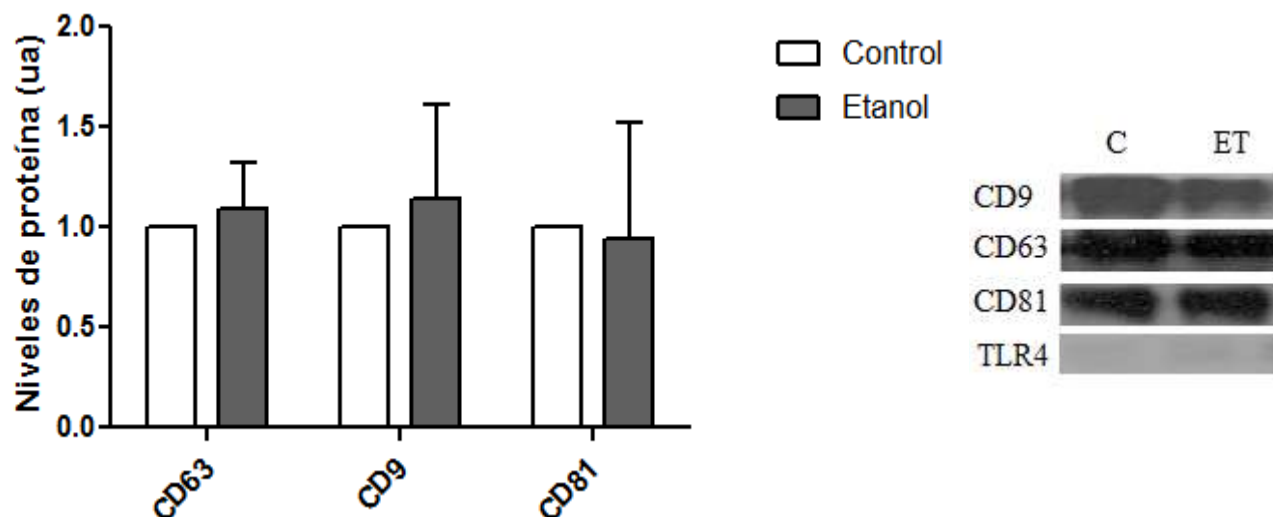
etanol [8, 15]. Puesto que hemos visto que en los astrocitos procedentes de ratones WT la cantidad de exosomas secretados aumenta después de un estímulo con etanol, a continuación quisimos estudiar si el receptor TLR4 podría estar participando en dicho proceso y para ello utilizamos cultivos de astrocitos procedentes de ratones *knock-out*, deficientes en la proteína TLR4, tratados y no con etanol (50 mM) durante 24 horas.

Como podemos observar en la Figura 6, mediante NanoSight NS300 obtuvimos la mayor cantidad de exosomas entre los rangos de tamaño de partículas de 0-100 nm y 100-200 nm (siendo el rango más importante 100-200 nm por el efecto hidrodinámico comentado anteriormente). En la Figura 6 se puede observar que no existen cambios significativos en la liberación de exosomas procedentes de astrocitos control y tratados con etanol (Fig. 6).



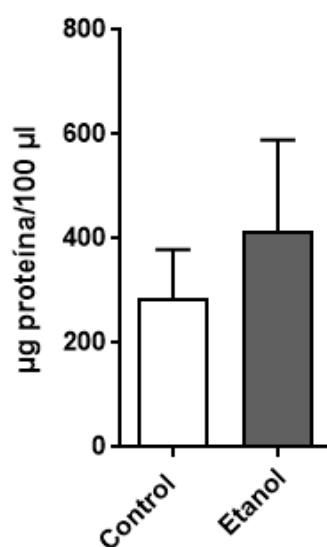
**Figura 6:** Se midieron por Nanosight n300 el número de partículas por mililitro presentes en la muestra, dividido por rango de tamaños.

También se analizaron las muestras mediante Western Blot, utilizando anticuerpos para las tetraspaninas CD63, CD9 y CD81, conocidos marcadores exosomales, y en este caso tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre el grupo control y el grupo tratado con etanol (Fig. 7).

