

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Papel de los miARNs en la neuroinflamación mediada por el abuso de alcohol

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: **Carlos Manuel Cuesta Diaz**

TUTORES EXTERNOS: **Dra. Consuelo Guerri Sirera y Dra. Silvia Alfonso Loeches**

TUTOR UPV: **Dr. Ibo Galindo**

Curso Académico: 2016/2017

VALENCIA, 7 de Julio de 2017

INDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Alcohol y Sistema Nervioso Central.....	3
1.2 Receptores del Sistema Inmune Innato: TLRs y NLRs.....	5
1.3 TLR4, NLRP3, Alcohol y Neurodegeneración.....	7
1.4 Papel de pequeños ARNs no codificantes como posibles biomarcadores en alcoholismo: miARNs.....	9
2. Objetivos.....	12
3. Materiales y Métodos.....	13
3.1 Animales de experimentación.....	13
3.2 Administración crónica de alcohol <i>in vivo</i>	13
3.3 Extracción de ARN total y de las fracciones de pequeños ARNs no codificantes: miARNs.....	13
3.4 Determinación de la expresión génica: reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	15
3.5 Análisis Bioinformático.....	16
3.6 Extracción y cuantificación de proteína.....	18
3.7 Inmunoelectrotransferencia.....	18
3.8 Detección de IL-1 β mediante ELISA.....	20
3.9 Métodos Estadísticos.....	20
4. Resultados.....	20
4.1 Estudios de secuenciación masiva revelan que existen distintos miARNs diferencialmente expresados en el córtex de ratones WT y TLR4-KO a causa de un consumo crónico de alcohol y/o presencia/ausencia del receptor TLR4.....	20
4.2 Validación de datos de secuenciación masiva.....	22
4.3 Papel del miARN-143 en la regulación de la inflamación que produce el consumo crónico o prolongado de alcohol.....	25
4.4 Validación de los niveles de expresión de los genes regulados por el miARN-143 tras un consumo crónico de alcohol en los ratones WT y TLR4-KO.....	29
4.5 Estudio y validación de algunas rutas de señalización reguladas por miARN-143 y el TLR4 tras un abuso de alcohol.....	31
5. Discusión.....	33
5.1 Efecto del etanol en la regulación por miARNs en corteza cerebral: papel de la respuesta de los receptores TLR4.....	33
5.2 El miARN-143-3p y su papel en la neuroinflamación tras un abuso de alcohol.....	36
6. Conclusiones.....	38
7. Bibliografía.....	39
8. Anexos.....	45
9. Abreviaturas.....	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alcohol y Sistema Nervioso Central.

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

El cerebro es uno de los principales órganos afectados por el consumo de alcohol, ya que es un tóxico neural, y su abuso da lugar a alteraciones significativas de la estructura, fisiología y función cerebral (Crews et al., 2005; de la Monte, 1988). El cerebro contiene aproximadamente cien mil millones de células nerviosas o neuronas, pero, además, por cada una de estas neuronas existen 10 células gliales. La glía se divide en microglía, que es la encargada de mediar en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (SNC); y macroglía, compuesta por oligodendrocitos que forman la vaina de mielina que envuelve los axones neuronales y por astrocitos, que son las células gliales más abundantes y cumplen funciones fisiológicas esenciales para el mantenimiento de la función neuronal, aunque también participan en la respuesta inmunitaria en el cerebro.

Diversos estudios en individuos alcohólicos post-mortem demuestran que el alcohol genera una reducción de la masa cerebral (Kril and Halliday, 1999) y que esta reducción es mayor cuanto mayor es la cantidad de alcohol ingerida a lo largo de la vida. La pérdida de masa cerebral se debe a una combinación de la pérdida tanto de neuronas como células gliales, y a una reducción en su tamaño, complejidad sináptica y ramificación neuronal. Los lóbulos frontales, que se encargan de la integración del comportamiento, intelecto y emoción, parecen ser especialmente sensibles a los efectos del alcohol (Oscar-Berman and Hutner, 1993). Estos muestran la mayor reducción en la masa lo que produce un agrandamiento de los ventrículos cerebrales. Esta pérdida se atribuye a una disminución de la materia blanca, compuesta por las fibras nerviosas mielínicas (Harper and Matsumoto, 2005), no sólo en los lóbulos frontales (Alexander-Kaufman et al., 2006; Sullivan and Pfefferbaum, 2005), sino también en el tálamo, cuerpo

calloso (CC) y cerebelo (Rosenbloom et al., 2003). Además, también hay una reducción de la materia gris, constituida principalmente por neuronas, sobre todo en regiones específicas de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo de cerebros de alcohólicos (Harper et al., 2003). Se han observado también alteraciones y muerte celular de las células gliales en córtex prefrontal e hipocampo (Ikegami et al., 2003; Korbo, 1999; Kril et al., 1997; Miguel-Hidalgo et al., 2002), así como una reducción en la expresión de distintos genes relacionados con el proceso de mielinización (Lewohl et al., 2005; Liu et al., 2006), que podrían estar implicados en dicha pérdida.

Todos estos cambios morfológicos y estructurales van acompañados de cambios funcionales. Estudios clínicos y experimentales demuestran que existen déficits neuropsicológicos en alcohólicos, especialmente en los que sufren el síndrome de Wernicke-Korsakoff (Oscar-Berman and Hutner, 1993). En este síndrome, las funciones más afectadas son las relacionadas con la parte de la corteza prefrontal, como son los cambios en la personalidad, las disfunciones emocionales y en la capacidad de la concentración, y en general en todas las tareas relacionadas con la función cognitiva. Además, incluso en casos menos graves de alcoholismo también se aprecia una reducción de la capacidad de aprendizaje, memoria, procesamiento de información y afectaciones motoras (Oscar-Berman and Hutner, 1993).

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

Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuáles el alcohol induce la producción de estos mediadores inflamatorios no están totalmente esclarecidos. Además, resultados recientes del laboratorio de Patología Celular del CIPF, indican que el etanol podría activar la respuesta inmune innata y la señalización a través los receptores tipo Toll (TLR), lo que se traduciría en la activación de NF- κ B y la consiguiente producción de mediadores inflamatorios (Valles et al., 2004; Blanco et al., 2005).

1.2. Receptores del sistema inmune innato: TLRs y NLRs.

El sistema inmune innato constituye el primer mecanismo de defensa del que dispone el organismo para defenderse ante una infección foránea. Este responde de una forma genérica y sin especificidad, lo que lo diferencia del sistema inmune adaptativo, y suele desencadenar una respuesta de tipo inflamatorio por parte de las células del sistema inmunitario, como los macrófagos y las células gliales (Griffiths et al., 2007). Tanto microglía como astrocitos se caracterizan por la expresión de una clase de receptores de membrana que son esenciales en el desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria y que son conocidos como receptores tipo Toll (Mishra et al., 2008)

Los receptores tipo Toll (“Toll-like receptors”, TLRs) son una familia de receptores de reconocimiento de patrón (“pattern recognition receptors”, PRRs) identificados en *Drosophila* (Hashimoto et al., 1988) que permiten la identificación de una serie de motivos estructurales conservados en una gran variedad de patógenos (“pathogen associated molecular patterns”, PAMPs) y otras moléculas endógenas producidas durante el daño tisular (“danger associated molecular patterns”, DAMPs) (Medzhitov et al., 1997). Estos receptores son de gran importancia en el sistema inmune innato ya que representan la primera barrera de defensa contra las infecciones. La estimulación de los TLRs por los correspondientes PAMPs o DAMPs inicia cascadas de señalización que conllevan a la activación de factores de transcripción como AP-1 (“activator protein 1”), NF- κ B (“nuclear factor- κ B”) y factores reguladores del interferón (IRFs). La señalización a través de los TLRs resulta en una gran variedad de respuestas celulares incluyendo la producción de interferones (IFNs), citoquinas proinflamatorias y citoquinas efectoras que dirigen la respuesta inmune adaptativa.

