

Índice de la tesis

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Alcohol y daño cerebral: papel de la neuroinflamación	3
1.2. Sistema neuroinmune	6
1.2.1. Receptores tipo Toll	10
1.2.2. Vías de señalización de los TLRs.....	13
1.2.3. TLR4, alcohol y neurodegeneración.....	16
1.3. Mecanismos de degradación de proteínas	20
1.3.1. Sistema ubiquitina-proteasoma	22
1.3.2. Sistema ubiquitina-proteasoma y neurodegeneración.....	28
1.3.3. Vía de la autofagia-lisosoma	34
1.3.4. Vía de la autofagia-lisosoma y neurodegeneración.....	40
1.4. Alcohol y proteólisis	43
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. Animales de experimentación.....	53
3.2. Cultivos.....	53
3.2.1. Cultivo primario de astrocitos.....	54
3.2.2. Cultivo primario de células microgliales	54
3.3. Tratamientos	55
3.3.1. Administración crónica de etanol <i>in vivo</i>	55
3.3.2. Inhibición del proteasoma y estimulación de la autofagia <i>in vivo</i>	56
3.3.3. Tratamiento <i>in vitro</i> de astrocitos y microglía	57
3.4. Determinación de proteínas: inmunotransferencia.....	58
3.4.1. Obtención del lisado celular y de tejido.....	58
3.4.2. Electroforesis.....	59
3.4.3. Inmunotransferencia y detección de proteínas.....	59
3.5. Análisis de la expresión génica.....	62
3.5.1. Extracción y aislamiento del RNA.....	62
3.5.2. Transcripción reversa y PCR cuantitativa	62
3.6. Medida de la actividad del proteasoma.....	63

3.7. Análisis de citoquinas y especies reactivas del oxígeno.....	64
3.8. Imagen óptica <i>in vivo</i> (IVIS)	65
3.9. Técnicas de microscopía.....	65
3.9.1. Preparación y fijación del tejido cerebral	65
3.9.2. Inmunohistoquímica en tejido cerebral.....	66
3.9.3. Microscopía confocal	67
3.9.4. Microscopía electrónica de transmisión	68
3.10. Citometría.....	70
3.10.1. Análisis de la masa lisosomal	70
3.10.2. Cálculo del pH en los lisosomas	70
3.11. Métodos estadísticos	71
4. RESULTADOS	73
4.1. El consumo crónico de etanol afecta a la proteólisis intracelular y causa una acumulación de proteínas en corteza cerebral	75
4.1.1. Papel de TLR4 en la acumulación de proteínas ubiquitinadas	75
4.1.2. El consumo crónico de alcohol afecta al sistema ubiquitina-proteasoma.....	77
4.1.3. El etanol aumenta los niveles de las actividades tipo quimotripsina y tripsina	80
4.1.4. El etanol causa alteraciones en la vía de la autofagia-lisosoma	81
4.1.5. El tratamiento crónico con etanol produce un aumento del volumen de las vacuolas autofágicas	85
4.1.6. Estudio <i>in vivo</i> de la expresión de $\beta 5i$ y LC3 en cerebro	87
4.1.7. El consumo crónico de etanol genera estrés oxidativo	92
4.1.8. Administración <i>in vivo</i> de bortezomib y rapamicina a ratones alcoholizados.....	93
4.2. El etanol altera la proteólisis en células gliales en cultivo primario	97
4.2.1. El etanol no afecta a la acumulación de proteínas ubiquitinadas en cultivo de astrocitos.....	97
4.2.2. El inmunoproteasoma se activa en células gliales incubadas con etanol.....	99
4.2.3. La administración <i>in vitro</i> de etanol estimula la autofagia en células gliales	102
4.2.4. El número de vacuolas autofágicas aumenta en astrocitos en cultivo tras la incubación con etanol	107
4.2.5. El etanol produce un aumento de la masa y el pH lisosomales en células gliales.....	108
5. DISCUSIÓN	113
5.1. Acumulación de proteínas ubiquitinadas y neurodegeneración.....	116

5.2. Importancia del proteasoma constitutivo e inducible en la neuroinflamación y neurodegeneración.....	120
5.3. Papel de la autofagia en la neurodegeneración.....	124
5.3.1. El alcohol puede inhibir o aumentar la autofagia	128
6. CONCLUSIONES	135
7. BIBLIOGRAFÍA	141
8. ANEXOS	173