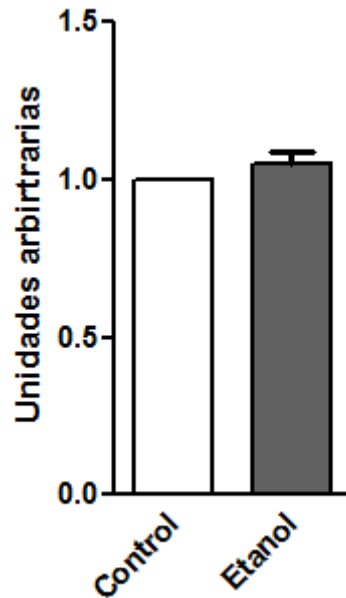


**Figura 7:** Cuantificación de los marcadores exosomales CD9, CD63 y CD81 mediante análisis por Western Blot

Por último, también se evaluó la cantidad de proteína utilizando el kit de BCA (Fig. 8) y la actividad acetilcolinesterasa (Fig. 9), y en ambos casos no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con etanol.



**Figura 8:** Cuantificación de la cantidad de proteína en ambos tratamientos mediante BCA.



**Figura 9:** Ensayo de la actividad colinesterasa de exosomas obtenidos a partir de cultivo primario de astrocitos TLR4-KO.

### **Análisis proteómico de las cortezas cerebrales de ratones silvestres y deficientes en el receptor TLR4.**

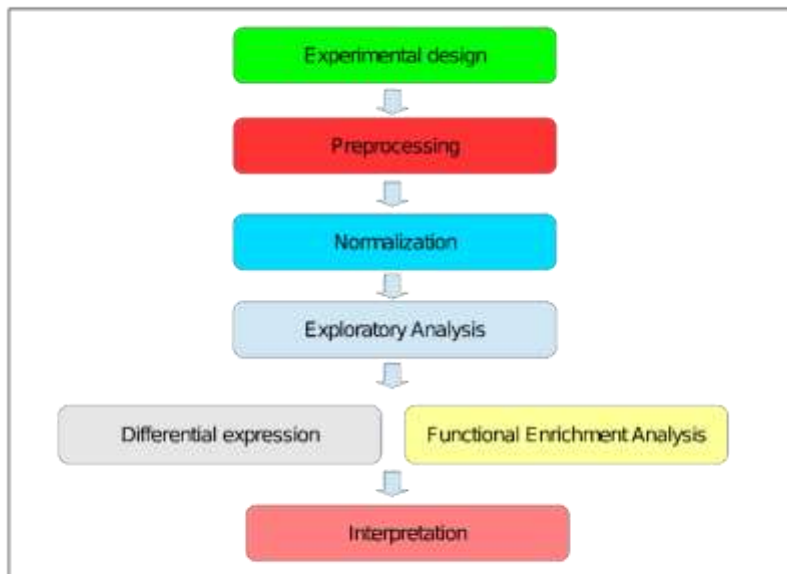
Mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2, se obtuvo un purificado de exosomas procedentes de corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO tanto control como tratados con etanol de forma intermitente durante la adolescencia, siguiendo el patrón de consumo descrito en Material y Métodos.

Este purificado se envió al servicio de proteómica de la Universidad de Valencia, donde se analizó mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem y posteriormente las proteínas fueron identificadas utilizando el software ProteinPilot y cuantificadas mediante PeakView 1.1 (Fig. 10).

El análisis bioinformático de los datos de proteínas incluyó las fases descritas en la Figura 10. El software empleado fue la suite Babelomics [4] y las herramientas web STRING [24] e hiPathia [18].

El primer paso fue el procesamiento de los datos que incorporó la normalización de las medidas de expresión de todas las muestras con el objetivo de obtener una misma escala que permita la comparación entre ellas. A continuación se exploraron las intensidades normalizadas mediante procedimientos de clustering y análisis de componentes principales (Fig. 11). La representación gráfica de estos resultados, anticipa que no habrá una clara expresión diferencial entre grupos experimentales ya que las muestras de los distintos grupos están entremezcladas.

A continuación se realizó un estudio comparativo entre las condiciones experimentales de interés para detectar diferencias en los niveles de proteínas. Las comparaciones efectuadas fueron: ratones WT tratados con etanol y ratones WT control, ratones TLR4-KO tratados con etanol y ratones TLR4-KO control, ratones WT y ratones TLR4-KO (Tabla 1).