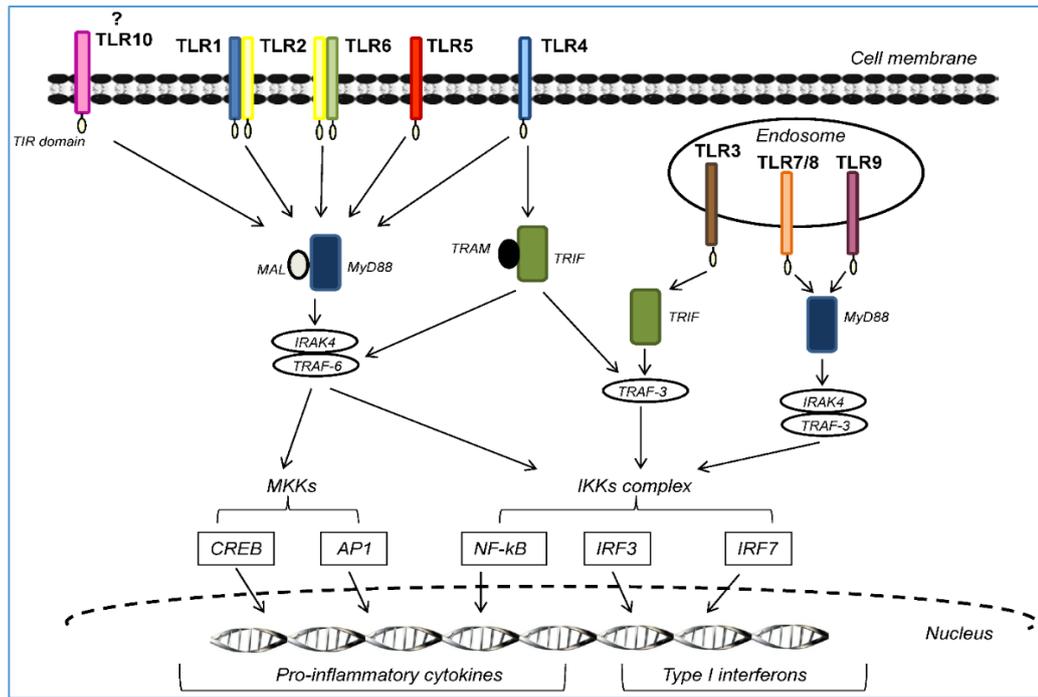


Figura 1. Tipos de TLRs humanos y sus vías de señalización (imagen tomada de Pedrosa Nunes, K et al., 2015).

Hasta el momento se han descrito 10 TLRs en humanos (Fig. 1) y 12 en ratón (Brubaker et al. 2015). Del TLR1 al TLR9 son comunes en humano y ratón, teniendo el ratón hasta TLR13, pero siendo el homólogo del TLR10 humano un pseudogen en el roedor (Wade et al., 2015). Los TLRs se caracterizan por reconocer patrones concretos asociados a daño o agentes infecciosos e iniciar cascadas inmunológicas.

Otro tipo de PRRs del sistema inmune son los receptores *NOD-like receptors* (NLRs), receptores citoplasmáticos que detectan también moléculas patógenas o de estrés celular y pueden cooperar con los TLRs. Los receptores NLRs, forman complejos proteicos en el citosol que son capaces de reclutar y activar a la caspasa-1 (cistein-proteasa-1) que se encarga del procesamiento de la pro-IL-1 β y pro-IL-18, y posterior liberación de las IL-1 β e IL-18 maduras, respectivamente. Este procesamiento genera un aumento en la secreción de las citoquinas IL-1 β , IL-18 y IL-33 (Keller et al. 2008). Algunos miembros de esta familia son NLRP1, NLRP3, NLRC4 y AIM2.

Las citoquinas pro-inflamatorias y sus receptores comparten complejas rutas de señalización con los TLRs que terminan convergiendo en NF- κ B, un factor de transcripción clave en la respuesta inmune innata y la inflamación (que además actúa como principal nexo entre los TLRs y los NLRs) y otros factores de transcripción de

función similar. Entre los diferentes inflamomas el NLRP3 (*nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain containing-3*) es el mejor caracterizado hasta el momento. Las mutaciones en los genes de NLRP3 han sido identificadas en síndromes de enfermedades anti-inflamatorias, conocidos como CAPS, síndrome periódico asociado a criopirina (Neven et al., 2004). Además, algunos estudios han demostrado que la criopirina es capaz de regular la neuroinflamación y los procesos de desmielinización en enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (EM) (Jha et al., 2010) entre otras. Sin embargo, mientras los TLRs e incluso los inflamomas pueden ser activados ante un proceso de infección, se desconoce cómo y qué tipo de participación e interacción ocurre durante el proceso inflamatorio e incluso qué interacciones ocurren durante la neuroinflamación debida a un daño neural.

1.3. TLR4, NLRP3, alcohol y neurodegeneración.

Estudios recientes indican que el alcohol es capaz de inducir daño cerebral mediante una respuesta inflamatoria continuada, pero hasta hace poco tiempo, se desconocían los mecanismos moleculares implicados. De hecho, existen evidencias que han demostrado que, a concentraciones fisiológicas relevantes, el alcohol es capaz de activar las vías de señalización mediadas por TLR4/IL-1RI en cultivos primarios de astrocitos (Blanco et al., 2005; 2008), en microglía y en macrófagos murinos (Fenandez-Lizarbe et al., 2008; 2009). A concentraciones fisiológicamente relevantes (10 mM), el etanol facilitaría el reclutamiento de los receptores TLR4/IL-1RI en microdominios citoplasmáticos conocidos como balsas lipídicas (*“lipid rafts”*) (Blanco and Guerri, 2007), lo que desencadenaría la activación de estos receptores y la producción de citoquinas. Por el contrario, a concentraciones altas (100-200 mM), el etanol provocaría la interrupción de dicho reclutamiento mediante la disrupción de estas balsas lipídicas, inhibiendo la señalización de los receptores. Esto se ha podido demostrar en astrocitos, cuya estimulación con IL-1 β , LPS o etanol desencadena la acumulación de TLR4/IL-1RI en ciertas zonas de la membrana, y el reclutamiento y fosforilación de moléculas señalizadoras como IRAK, ERK, P38 o JNK hacia dichos dominios (Blanco et al., 2008). Como consecuencia de la estimulación de la señalización por TLR4, se produciría la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, y la consiguiente liberación de citoquinas (Blanco et al., 2004; 2005). En microglía, el etanol activa ambas vías de señalización de TLR4, MyD88-dependiente (MAPKs, NF- κ B) y MyD88-independiente (IRF3, STAT1), induciendo la activación de la microglía y la producción de la respuesta

inflamatoria. Esta respuesta inducida por el etanol no se observa cuando se bloquean los receptores TLR4/IL-1RI con anticuerpos específicos (Blanco and Guerri, 2007), ni tampoco en microglía de ratones TLR4-KO (Fernandez-Lizarbe et al., 2009). En conjunto, todos estos datos sugieren que el etanol actúa como agonista de los receptores TLR4/IL-1RI y activa sus vías de señalización de manera similar a sus ligandos LPS e IL-1 β , lo que provoca la aparición de neuroinflamación y daño neural (Blanco and Guerri, 2007; Blanco et al., 2005). De hecho, numerosos estudios señalan la importancia de la respuesta inmune mediada por mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-1 β , COX-2, iNOS, IFN- β) (Fenandez-Lizarbe et al., 2009). Estudios recientes demuestran, que el consumo crónico de alcohol causa neuroinflamación e incluso neurodegeneración, y que estos efectos están mediados por los receptores TLR4, ya que su eliminación en animales experimentales, usando ratones TLR4-KO o bien en cultivo primario de astrocitos, usando silenciadores (ARNsi) de TLR4, previene de la neuroinflamación y la neurodegeneración asociada con el consumo crónico de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2010; 2012).

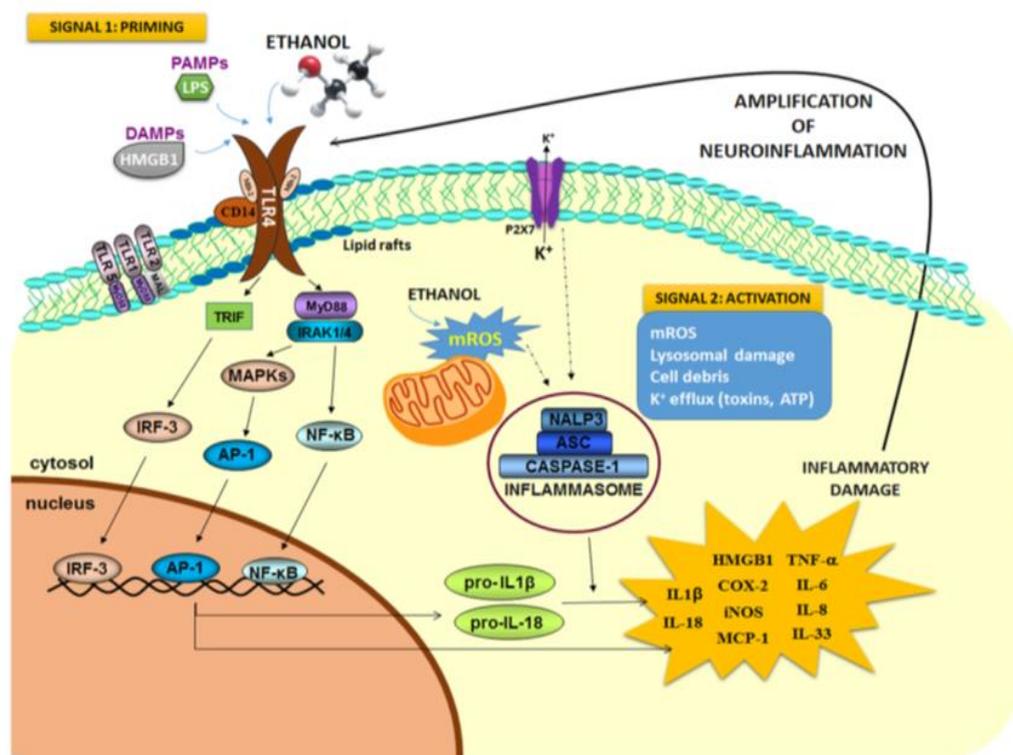


Figura 2: Diagrama sobre la neuroinflamación inducida por efecto del abuso de alcohol a través de la activación de las cascadas de señalización de los receptores inmunes TLR4 y NLRP3 (Imagen tomada de Montesinos et al., 2016).

