

# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. El sistema neuroinmune y las células de la glía .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. La respuesta neuroinflamatoria y sus receptores.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. El alcohol y la respuesta neuroinflamatoria .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. La adolescencia como período de iniciación al consumo de alcohol.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5. Exosomas y vesículas extracelulares.....</b>	<b>15</b>
1.5.1. Biogénesis exosomal.....	16
1.5.2 Estructura y composición exosomal .....	17
1.5.3. Funciones fisiopatológicas de los exosomas.....	19
<b>1.6. ¿Qué son los miARNs? .....</b>	<b>23</b>
1.6.1. Biogénesis de los miARNs .....	24
1.6.2. Función de los miARNs.....	26
1.6.3. Papel de los miARNs en la fisiopatología .....	26
<b>1.7. Las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) y su papel en la neuroinflamación causada por el etanol .....</b>	<b>27</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Muestras humanas .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Modelo experimental.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Cultivos celulares .....</b>	<b>42</b>
3.3.1. Cultivo primario de astrocitos.....	42
3.3.2. Cultivo primario de neuronas .....	43
3.3.3. Línea celular microglial BV2 y tratamientos .....	44
<b>3.4. Aislamiento de VEs .....</b>	<b>45</b>
3.4.1. Aislamiento de VEs por ultracentrifugación diferencial .....	46
3.4.2. Aislamiento de VEs por kit comercial .....	47
<b>3.5. Western Blot .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6. Aislamiento de ARN de tejido, células y VEs .....</b>	<b>50</b>

3.6.1. Obtención de ARN de tejido y células.....	50
3.6.2. Obtención de ARN de VEs .....	51
<b>3.7. Control de calidad del ARN .....</b>	<b>51</b>
<b>3.8. Estudio de la expresión génica .....</b>	<b>52</b>
3.8.1. Retrotranscripción de ARN y PCR .....	52
3.8.2. Retrotranscripción de miARNs y PCR .....	53
3.8.3. Análisis de la expresión génica por RT-qPCR, ARN y miARN	54
<b>3.9. Cuantificación de VEs mediante citometría de flujo .....</b>	<b>57</b>
<b>3.10. Detección de VEs mediante Microscopia Electrónica de Transmisión .....</b>	<b>59</b>
<b>3.11. Estudio de internalización de VEs por neuronas mediante microscopía confocal.....</b>	<b>60</b>
<b>3.12. Cuantificación de VEs mediante <i>Nanosight</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>3.13. Estudio bioinformático de miARNs.....</b>	<b>63</b>
<b>3.14. Extracción de lípidos para ensayos de transferencia de fosfolípidos .....</b>	<b>64</b>
<b>3.15. Aislamiento y purificación de MAM .....</b>	<b>65</b>
<b>3.16. Análisis de actividad de MAM por cromatografía en capa fina .....</b>	<b>66</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Efecto del etanol en la secreción de VEs en astrocitos y el rol del TLR4 en el proceso.....</b>	<b>72</b>
<b>4.2. Papel del receptor TLR4 en la alteración del contenido proteico de VEs derivadas de astrocitos inducida por el etanol .....</b>	<b>77</b>
<b>4.3. Estudio del efecto del etanol en el perfil de miARNs presentes en las VEs derivadas de astrocitos y papel del receptor TLR4.....</b>	<b>79</b>
<b>4.4. Análisis bioinformático de los miARNs presentes en VEs procedentes de astrocitos.....</b>	<b>81</b>
<b>4.5. Transmisión de la inflamación causada por el consumo de alcohol a neuronas mediante VEs .....</b>	<b>85</b>

<b>4.6. Papel de los miARNs de VEs procedentes de astrocitos tratados con etanol en neuronas corticales .....</b>	<b>89</b>
<b>4.7. El etanol es capaz de activar MAM en tejido cerebral y células microgliales.....</b>	<b>94</b>
<b>4.8. La inhibición de las esfingomielinasas y MAM revierte el aumento de secreción de VEs por etanol.....</b>	<b>98</b>
<b>4.9. Diferencias de género en el perfil de miARNs de VEs de plasma de adolescentes humanos .....</b>	<b>100</b>
<b>4.10. Diferencias de género en el perfil de miARNs de VEs de plasma de ratones adolescentes.....</b>	<b>106</b>
<b>4.11. Efectos de la IEA en los perfiles de miARNs en la corteza cerebral y tejido hepático de ratones adolescentes.....</b>	<b>112</b>
<b>4.12. Análisis funcional de los miARNs: genes diana y sus niveles en tejido cerebral y hepático tras IEA .....</b>	<b>115</b>
<b>5. <i>Discusión</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>5.1. La administración aguda de etanol causa alteraciones en la secreción y contenido de las VEs gliales, promoviendo la expansión y el mantenimiento de la neuroinflamación, mediante la activación de MAM y TLR4 .....</b>	<b>124</b>
<b>5.2. Diferencias de género en el perfil de miARNs en VEs circulantes en adolescentes y su posible papel como biomarcadores de daño cerebral.....</b>	<b>132</b>
<b>6. <i>Conclusiones</i> .....</b>	<b>141</b>
<b>7. <i>Bibliografía</i> .....</b>	<b>146</b>
<b>8. <i>Anexos</i> .....</b>	<b>168</b>