**Figura 10: Esquema de las fases del análisis bioinformático de los datos de Proteómica.**



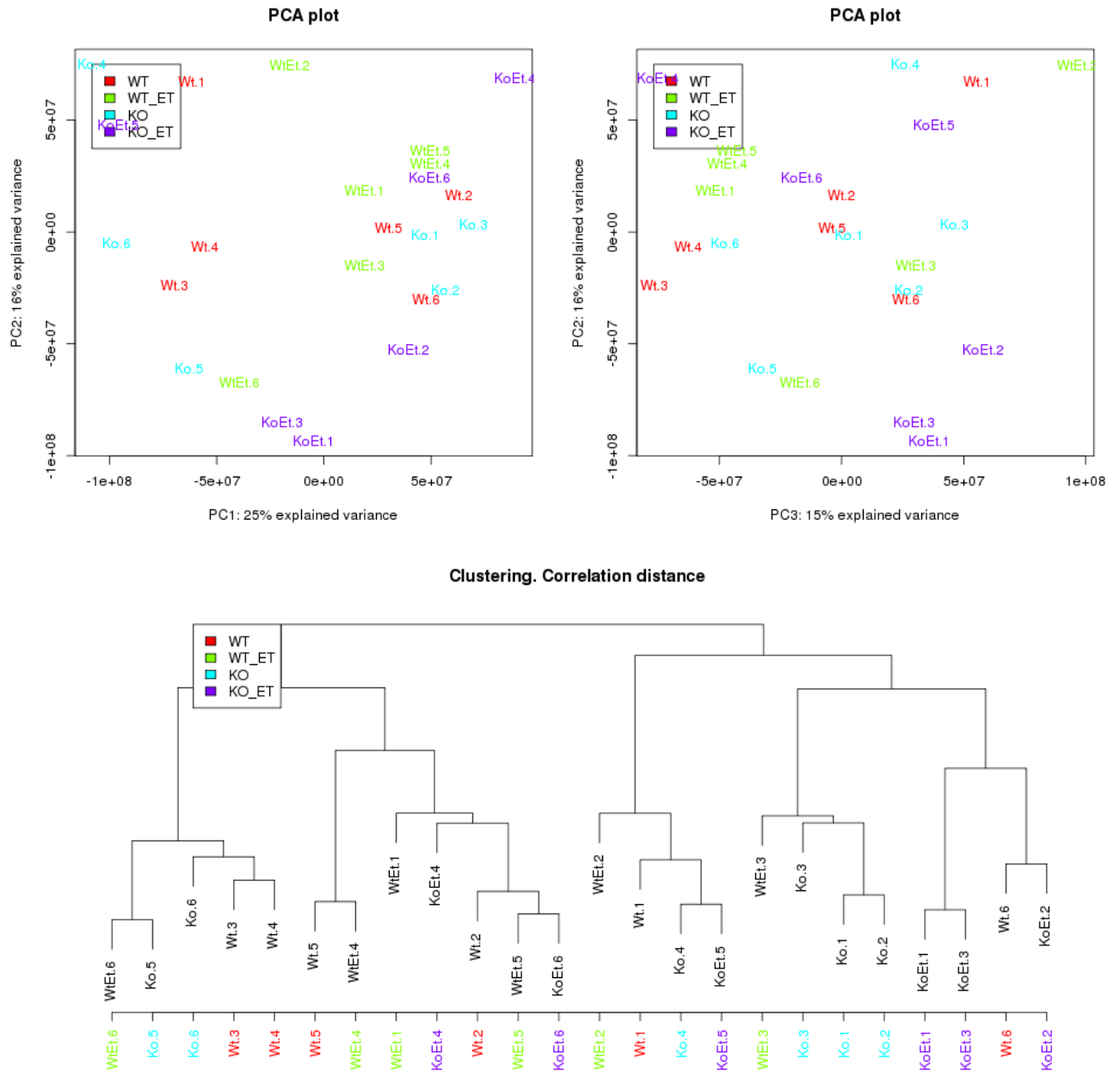


Figura 11. A) Representación gráfica del análisis de componentes principales. B) Árbol de clustering.

Differentially expressed genes			
Comparison	N. under-expressed	N. non diff. expressed	N. over-expressed
WtEt.vs.Wt	0 (1)	650	0 (9)
KoEt.vs.Ko	0 (8)	650	0 (8)
Wt.vs.Ko	0 (7)	650	0 (5)

Tabla 1: Número de proteínas sobre y sub expresadas entre los diferentes grupos.

Para cada una de las comparaciones evaluadas, se indican las proteínas que están sobre o bajo expresadas, con un nivel de significación menor de 0.05. Los números entre paréntesis de la tabla representan las proteínas diferencialmente expresadas pero que, al ajustarse el valor de p, han perdido su significancia. Dicho ajuste tuvo que hacerse debido al gran número de proteínas analizadas, ya que solo por probabilidad alguna daría significativa por lo que es necesario la aplicación de una corrección por test múltiple.