Además de los receptores de membrana TLR4, el alcohol se ha demostrado que activa los receptores citoplásmicos NLRs o inflammasoma (Alfonso-Loeches et al., 2014; 2016), dando lugar a la producción de citoquinas como IL-1 β , IL-18 e IL-33 entre otras (Alfonso-Loeches et al., 2010; 2012; 2014; Montesinos et al., 2016).

De hecho, en el sistema nervioso central (SNC) los TLRs, además del etanol, también pueden ser activados por restos celulares procedentes del daño celular como son las *alarminas* (ej: IL-33, HMGB1) entre otros DAMPs (*damage associated molecular patterns*), amplificando la neuroinflamación (Vetreno and Crews, 2016; Montesinos et al., 2016)

Sin embargo, aunque conocemos algunos de los mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad del alcohol, desconocemos si podrían existir otras posibles vías que regulen la neuroinflamación asociada al abuso de alcohol, para tratar de buscar dianas que puedan bloquear este proceso neuropatológico.

1.4. Papel de pequeños ARNs no codificantes como posibles biomarcadores en alcoholismo: miARNs.

Los microARNs (miARNs ó miRs) o ARN monocatenarios de pequeño tamaño, son moléculas de pequeño tamaño, sobre 17-24 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de la ribo-interferencia. Los miARNs fueron descritos en 1993 por Lee y colaboradores, sin embargo, el término "micro ARN" no se acuñó hasta 2001 (Ruvkun, 2001). A principios del año 2008, análisis computacionales realizados por IBM sugerían la presencia de alrededor de 50.000 miARNs diferentes en el genoma humano, cada uno con alrededor de miles de ARN mensajeros (ARNm) dianas potenciales de manera aproximada.

Los miARNs se definen como una clase de ARNs no codificantes y de pequeño tamaño con la capacidad de unirse, por complementariedad de secuencia, a diferentes ARNm modificando y/o silenciando la traducción de éstos (Lee and Ambros 2001). Su importancia deriva de la capacidad de que un único miARN, es capaz de regular la traducción de un gran número de genes.

Se estima que los miARNs regulan la expresión de la mayoría de los genes codificantes de proteínas, formando una compleja red de mecanismos regulatorios donde interaccionan tanto con los ARNm, como entre ellos mismos. Esta supresión génica

mediada por los miARNs (Fig.3), ocurre a través de múltiples mecanismos, como el *splicing* alternativo, la eliminación de la caperuza 5´ o la desadenilación del extremo 3´ (Fabian and Sonenberg, 2012; Krol et al., 2010.).

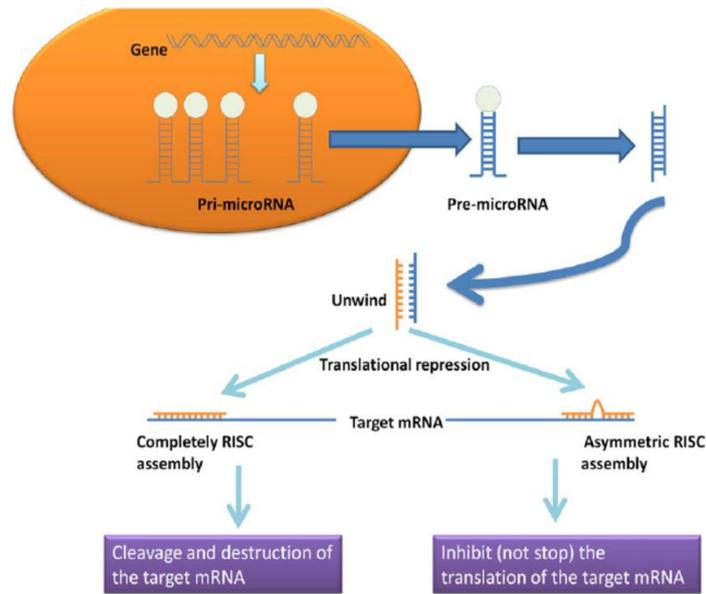


Figura 3: Modelo de supresión post-transcripcional en los miARNs (Imagen tomada de Qu et al., 2015).

Además, como podemos observar en la Figura 3, la modulación de la expresión génica se realiza a través de la base canónica de emparejamiento a secuencias complementarias en la región “3'-untranslated” (UTR) del ARN mensajero (ARNm) objetivo.

Estos ARNs de pequeño tamaño, se han convertido en un campo emergente de creciente interés en diferentes patologías incluyendo la neuroinflamación (Ksiazek-Winiarek et al., 2013) y enfermedades neurodegenerativas, así como en el desarrollo y función de las células inmunes, regulando el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Shi et al, 2014). Recientemente, muchos miARNs se han empezado a utilizar como biomarcadores (Ej. miR-155, miR-146a, miR-191, miR-342-3p, miR-16, etc.) en diversas patologías del sistema inmunitario y del SNC, como son glioblastomas, artritis reumatoide, dermatitis atópica, Esclerosis múltiple y Alzheimer entre otras (Quinn et al., 2011; Yang et al., 2014; Femminella et al, 2015), e incluso hay algunos miARNs, utilizados en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades como el Alzheimer (Femminella et al, 2015), lesiones cerebrales traumáticas (Di Pietro V et al., 2017), etc.

Por sus funciones reguladoras, es razonable esperar que los miARNs tengan un papel crítico en los efectos del alcohol. Estudios anteriores ya han demostrado que hay cambios significativos en la regulación de miARNs cuando se compara entre individuos control y consumidores crónicos de alcohol, entre los que se encuentran relacionados con las funciones de apoptosis, ciclo celular, desarrollo del sistema nervioso y la señalización intercelular (Lewohl et al., 2011; Ignacio et al., 2015). Además, en la actualidad, existen estudios que sugieren la conservación de las rutas de miARN en respuesta al consumo del alcohol, desde roedores a humanos (Tapocik et al., 2013).

Por tanto, el objetivo principal de este trabajo es detectar algunos miARNs que regulen la neuroinflamación asociada al abuso de alcohol y evaluar si ciertos miARNs pueden servir de biomarcadores en la neuroinflamación asociada con un consumo crónico o prolongado de alcohol.

2. OBJETIVOS

I. *Determinar si el consumo crónico de alcohol altera los patrones y niveles de expresión de miARNs en corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO, utilizando secuenciación masiva y análisis bioinformáticos.*

- Aislar ARNs de corteza cerebral de ratones con fondo genético C57BL/6J, WT (TLR4^{+/+}) y TLR4-KO (TLR4^{-/-}) adultos con o sin un tratamiento de consumo crónico de etanol durante 5 meses al 10% (v/v).

- Comprobar la calidad de las muestras, usando sólo aquellas que presenten un RIN óptimo mayor a 8 para generar librerías para realizar una secuenciación masiva, y análisis bioinformático posterior, realizado por la empresa LifeSequencing S.A.

- Obtención de un patrón de expresión diferencial de los diferentes miARNs presentes en las muestras de los 4 grupos de animales a estudiar (WT, WT+EtOH, TLR4-KO, TLR4-KO+EtOH).

II. *Evaluar las variaciones en los perfiles de miARNs entre los diferentes grupos de estudio, y en especial los miARNs asociados a neuroinflamación y expresados diferencialmente tras un abuso crónico de alcohol en corteza cerebral (CTX), cuando se comparan con los obtenidos en animales control.*

- Valoración de los perfiles de miARNs obtenidos cuando se comparan los grupos TLR4-KO vs. WT, que nos dará la información sobre cambios en genotipo, mientras que la comparación entre WT-EtOH vs. WT y KO-EtOH vs. KO, nos indicará los efectos debidos al consumo crónico de alcohol. Se seleccionarán los miARNs que se asocien con neuroinflamación.

III. *Comprobar y validar los cambios en los miARNs diana seleccionados y evaluar los niveles de expresión de los genes que modulan, utilizando PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) con muestras independientes que presenten las mismas condiciones y/o tratamientos.*

IV. *Analizar cambios en los niveles de algunas proteínas codificadas por los genes diana seleccionados, para evaluar variaciones en rutas de señalización que regulan los miARNs seleccionados y su posible papel en la neuroinflamación asociada con el abuso de alcohol.*

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales de experimentación.

Para el estudio se usaron hembras de ratones con un fondo genético C57BL/6J de la cepa silvestre WT (“*wild type*”, TLR4^{+/+} o TLR4-WT) (Harlan Ibérica S.L., Barcelona) y ratones mutantes para el receptor TLR4 (“*knock-out*”, TLR4^{-/-} o TLR4-KO), cedidos por el Dr. S. Akira (Universidad de Osaka, Suita-Japón). Todos los animales se criaron y mantuvieron en condiciones SPF (zona de barrera libre de gérmenes patógenos) con seguridad biológica y con ciclos de luz/oscuridad (12/12h) a una temperatura de 23±1°C y humedad de 60%. Las hembras fueron dispuestas en cajas independientes durante el periodo de gestación con el fin de evitar periodos de estrés que pudiesen afectar a los resultados obtenidos. Todos los protocolos de experimentación con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación con Animales del CIPF (CEBA), siguiendo las pautas establecidas por el Consejo Directivo de la Comunidad Europea (2010/63/ECC), por el Real Decreto Ley 53/2013.

3.2. Administración crónica de alcohol *in vivo*.

Para el tratamiento crónico de etanol, los ratones WT y TLR4-KO se mantuvieron durante 5 meses con una solución de etanol al 10% (v/v) disuelto en el agua de bebida suplementada con unas gotas de sacarina y dieta sólida *ad libitum*. Durante las dos primeras semanas, el porcentaje de etanol en el agua de bebida se incrementó progresivamente hasta alcanzar el 10% (v/v). La ganancia de peso final durante los 5 meses de tratamiento se ha comprobado que es similar tanto en ratones tratados con o sin etanol y en ratones WT o mutantes TLR4-KO (Alfonso-Loeches et al., 2010).

3.3. Extracción de ARN total y de las fracciones de pequeños ARNs no codificantes: miARNs.

3.3.1. Obtención de ARN total y de la pequeña fracción ARNs. Los homogenizados para el estudio de ARN se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por (Chomczynski and Sacchi 1987). Este método utiliza los principios activos del fenol que inhibe las ARNasas, el tiocianato de guanidina, el tiocianato de amonio y glicerol como componentes de lisis y el cloroformo para generar las diferentes fases en que quedarán resuspendidas las macromoléculas. Posteriormente el ARN se precipita con isopropanol y se recoge mediante centrifugación. Finalmente, se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió con H₂O-DEPC.

Para comprobar la calidad del ARN se midió la absorbancia con el Nanodrop, donde las ratios 260/230 nm y 260/280 nm nos indican los niveles de contaminación proteica (las proteínas absorben a 280nm) y sustancias químicas (EDTA, etanol o isopropanol absorben a 230nm) arrastradas durante el respectivo proceso de aislamiento.

Asimismo, la integridad del ARN se verificó por la visualización de 1µg de ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% para descartar la presencia de ADN y evaluar que los ARN tuvieran una integridad adecuada.

Para los métodos de trabajo con miARNs se siguió un protocolo de extracción diferente al habitual debido a que la pureza e integridad de éste ha de ser lo más óptima posible, ya que cualquier degradación inicial de la muestra afectaría a los resultados de la secuenciación masiva. Se partió de 6 muestras de corteza correspondientes a 6 animales por tratamiento: 6 controles WT, 6 controles TLR4-KO, 6 cortezas de ratones alcoholizados WT+EtOH y 6 de TLR4-KO+EtOH. Todas ellas fueron diseccionadas y congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C.

El día de la extracción se descongeló en hielo y se les añadió 1ml de Qiazol (Qiagen) con 10µl de β-mercaptoetanol como agente protector de la degradación. Las muestras se lisaron a temperatura ambiente mediante lisis mecánica con un homogeneizador. El material homogenizado se centrifugó 1min a 10.000 rpm para eliminar el exceso de tejido y el material no lisado. El sobrenadante se pasó a un tubo de 2ml nuevo (700ml aproximadamente). Seguidamente se le añadieron 140µl de cloroformo frío. Las muestras se agitaron vigorosamente y se dejaron 10 min. a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12.000xg durante 15 min. y la fase acuosa se pasó a un tubo de 1,5ml nuevo. Se añadió etanol 70% para precipitar el ARN de mayor tamaño y se pasó por una columna "RNeasy mini spin" del kit RNeasy mini kit de Qiagen. A partir de esta columna y siguiendo las instrucciones del fabricante se obtuvo el ARN total.

En el caso de aislar los pequeños ARN no codificantes, el protocolo de extracción varió, de modo que, a partir del eluido de la primera centrifugación de la muestra con etanol 70% se obtuvo la fracción enriquecida de miARNs mediante precipitación con etanol 100% y siguiendo las instrucciones de la casa comercial (miRNeasy mini kit de Qiagen). Finalmente, la fracción del miARN se eluye en un volumen máximo de 30 µl.

3.4. Determinación de la expresión génica: reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para el análisis de RT-PCR, 1 µg del ARN total aislado de cada muestra fue transcrito usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Este kit utiliza 25X dNTPs, 10X Random Hexamers primers, 125U de la enzima retrotranscriptasa (Multiscript) y 40U de ARNse Inhibitor en un volumen final de 50µl. Las condiciones de la reacción fueron 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 42°C y 3 minutos a 95°C. A partir del ADNc obtenido en la retrotranscripción se realizó una comprobación de la eficiencia con la amplificación por PCR usando REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix de Sigma Aldrich. Para esta PCR se utilizó 5µl de la MasterMix 2X del kit, 200pM de cada oligonucleótido directo y reverso, 3µl de H₂O-DEPC y 1µl de una dilución 1/10 del ADNc. El producto de la reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Anexo I, Fig. 10). La secuencia de cada uno de los cebadores o *primers* de los genes usados se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Genes regulados por miARN 143-3p y las secuencias de cebadores 3'-5' (*forward* y *reverse*) para su detección mediante RT-PCR.

Genes	Secuencias de cebadores
<i>GCNT1</i>	Forward: CAGGAAGCTCAAGTGCTCCA
	Reverse: GGTCAGCTTCCCATCGACAA
<i>PTGS2</i>	Forward: AGCCCATGAACCTGGACTG
	Reverse: ACCCAATCAGCGTTTCTCGT
<i>QK-1</i>	Forward: GGGTGTCTTGTCTTTCTTGGG
	Reverse: ACAAACATAGTCCAGAGTTAGTAGG
<i>SL12A6</i>	Forward: CCCCAAGAACCAGACCCGA
	Reverse: ATGCGGTTGAGGAGAGAAGA
<i>VAPB</i>	Forward: ATGAAGGGAACAAGGCGGAG
	Reverse: CATGGGCAGTGAGCGAAATG
<i>PPIA</i>	Forward: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC
	Reverse: GATGCCAGGACCTGTATGCT

En el caso de la retrotranscripción de los miARNs, a partir de la fracción de miARNs se usó el kit de “TaqMan miARN Reverse Transcription” (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones comerciales. Para cada reacción de retrotranscripción, se utilizó entre 2-4 ng de ARN de pequeño tamaño.

3.4.1. Análisis de la expresión génica y miARNs mediante RT-qPCR.

Para el análisis de la expresión génica se utilizó la técnica de la RT-qPCR que se basa en la cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes a estudio por cuantificación relativa respecto a un gen de referencia o *housekeeping*, que en nuestro caso fue el gen PPIA.

La reacción de amplificación se realizó con el kit FastStart Universal SYBR Green Master de Applied Biosystems; se utilizaron: 1 µl del ADNc stock, 5µl de la master mix 2X, 200pM de cada uno de los cebadores directo y reverso, y se completó con H₂O-DEPC hasta 10µl. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en el LightCycler480 de Roche. Una vez terminada la fase de amplificación se añadió la desnaturalización mediante la curva de Melting para ver especificidad de la amplificación.

Para el análisis de los niveles de expresión genética y de miARN se utilizó el software de LightCycler® 480SW 1.5. Se analizó a su vez la curva de la temperatura de Melting con el fin de comprobar la eficiencia de los *primers* y que la detección se debiera a la amplificación de un solo amplicón.

Para el análisis primario de la expresión génica se descartaron los triplicados que difirieron más de 0,5 ciclos. Una vez filtrados los datos se calculó la diferencia mediante la relación relativa entre el gen de referencia PPIA y los genes analizados. Esta relación se obtuvo con la fórmula E-Method de Pfaffl (Pfaffl, 2001) en la que no se utiliza solamente el Ct sino que también se tiene en cuenta la eficiencia de los *primers* utilizados. Los datos se procesaron y se obtuvo el valor RQ para cada uno de los genes (tabla 1) y de las siguientes sondas taqman analizadas: miR-26a, miR-143-3p, miR-125b, miR-146a, miR-9, miR-21a, miR-486b, miR-181, miR-183 y miR-let7f.