Así por ejemplo en la comparación WT .vs. KO se detectaron 7 proteínas significativas con un nivel de expresión menor en el grupo WT frente a KO y 5 proteínas que estaban sobre-expresadas en WT frente a KO, con el mismo criterio de significación. Cuando corregimos el valor de p por test múltiple, no obtuvimos proteínas con una diferencia de expresión significativa. La interpretación sería análoga para el resto de comparaciones.

Las variaciones sutiles de expresión en los experimentos ómicos suelen ser habituales y en ocasiones sólo se pueden captar de forma clara aquellos cambios muy robustos. Sin embargo, la ordenación de todas las proteínas según su nivel de expresión diferencial aunque no sean significativas, es una información de gran interés biológico para confirmar qué proteínas se sitúan en el top de mayor y menor expresión entre los grupos comparados.

Además esta lista de proteínas ordenada por su nivel de expresión (por ejemplo mediante el estadístico de contraste del test utilizado o el fold-change) es la base utilizada en los procedimientos de caracterización funcional que nos permitirán la interpretación de los resultados del análisis bionfórmático en el marco de la genómica funcional.

Por ello en la última fase del análisis bionfórmático se utilizaron diversos procedimientos para conocer la funcionalidad de las proteínas ordenadas según su nivel de expresión diferencial entre grupos.

El primero de estos métodos es el denominado “Análisis de grupo de proteínas”. Este abordaje posibilita la detección de grupos de proteínas involucradas en diferentes funciones, como procesos biológicos, componentes celulares y moleculares (Tabla 2).

<b>Biological Processes</b>			
	<b>N. under-represented</b>	<b>N. non significant</b>	<b>N. over-represented</b>
<b>WtEt.vs.Wt</b>	9	3480	6
<b>KoEt.vs.Ko</b>	0	3494	1
<b>Wt.vs.Ko</b>	0	3491	4

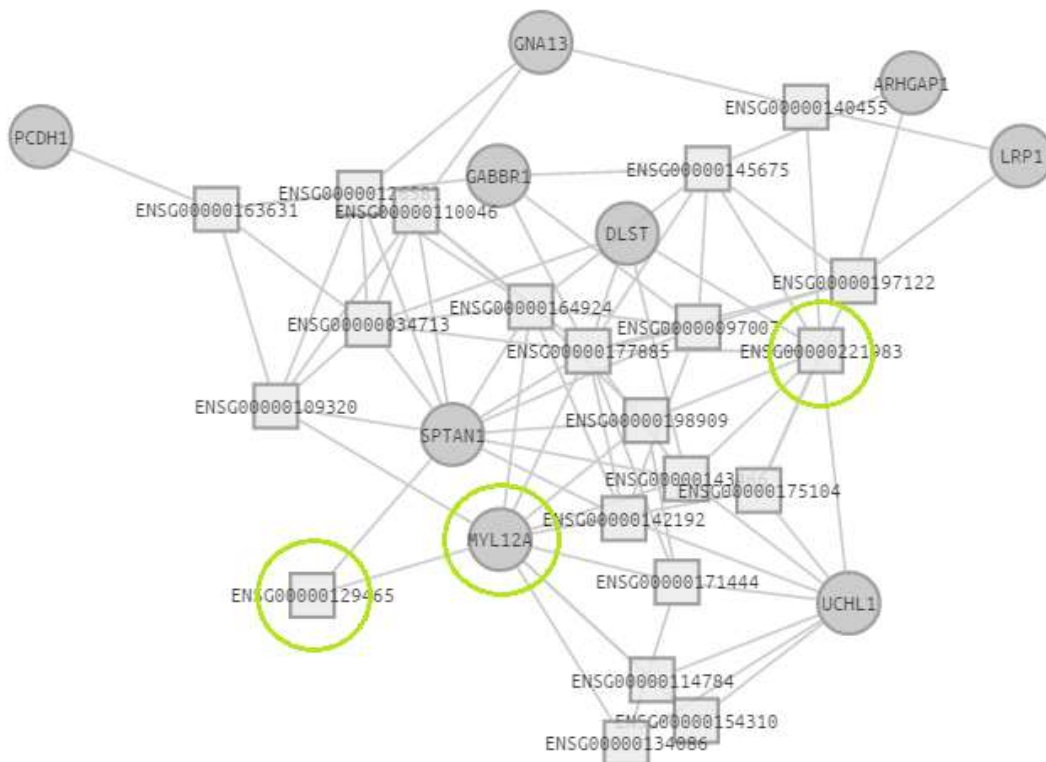
<b>Cellular Components</b>			
	<b>N. under-represented</b>	<b>N. non significant</b>	<b>N. over-represented</b>
<b>WtEt.vs.Wt</b>	0	493	4
<b>KoEt.vs.Ko</b>	0	494	3
<b>Wt.vs.Ko</b>	0	496	1