3.5. Análisis bioinformático.

El análisis informático se realizó por dos empresas externas, Genometra S.L. y Lifesequencing S.L (Figura 4) a partir de las secuencias obtenidas de calidad. Mediante el uso de diferentes programas (FastQC, TopHat y BWA, Burrows-Wheeler Aligner) se

realizó un mapeo de las secuencias contra la base de datos de ncARNs. Posteriormente, las secuencias se seleccionaron por biotipo de interés, que fueron mapeadas contra miARNs horquilla (pri-miARN, el precursor del pre-miARN) usando de nuevo FastQC, TopHat y BWA para evitar el inmaduro. Con los resultantes se pasó al conteo mediante htseq-count y a la posterior normalización y obtención de la diferente expresión de los miARNs con edgeR (un paquete de software para el análisis de la expresión diferencial de genes). Se detectó que gen era objetivo de cada uno de los miARNs significativos mediante targetScan, el cuál es un servidor web que predice los genes afectados por miARNs mediante la búsqueda de sitios que coincidan con la región seed o región semilla/simiente.

Finalmente se realizó una búsqueda de genes relacionados con funciones que eran de interés usando el paquete *Multi Dimensional Gene Set Analysis* o *mdgsa* que permite hacer análisis de sets de genes incluyendo métodos de trabajo con miARNs.

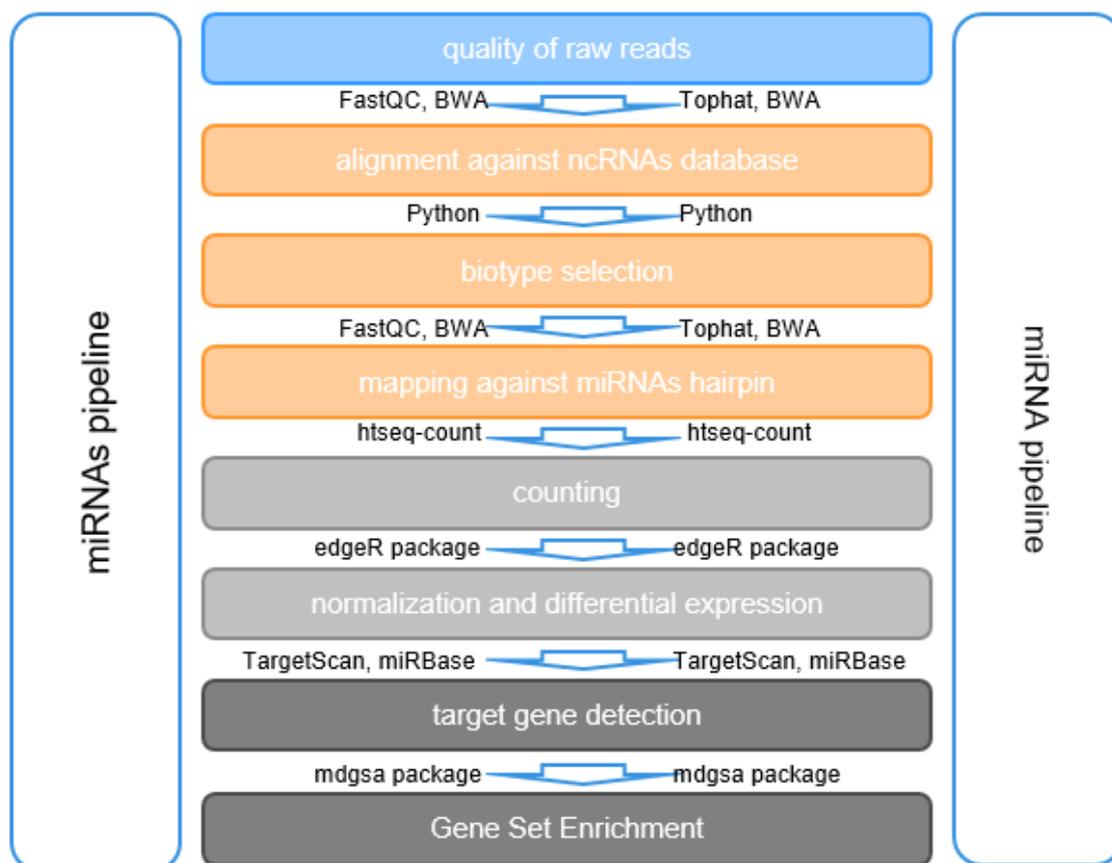


Figura 4. Diagrama de flujo donde se muestra el pipeline de análisis usado a partir de los resultados obtenidos de secuenciación masiva. El esquema muestra los pasos seguidos en la búsqueda y análisis de miARNs candidatos para el presente estudio.

3.6. Extracción y cuantificación de proteína.

Tras 5 meses de consumo crónico de alcohol, los animales procedentes de nuestros cuatro grupos de estudio fueron sacrificados por dislocación cervical y se diseccionó la corteza cerebral para cada individuo. Para la obtención de la proteína total, el tejido (250mg de tejido/0.5 ml tampón de lisis) se homogeneizó en tampón de lisis frío (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl pH8, 130 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 µg/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina, 10 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄ y 1 mM PMSF). Los extractos homogeneizados se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, se centrifugaron a máxima velocidad (13000rpm) durante 15 minutos, y el sobrenadante se recolectó para determinar la concentración proteica de los lisados, que se midió usando el kit Pierce BCA (ácido bicinconínico) (Thermo Fisher Scientific, España).

3.7. Inmunoelectrotransferencia.

La inmunoelectrotransferencia se usó para determinar los niveles de expresión de proteínas de interés para el presente estudio (ver Tabla 2). Para ello se utilizaron geles de 1.5 mm de grosor con porcentajes de acrilamida (en el gel separador) entre el 6 y el 15% según el peso molecular de los fragmentos proteicos a resolver y adicionando dodecil-sulfato sódico (SDS). Se mantuvo una relación acrilamida/bis-acrilamida de 30/0,8 en todos los casos. A las muestras obtenidas se les añadió tampón de carga 6X (350mM Tris pH 6.8, 30% glicerol, 30% mercaptoetanol, 100g/L SDS, 200 mg/L azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min. Para la electroforesis se utilizó un sistema Mini Protean de Bio-Rad en tampón: 6g/L de Trizma base, 2.88g/L de glicina y 20g/L de SDS. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilion Transfer Membrane, Millipore) en tampón 3g/L de Trizma base, 1.44 g/L de glicina y un 20% de metanol, durante 1h a 100V.

Las membranas se bloquearon durante 60 min en Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 5% en TBS-Tween (TBS-T) 0.1% (Tris 20mM y NaCl 500mM pH 7.5) y se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación, con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 2). Tras la incubación, las membranas se lavaron 3-4 veces con TBS-T 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 3) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia usando

ECL-Plus (Amersham) y se expusieron a *films* o películas MXG de Kodak o Hyperfilm (alta afinidad) de Amersham.

Otras membranas fueron reveladas mediante el método de fosfatasa alcalina, donde 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 (la enzima fosfatasa alcalina cataliza la reacción de eliminación del grupo fosfato de BCIP, cuyo producto reacciona con NBT formando un precipitado con coloración). En algunos casos, las membranas reveladas por quimioluminiscencia fueron reincubadas nuevamente con otros anticuerpos, para la determinación de una proteína marcadora (GAPDH) que nos indicara el control de carga. Para ello, antes del bloqueo, las membranas se trataron con 200mM de glicina pH 2.5 y 0.4% SDS, durante 1 h a temperatura ambiente.

Tabla 2. Listado de los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Descripción	Organismo	Dilución	Casa Comercial
AIM-2	<i>Absent in melanoma-2</i>	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-1	<i>Cisteina Peptidasa- 1</i>	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
IL-18	<i>Interleukin-18</i>	Conejo	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Pro-IL-1β	<i>Pro-Interleukin 1 beta</i>	Conejo	1:200	Santa Cruz Biotechnology
QK	<i>Quakin (QKI)</i>	Conejo	1:1000	Abcam
GCNT1	<i>Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase 1, Core 2</i>	Conejo	1:1000	Abcam
GAPDH	<i>Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)</i>	Ratón	1:3000	Chemicon

Tabla 3. Listado de los anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpos Secundarios	Concentración	Casa Comercial
HRP-IgG-Conejo	1:20000	Sigma-Aldrich
HRP-IgG-Ratón	1:5000	Sigma-Aldrich
PA-IgG-Conejo	1:1000	Sigma-Aldrich
PA-IgG-Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich

3.8. Detección de IL-1 β mediante ELISA.

Las distintas muestras de corteza prefrontal e hipocampo se homogeneizaron en tampón de lisis frío (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl pH8, 130 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina, 10 mM DTT, 1 mM ortovanadato sódico (Na₃VO₄) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) (250 mg tejido/0,5 ml). Las muestras lisadas se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min. El sobrenadante se recolectó para la determinación de los niveles de IL-1 β en estos lisados. La concentración de la citocina IL-1 β se determinó en las distintas muestras de estudio, mediante el uso del kit ELISA (Bender MedSystems GmbH, Austria) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9. Métodos estadísticos.