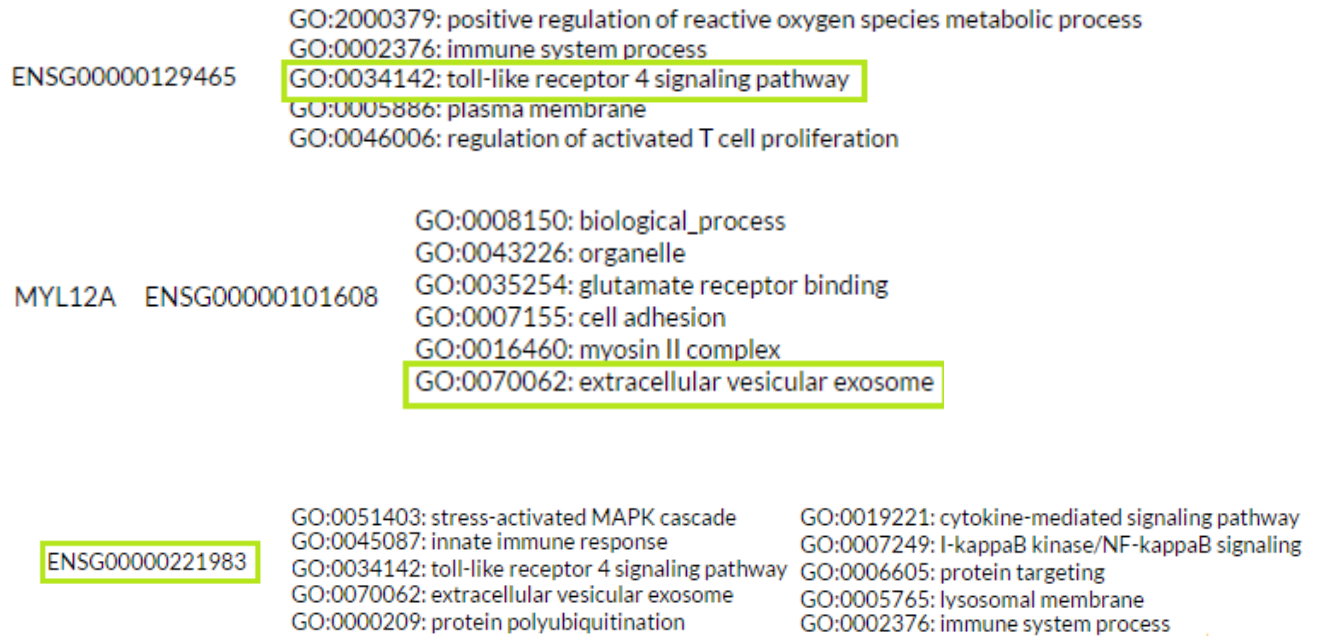
Molecular Functions			
	N. under-represented	N. non significant	N. over-represented
WtEt.vs.Wt	1	625	8
KoEt.vs.Ko	0	633	1
Wt.vs.Ko	4	628	2

**Tabla 2: Número de funciones sobre y subexpresadas entre los diferentes grupos.**

Este análisis fue llevado a cabo con el fin de observar funciones que estuvieran presentes en un mayor nivel en las diferentes condiciones.

A continuación, se llevó a cabo otro estudio en el que se buscaban redes de proteínas con alta interacción física y que simultáneamente se encontraran diferencialmente expresadas entre los grupos de interés. Observamos que, cuando se comparan WT etanol y WT control, en el grupo tratado con etanol hay un grupo de proteínas que se encuentra sobreexpresado y que está involucrado en la ruta de señalización del TLR4, así como en procesos de inmunidad innata, señalización de nfKB, rutas de señalización de TLR dependientes de TRIF, así como involucradas en el metabolismo de especies reactivas de oxígeno. Dicho grupo de proteínas no fue encontrado como significativo entre las dos otras comparaciones. Como dato, en la representación gráfica de la red, dicho conjunto de proteínas involucradas en estas funciones se encontraba relacionado con un grupo de proteínas involucradas, entre otras muchas funciones, con la secreción de exosomas al espacio extracelular. Profundizando en los datos, también encontramos un nodo en el cual estaban sobreactivadas éstas funciones además de otras involucradas en la respuesta inflamatoria y en el estrés que ésta genera. (Fig.12)





**Figura 12: Representación gráfica de la red de interacción entre diferentes clusters de proteínas. Funciones sobreexpresadas en los WT etanol vs los WT control.**

Estos datos apoyan nuestra premisa de que existe cierta relación entre el TLR4 y la secreción de exosomas.