Los resultados se muestran como [media \pm error estándar de la media (SEM)]. Para la cuantificación del trabajo experimental se utilizó el programa SPSS versión 17.0. Las diferencias significativas de los resultados se analizaron mediante el uso de un test no paramétrico, el Test de la U-Mann-Whitney comprobando la normalidad por el Test de Z Kolmogorov-Smirnov o bien, siguiendo una Prueba T-Student.

Las diferencias en el p-valor de P<0.05, fueron consideradas estadísticamente significativas. El programa GraphPad (versión 5) se utilizó para la construcción de las gráficas y el Adobe Photoshop (versión 7.0) para el procesamiento de las imágenes y figuras.

4. RESULTADOS

4.1.- Estudios de secuenciación masiva revelan que existen distintos miARNs diferencialmente expresados en el córtex de ratones WT y TLR4-KO a causa de un consumo crónico de alcohol y/o presencia/ausencia del receptor TLR4.

El primero de los objetivos propuestos fue evaluar si el consumo crónico de alcohol altera los patrones y niveles de expresión de miARNs en corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO, con el fin de poder detectar miARNs que pudiese funcionar como reguladores y/o moduladores de la neuroinflamación asociada al consumo de alcohol, además de analizar el posible papel de la respuesta del TLR4 en estos procesos. En este objetivo se pretende obtener una visión general de las acciones inflamatorias del

etanol en cerebro y como se regulan, ya que los miARNs, han tenido, y siguen teniendo, un gran impacto en mecanismos que participa en diferentes patologías neuroinflamatorias (Thounaojam et al., 2013; Bernstock, et al. 2016).

Para abordar este objetivo, se partió de muestras de corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO con y sin consumo de alcohol. Específicamente, se seleccionaron 9 animales por grupo/condición, que cumplieren las especificaciones mínimas de calidad del ARN obtenido para la posible generación de librerías.

Tras la extracción del RNA total, las muestras se enriquecieron con RNA de pequeño tamaño y se analizaron en un bioanalizador Agilent 2100. El bioanalizador da información tanto de la alta integridad del ARN de pequeño tamaño (el pico del ARN ribosómica 5S estaba totalmente definido) como de la fracción de miARNs, que se concentran entre los 4 y 40 nucleótidos. El siguiente paso fue generar las librerías de secuenciación masiva, siguiendo el protocolo de Illumina para la generación de librerías de smallARN. Estas librerías se secuenciaron en una empresa colaboradora externa (Lifesequencing S.A.), que mediante el uso de un secuenciador HiSeq nos proporcionó un análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, siguiendo la metodología de análisis descrita anteriormente (Figura 4). En concreto, se filtraron distintos miARNs obtenidos y diferencialmente expresados en las 3 comparativas realizadas en el presente estudio; (a) WTET vs. WT, (b) KOET vs. TLR4-KO y (c) TLR4-KO vs. WT.

De las listas que nos proporcionaron, mediante un análisis bioinformático posterior, fueron filtrados los miARNs obtenidos según su implicación biológica en inflamación, neurodegeneración y/o cerebro. Una vez realizado este filtraje, se escogieron algunos de los miARNs que presentaban mayores cambios significativos en la expresión génica diferencial entre los grupos de estudio mencionados anteriormente y con mayor interés en la inflamación debida al abuso de alcohol y la influencia del receptor TLR4 (Tabla 4) así como rutas de señalización y/o genes que regulan esos procesos.

La tabla 4 muestra que el consumo de alcohol induce un aumento de expresión en algunos miARNs en corteza cerebral de animales WT, como el miARN-181c, el miARN-486b y el miARN-125b, mientras que otros sufren una disminución en su expresión como el miARN-183, el miARN-26a, el miARN-143, el miARN-9 y la familia de los miARN let-7, en especial el miARN-let-7f. Es interesante resaltar, que algunos miARNs como el miARN-146a y el miARN-181d también se encuentran sobreexpresados en corteza cerebral de los animales TLR4-KO tratados crónicamente con alcohol.

Tabla 4: Principales miARNs seleccionados con un papel importante en la regulación de la neuroinflamación y daño cerebral que causa el consumo crónico de alcohol a través del receptor TLR4. La tabla presenta los datos como [fold change (p-valor)] (* cuando el p-valor < 0,001 se determina como 0).

miARN	Comparativa de estudio		
	WT+EtOH vs. WT	TLR4-KO+EtOH vs. TLR4-KO	TLR4-KO vs. WT
miARN-183	-22,67 (0,049)	-	-31,03 (0,013)
miARN-let-7f-1	-4,92 (0,046)	-	-
miARN-let-7f-2	-6,53 (0,012)	-	-
miARN-26a-1	-6,12 (0,03)	-	-7,18 (0,015)
miARN-26a-2	-5,98 (0,045)	-	-7,46 (0,018)
miARN-143	-6,45 (0,002)	-	-4,52 (0,012)
miARN-125b-2	4,77(0) *	-	4,36 (0) *
miARN-21a	-	-	-9,35 (0,048)
miARN-146a	-	13,80 (0,009)	-12,00(0,018)
miARN-9-1	-5,96 (0,0009)	-	-6,05 (0,008)
miARN-9-2	-4,74 (0,022)	-	-5,50 (0,011)
miARN-9-3	-5,14 (0,024)	-	-5,90 (0,013)
miARN-181c	3,76 (0,005)	-	4,51 (0,002)
miARN-181d	-	8,34 (0,011)	-
miARN-486b	8,19 (0,011)	-	8,76 (0,008)

Por otro lado, cuando comparamos diferencias de genotipo, TLR4-KO vs. WT, se observa una disminución en la expresión del miARN-21a, el miARN-183, el miARN-26a, el miARN-143, el miARN-146a, el miARN-9 y el miARN-181c mientras que el miARN-125b, el miARN-181c y el miARN-486b están sobreexpresados.

4.2. Validación de datos de secuenciación masiva.

Tras el análisis bioinformático derivado de la secuenciación masiva (SM), donde se seleccionaron determinados miARNs que se expresaban diferencialmente entre los distintos grupos, el siguiente objetivo fue la validación de los resultados observados

mediante el uso de otra técnica genómica. Para ello, procedimos al análisis de estos miARNs mediante ddPCR y RT-qPCR con el uso de sondas TaqMan. Hemos seleccionado esta metodología debido a su particularidad en la retrotranscripción, ya que solo se transcribe un miARN por reacción, siendo una técnica especialmente sensible y específica en la detección de miARNs de interés.

En primer lugar, se seleccionaron 3 miARNs para el estudio de validación por ddPCR, relacionados directamente con procesos neuroinflamatorios y que a su vez mostraban diferencias significativas en los análisis bioinformáticos derivados de la SM. La técnica de ddPCR además tiene la particularidad de aportar información en términos absolutos, al igual que la SM, por lo que nos podía indicar si el número de contajes de los diferentes miARNs podían considerarse como datos reales.

En este caso, mediante ddPCR se validaron el miARN-125b, miARN-486 y el miARN 9. Como muestra la Fig. 5 (A-C), los miARN-125b y miARN-486 muestran incrementos significativos con el tratamiento de alcohol en el grupo WT, corroborando los datos bioinformáticos. Asimismo, el mismo tratamiento de alcohol disminuye la expresión de otros miARNs como el miARN-9 (miARN-9-1, -9-2 y -9-3) cuando se comparaba con los controles WT sin tratar (Fig. 5B), resultados que también confirman los datos obtenidos mediante Bioinformática.

Posteriormente, procedimos a comprobar algunos de los miARNs testados previamente por PCR digital (Ureña-Peralta, 2016) como es el miARN-125b, mediante RT-qPCR. Como los datos obtenidos fueron idénticos tanto utilizando PCR digital y RT-qPCR (Fig. 5D), procedimos a analizar el resto de miARNs mencionados previamente en nuestra tabla.

Merece destacar, que muchos de estos miARNs seleccionados en la Tabla 4 pueden representar un papel relevante en alcoholismo y la neuroinflamación asociada, puesto que presentan cambios muy significativos estadísticamente como son, por ejemplo, el miARN-143-3p, el cual en estudios previos se ha descrito su implicación en la regulación de procesos de inflamación, e incluso sepsis (Teng et al., 2015; Han et al., 2016), o bien el papel del miARN-125b y miARN-146a que se ha demostrado que actúan conjuntamente en la regulación de la respuesta inmune modulando la vía de señalización de NF- κ B (Yang and Wang, 2016), etc. entre otros.