Por último se realizó un análisis para visualizar posibles diferencias de activación de rutas de señalización entre los diferentes grupos utilizando la herramienta Hipathia [18]. Se observó que en el grupo WT etanol vs WT control la ruta de señalización de las MAP kinasas en la que interviene NFkB se encontraba sobreactivada en el grupo etanol vs el control y también en la ruta de síntesis de quemoquinas, donde había un gran número de ellas sobreexpresadas. Estos cambios no se observaron en el grupo con genotipo TLR4-KO, donde incluso NFkB se veía disminuida en las rutas involucradas en la síntesis de quemoquinas inflamatorias. En la comparación entre WT y KO se pueden observar que proteínas involucradas en rutas de inmunidad innata, respuesta inflamatoria, síntesis y transporte de proteínas están sobreexpresadas en el WT respecto al KO. Cuando nos referimos a sobreexpresión o sobreactivación, nos referimos a la tendencia que tienen las rutas o los conjuntos respecto al grupo comparado.

Los datos obtenidos en el extenso análisis proteómico van en consonancia con los datos obtenidos a partir del resto de ensayos realizados, lo que permite futuros proyectos con el fin de dilucidar y profundizar en la posible relación entre el TLR4 y los exosomas. Uno de los siguientes pasos sería la realización de un análisis proteómico de exosomas purificados a partir de cultivos primarios, ya sea de astrocitos, neuronas u otros tipos celulares, ya que, como ya hemos comentado, el contenido de los exosomas es específico del tipo celular del que procede, por lo que conocer de una forma más o menos exacta qué contienen los exosomas de cada tipo celular frente a un estímulo con etanol nos podría dar una mejor idea de cómo se comporta cada uno de éstos frente a este tipo de estrés.

## 5. Discusión de los resultados

Estudios previos de este grupo han demostrado que el tratamiento de etanol tanto en cultivo primario de células astrogiales, como en el tratamiento in vivo de ratones tratados de forma intermitente con altas dosis de alcohol durante la adolescencia produce un proceso inflamatorio llevado a cabo por los receptores TLR4 [25, 26], ya que si utilizamos células o animales sin este receptor, no observamos activación de la vía de señalización del TLR4, ni liberación de mediadores inflamatorios o citoquinas proinflamatorias. Los resultados de este estudio demuestran que los astrocitos procedentes de animales WT tratados con etanol liberan una mayor cantidad de exosomas que los astrocitos control. Y puesto que hemos encontrado tanto una mayor expresión del receptor TLR4 en los astrocitos WT tratados con etanol, se podría concluir que en los exosomas de animales WT se está liberando material proinflamatorio que estaría amplificando la respuesta inflamatoria a nivel de cerebro. Además este resultado queda justificado por el uso de células astrogiales en cultivo procedente de animales TLR4-KO, en las que tanto las células control como las tratadas con etanol, no tienen alteración en la liberación de exosomas. Por tanto con un análisis más detallado del estudio proteómico realizado en las cortezas procedentes de animales WT y TLR4-KO, tanto control como tratados con alcohol durante la adolescencia, nos ayudaría a evaluar las proteínas implicadas en los procesos neuroinflamatorios relacionados con la activación del receptor TLR4.

Puesto que resultados de este grupo han demostrado que la liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas proinflamatorias llevada a cabo por las células astrogiales es capaz de producir muerte neuronal [3, 8, 15], con los resultados observados en este trabajo se podría sugerir que los exosomas liberados por las células astrogiales en animales adolescentes tratados con etanol podrían estar mediando daño celular en las neuronas producido por una comunicación de material proinflamatorio en los exosomas. A este respecto los experimentos futuros irían dirigidos en esta línea de estudio, mediante la utilización de cultivos primarios de neuronas los cuales tendrían que ser incubados con los exosomas liberados por los astrocitos tratados o no con etanol.

## 6. Conclusiones

El papel de los exosomas en la comunicación inter-celular ha convertido a estas microvesículas en objeto de estudio por un gran número de grupos de investigación, por su relevancia en el transporte de RNAs y miRNAs, pero el auténtico potencial de éstas microvesículas, ya sea para investigación básica como aplicada, aún está por descubrir. En este estudio encontramos que la cantidad de exosomas liberados a partir de cultivo primario de astrocitos es mayor en células WT tratadas con etanol respecto al control y que esto no ocurre en astrocitos procedentes de ratones TLR4-KO. También encontramos diferencias en corteza cerebral de ratones WT tratados con etanol respecto

al grupo control en la activación de ciertas rutas clave en procesos involucrados en señalización de TLR4, secreción de exosomas y respuesta inmune. No encontramos dichas diferencias en el grupo TLR4-KO.

## 7. Bibliografía

1. Alfonso-loeches, S., & Guerri, C. (2011). Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain, *48*(1), 19–47. <http://doi.org/10.3109/10408363.2011.580567>
2. Alfonso-loeches, S., Pascual-lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-vera, I., & Guerri, C. (2010). Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage, *30*(24), 8285–8295. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010>
3. Alfonso-loeches, S., Pascual, M., Omez-pinedo, U. G., & Pascual-lucas, M. (2012). Toll-Like Receptor 4 Participates in the Myelin Disruptions Associated with Chronic Alcohol Abuse, *964*, 948–964. <http://doi.org/10.1002/glia.22327>
4. Alonso, R., Salavert, F., Garcia-garcia, F., Carbonell-caballero, J., Bleda, M., Garcia-alonso, L., ... Dopazo, J. (2015). Babelomics 5 . 0 : functional interpretation for new generations of genomic data, *43*(April), 117–121. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv384>
5. Basso, M., & Bonetto, V. (2016). Extracellular Vesicles and a Novel Form of Communication in the Brain, *10*(March), 1–13. <http://doi.org/10.3389/fnins.2016.00127>
6. Brites, D., & Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and Depression : Microglia Activation , Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation, *9*(December), 1–20. <http://doi.org/10.3389/fncel.2015.00476>
7. Cunha, C., Gomes, C., Vaz, A. R., & Brites, D. (2016). Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization, *2016*. <http://doi.org/10.1155/2016/6986175>
8. Fernandez-lizarbe, S., Pascual, M., & Guerri, C. (2009). Critical Role of TLR4 Response in the Activation of Microglia Induced by Ethanol 1. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0803590>
9. For, A. G. P., Gtpases, R. S., Lancaster, C. A., Taylor-harris, P. M., & Self, J. (1994). Characterization of rhoGAP, *269*(2), 1137–1142.
10. Frühbeis, C., & Fröhlich, D. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron – glia communication, *3*(April), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00119>
11. Frühbeis, C., Fröhlich, D., & Kuo, W. P. (2013). Extracellular vesicles as mediators

- of neuron – glia communication, 7(October), 1–6.  
<http://doi.org/10.3389/fncel.2013.00182>
12. Garcia, N. A., Moncayo-arlandi, J., Sepulveda, P., & Diez-juan, A. (2016). Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes, 397–408.  
<http://doi.org/10.1093/cvr/cvv260>
  13. Garcia, N. A., Ontoria-oviedo, I., González-king, H., & Diez-, A. (2015). Glucose Starvation in Cardiomyocytes Enhances Exosome Secretion and Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells, 1–23.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0138849>
  14. Gosselin, R., Meylan, P., & Decosterd, I. (2013). Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters : regulation by protein kinase C and cell activation MATERIALS AND METHODS, 7(December), 1–15.  
<http://doi.org/10.3389/fncel.2013.00251>
  15. Guerri, C., & Pascual, M. (2013). Role of Toll-Like Receptor 4 in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Behavioral Dysfunctions, 3, 279–306.  
<http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4729-0>
  16. Guitart, K., Loers, G., Buck, F., Bork, U., Schachner, M., & Kleene, R. (2016). Improvement of Neuronal Cell Survival by Astrocyte-derived Exosomes Under Hypoxic and Ischemic Conditions Depends on Prion Protein.  
<http://doi.org/10.1002/glia.22963>
  17. Gupta, A., & Pulliam, L. (2014). Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–10. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-11-68>
  18. Hidalgo, M. R., Cubuk, C., Amadoz, A., & Salavert, F. (2016). High throughput estimation of functional cell activities reveals disease mechanisms and predicts relevant clinical outcomes Keywords.
  19. Huang, M., Gonzalez, R. R., Lillard, J., & Bond, V. C. (2017). Secretion modification region-derived peptide blocks exosome release and mediates cell cycle arrest in breast cancer cells, 8(7), 11302–11315.
  20. Jr, L. G. C., Zou, J., & Crews, F. T. (2017). Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, 1–15. <http://doi.org/10.1186/s12974-017-0799-4>
  21. Lafourcade, C., Ramírez, J. P., Luarte, A., Fernández, A., & Wyneken, U. (2016). MiRNAs in Astrocyte-Derived Exosomes as Possible Mediators of Neuronal Plasticity, 10, 1–9. <http://doi.org/10.4137/JEN.S39916.TYPE>
  22. Manuscript, A. (2015). Plaque Load in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer ' s Disease, 35(8), 1792–1800.  
<http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.012.Exosome>
  23. Manuscript, A. (2016). NIH Public Access, 40(2), 301–307.  
<http://doi.org/10.1007/s11064-014-1373-4.Advances>
  24. Montaner, D., Al-shahrour, F., Minguez, P., Go, S., & Dopazo, J. (2009). SNOW , a web-based tool for the statistical analysis of protein – protein interaction networks,