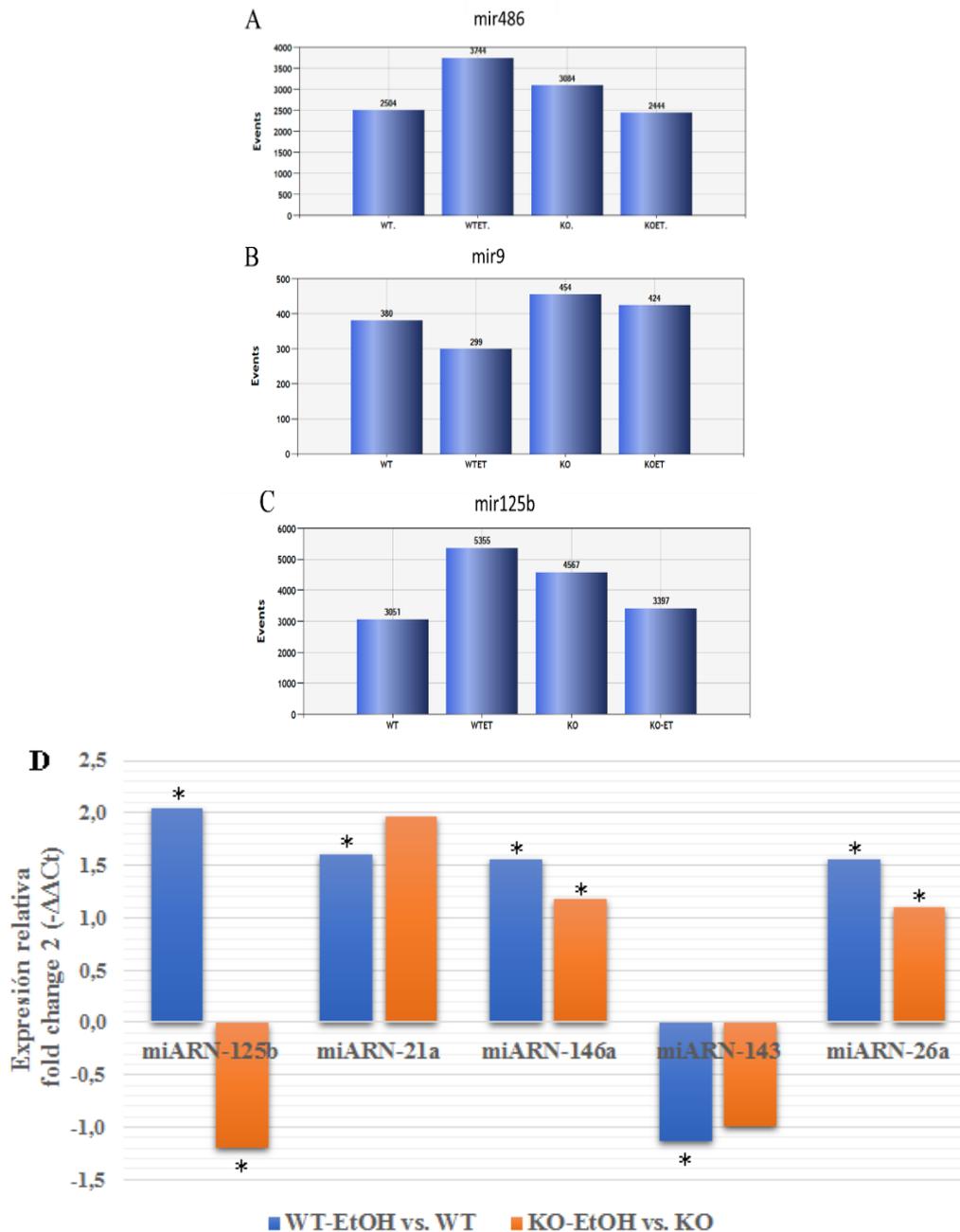


Figura 5: Análisis por PCR digital (ddPCR) y por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) de la expresión de algunos miARNs de interés en la inflamación y daño cerebral que causa el abuso de alcohol en los ratones WT y TLR4-KO. Las gráficas presentan los contejos positivos absolutos obtenidos por ddPCR en la cuantificación del miARN-486 y miARN-125b, donde el etanol incrementa sus niveles en los córtex de los ratones WT, mientras que los disminuye en el caso del miARN-9 (n=5-8 experimentos independientes) (A-C). Los resultados de RT-qPCR (D) muestran que el alcohol produce un aumento significativo en el caso del miARN-125b, miARN-21a, miARN-126a y del miARN 26a en los animales WT, comparando con los controles no tratados, mientras que disminuye significativamente los niveles del miARN-143 (n=10-12 experimentos independientes, * p<0.05) (Nota: las imágenes de ddPCR (Fig.5A-C) han sido tomadas de la tesis de Ureña-Peralta., 2016).

La validación mediante RT-qPCR del miARN-125b, miARN-21a, miARN-146a y miARN-26a confirmó que el tratamiento de alcohol aumenta significativamente su expresión (Fig. 5D), mientras que el miARN-143 y el miARN-9 disminuyen significativamente sus valores con el mismo tratamiento en animales WT, cuando se compara con los animales WT sin tratamiento (Fig.6). Los resultados también indican que los animales TLR4-KO presentan cierta neuroprotección frente a los daños que causa el abuso de alcohol en el cerebro (Fig. 5 C, Fig.6).

Además, resultados preliminares, indican que los niveles del miARN-181 están sobreexpresados mientras que los niveles de expresión del miARN-183 y miARN-let7f están inhibidos debidos al tratamiento crónico de alcohol en los animales WT (datos no mostrados), como nos indican los análisis de SM en la Tabla 4.

Sin embargo, no sólo se obtuvieron datos diferenciales de expresión en los miARNs debidos al alcohol, sino también, debidos al genotipo, por la ausencia o presencia del receptor TLR4, donde observamos una expresión diferencial (Fig.5) en algunos miARNs (Tabla 4).

En resumen, en el presente trabajo validamos los resultados obtenidos por SM y demostramos que el etanol altera el patrón de expresión de pequeños ARNs, que nos puede permitir evaluar con mayor profundidad la regulación de la inflamación y daño que causa un abuso de alcohol en cerebro, y el papel relevante que presenta el receptor TLR4 en estos procesos.

4.3. Papel del miARN-143 en la regulación de la inflamación que produce el consumo crónico o prolongado de alcohol.

Tras el análisis y validación de los miARNs de interés, observamos que uno de los miARN que presentaba mayor evidencia significativa era el miARN-143-3p. Este miARN produce una disminución significativa (tabla 4, p-valor < 0,002) debido a un consumo prolongado de alcohol en los animales WT, mientras que en los TLR4-KO, tanto tratados crónicamente con alcohol como no tratados, no presentaba diferencias significativas (Fig. 6). De hecho, diversos autores han descrito el papel del miARN-143 como posible biomarcador en la neuroinflamación, procesos de sepsis, diabetes, obesidad e incluso cáncer (Tam Tam et al., 2011; Kilic et al., 2015; Han et al., 2016), y por ello, se

nos presentaba como un miARN candidato para ser validado como biomarcador en alcoholismo.

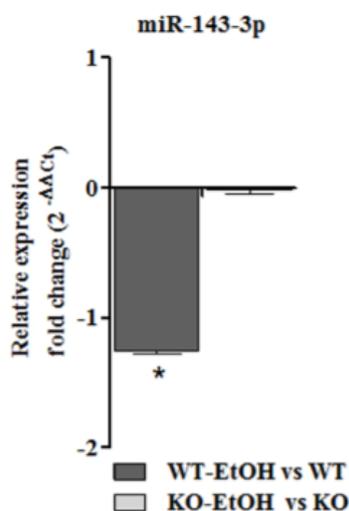


Figura 6: Análisis del efecto del consumo crónico de alcohol en los niveles de expresión del miARN-143-3p en la corteza de ratones WT y TLR4-KO. La gráfica representa la expresión del miARN-143 en 2 de las comparativas de estudio, WT-EtOH vs. WT y KO-EtOH vs. KO, donde apreciamos que existe una disminución/ inhibición significativa debida al consumo de alcohol en los ratones WT, mientras que no existen cambios en el caso de los ratones TLR4-KO. Los datos se presentan como [media del RQ±SEM], con una n= 10-12 casos individuales y réplica de cada experimento por triplicado (*p-valor<0,05).

Tras un análisis exhaustivo de la expresión del miARN-143 por RT-qPCR, observamos que nuestros datos corroboran los resultados bioinformáticos obtenidos en la secuenciación masiva. Estos datos sugieren que una disminución en la expresión del miARN-143 inducida por el consumo de alcohol podría conllevar a un incremento en la expresión de los genes que regula. Para ello, realizamos un interactoma de los genes que regulaba el miARN-143 (Fig. 7), esquema que nos ayuda a predecir los genes que interaccionan o son regulados por este miARN.