37(May), 109–114. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp402>

25. Montesinos, J., Alfonso-loeches, S., & Guerri, C. (2016). Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System, 1–11. <http://doi.org/10.1111/acer.13208>
26. Montesinos, J., Pascual, M., Pla, A., Maldonado, C., Rodríguez-arias, M., Miñarro, J., & Guerri, C. (2015). Brain , Behavior , and Immunity TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *BRAIN, BEHAVIOUR, AND IMMUNITY*. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.015>
27. Neurochemistry, J. O. F. (2014). Department of Cellular Pathology, Principe Felipe Research Centre, Valencia, Spain, 448–462. <http://doi.org/10.1111/jnc.12639>
28. Pablo, J., Vaccari, D. R., Iii, F. B., Adamczak, S., Lee, S. W., Barcena, J. P., ... Dietrich, W. D. (2017). HHS Public Access, *136*(0 1), 39–48. <http://doi.org/10.1111/jnc.13036>. EXOSOME-MEDIATED
29. Perez-gonzalez, R., Gauthier, S. A., Kumar, A., Levy, E., & Nathan, S. (2012). Brain exosomes are enriched with APP metabolites, (2), 1–16. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.404467>
30. Rajendran, L., Bali, J., Barr, X. M. M., Court, F. A., Kra, E., Picou, F., ... Breakefield, X. O. (2014). Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System, *34*(46), 15482–15489. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3258-14.2014>
31. Savina, A., Furla, M., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2003). Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells \*, *278*(22), 20083–20090. <http://doi.org/10.1074/jbc.M301642200>

(Alfonso-loeches & Guerri, 2011; Alfonso-loeches, Pascual-lucas, Blanco, Sanchez-vera, & Guerri, 2010; Alfonso-loeches, Pascual, Omez-pinedo, & Pascual-lucas, 2012; Basso & Bonetto, 2016; Brites & Fernandes, 2015; Cunha, Gomes, Vaz, & Brites, 2016; Fernandez-lizarbe, Pascual, & Guerri, 2009; For, Gtpases, Lancaster, Taylor-harris, & Self, 1994; Frühbeis & Fröhlich, 2012; Frühbeis, Fröhlich, & Kuo, 2013; Garcia, Moncayo-arlandi, Sepulveda, & Diez-juan, 2016; Garcia, Ontoria-oviedo, González-king, & Diez-, 2015; Gosselin, Meylan, & Decosterd, 2013; Guerri & Pascual, 2013; Guitart et al., 2016; Gupta & Pulliam, 2014; Huang, Gonzalez, Lillard, & Bond, 2017; Jr, Zou, & Crews, 2017; Lafourcade, Ramírez, Luarte, Fernández, & Wyneken, 2016; Manuscript, 2015, 2016; Montesinos et al., 2015; Montesinos, Alfonso-loeches, & Guerri, 2016; Neurochemistry, 2014; Pablo et al., 2017; Perez-gonzalez, Gauthier, Kumar, Levy, & Nathan, 2012; Rajendran et al., 2014; Savina, Furla, Vidal, & Colombo, 2003)

## 8. Anexos

Abreviaturas:

TLR4 → Toll-like receptor 4

DAMP → Patrón molecular asociado a daño

ARN → Ácido ribonucleico

WT → Wild type, silvestre

KO → Knock-out, deficiente

PAMP → Patrón molecular asociado a patógeno

LPS → Lipopolisacárido

CD9 → Cluster of differentiation 9

CD81 → Cluster of differentiation 81

CD63 → Cluster of differentiation 63

CIPF → Centro de Investigación Príncipe Felipe

Agradecimientos: Se agradece al servicio de proteómica de la Universidad de Valencia (ProteoRed, PRB2-ISCI) y al servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigación Príncipe Felipe por la atención y los servicios prestados.