Además, tras realizar un análisis de las posibles funciones de cada uno de los genes que regula el miARN-143, seleccionamos aquellos genes que están implicados en procesos de inflamación y/o neurodegeneración en el cerebro o en la regulación de la respuesta inmune (tabla 5).

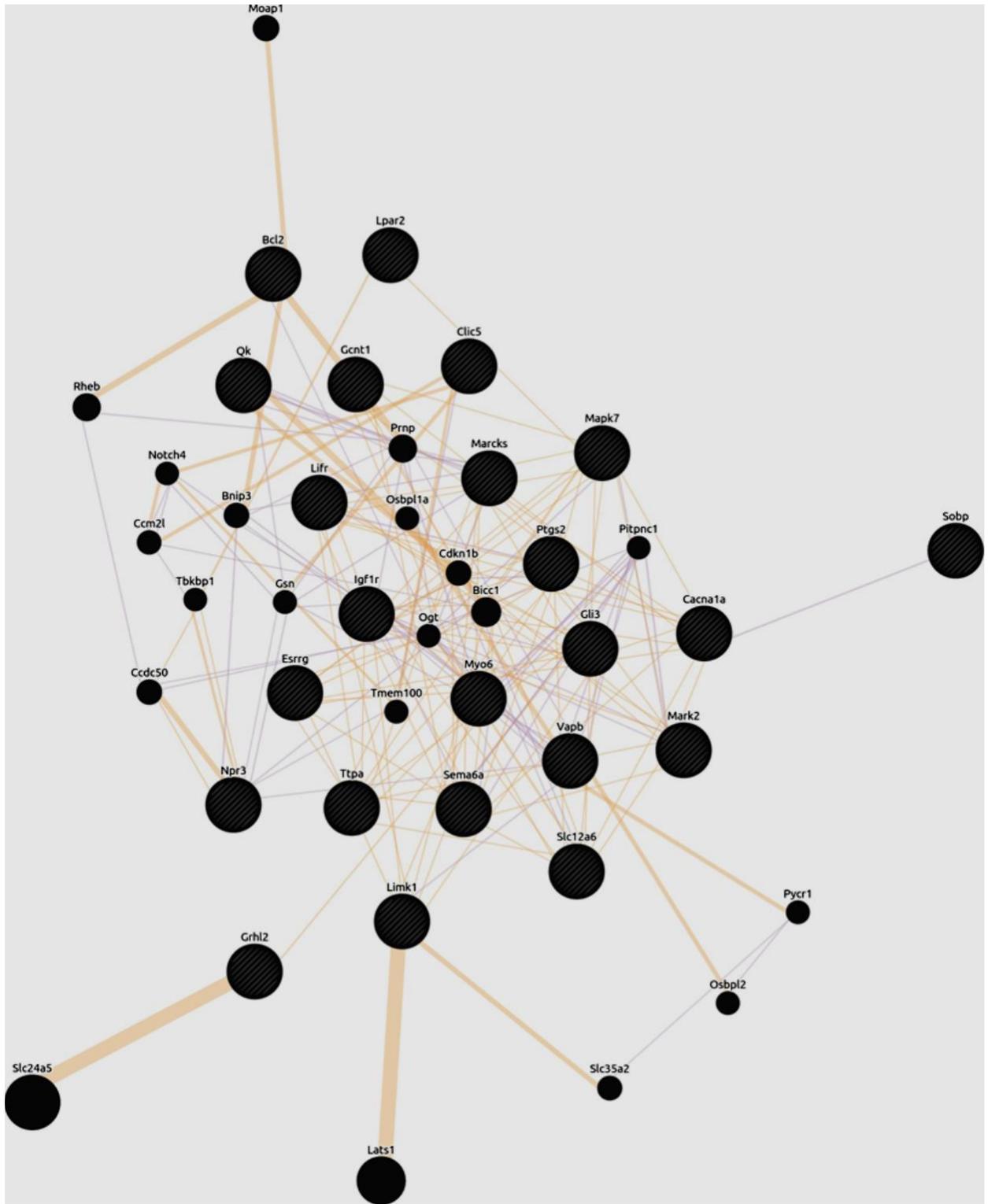


Figura 7. Interactoma del miARN 143-3p. La figura obtenida con el software de GeneMANIA, muestra un mapa donde se presentan los genes que se encuentran regulados por el miARN-143. Aquí vemos que se muestran los patrones de interacción de los distintos genes con el miARN-143 (patrón colores: morado=coexpresión; rosa anaranjado=predicción).

La tabla 5 muestra algunos genes que regula el miARN-143, implicados en la respuesta inflamatoria y daño neural. Por ejemplo, el gen PTGS2 está implicado en la respuesta inmunitaria y codifica al mediador inflamatorio COX-2 (Hla and Neilson, 1992), y su sobreexpresión se observa en distintas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, que cursan con procesos inflamatorios, incluyendo la neuroinflamación y neurodegeneración que causa el abuso de alcohol (Valles et al., 2004, Alfonso-Loeches et al., 2010).

Tabla 5: Fenotipos, características y funciones de los genes que regula el miARN-143: genes implicados en inflamación, respuesta inmune y/o daño en el cerebro.

miR-143		
Fenotipos	Gen	Características y Función
Nocicepción anormal tras inflamación	PTGS2 (COX-2)	-Ciclooxigenasa-2, enzima clave en la síntesis de prostanoïdes. -Actividad dual como ciclooxigenasa y/o peroxidasa, y regula la isoenzima inducible. En humanos se expresa en un limitado número de tipos celulares y es regulada por estímulos específicos. -Implicación importante en respuesta inflamatoria.
Inflamación aguda y respuesta inflamatoria anormal	GCNT1	-Transporte en Golgi y modificaciones, metabolismo, glicosilación, etc. -Infiltración leucocitaria. -Ruta de señalización de la respuesta inmune de IL-12. (Marth and Grewal, 2008)
(1) Inflamación peritoneal. Neurodegeneración; degeneración (2) neuronal en el hipocampo, (3) axonal y (4) del sistema nervioso periférico	SLC12A6	-Miembro de los co-transportadores de sodio y potasio (transportadores K-Cl). -Inducido principalmente por condiciones hipotónicas. -Implicación en la respuesta a señales de estrés, degeneración neuronal y sistema nervioso periférico, e inflamación. (Shekarabi et al., 2012)
Alteraciones morfológicas de la materia blanca cerebral	QKI	-Codifica la proteína de unión al ARN que regula el splicing del pre-mARN, exportación del mARNs del núcleo, traslación proteica y estabilización del mARN. -Implicación en procesos de mielinización y diferenciación oligodendrocitos. -Posible relación con esquizofrenia. -Regulación negativa en la respuesta frente al LPS. Impide la activación de MAPK y la producción de interleucinas. (Ryder et al., 2004)
Degeneración axonal	VAPB	-Codifica una proteína tipo IV de membrana que se encuentra en plasma y membranas de vesículas intracelulares. -Encontrada como homodímero y heterodímero con VAPA en la membrana de retículo endoplásmico relacionada con tráfico vesicular. -Participa en la homeostasis intracelular del ion calcio y se relaciona con el plegamiento de proteínas, aunque no se conoce mucho. (Gomez-Suaga et al., 2017)
Disminución del tamaño cerebral	GRHL2	-Forma homodímeros o heterodímeros con GRHL1 y GRHL3. Participación en el estableciendo de distintas zonas de neurulación primaria. Defectos del gen se asocian a sordera.
	MARCKS	-Se localiza en la membrana plasmática y codifica una proteína sustrato para la proteína quinasa C. -Codifica a una proteína de unión a filamentos de actina; su unión a PKC o calmodulina-calcio inhibe la asociación con actina y se transloca al citoplasma.
Degeneración de células de Purkinje	CACNA1A	-Codifica la subunidad alfa-1 que forma parte del canal de calcio llamado CaV2.1. -Implicada en plasticidad neuronal y supervivencia.
Neurodegeneración	TTPA	-Codifica una proteína que se encuentra en hígado y cerebro y controla la distribución de la vitamina E obtenida de la dieta a las células y tejidos del organismo (vitamina E es un antioxidante) (Schock et al., 2004).

Otros genes que se incluyen en esta tabla son el GCNT-1, implicado en procesos de transporte vesicular e infiltración leucocitaria (Marth and Grewal, 2008) o SLC12A6, que participa inflamación peritoneal e incluso en daño cerebral (Shekarabi et al., 2012).

La tabla 5 también muestra algunos genes que se asocian con neurodegeneración como el QK-1, VAPB, MARCKS o TTPA entre otros. Por tanto, se podría inferir el posible papel del miARN-143 y el receptor TLR4 en la regulación de la inflamación y daño cerebral que causa el abuso prolongado de alcohol.

4.4. Validación de los niveles de expresión de los genes regulados por el miARN-143 tras un consumo crónico de alcohol en los ratones WT y TLR4-KO.

Confirmada la importancia del miARN-143 y su modulación en genes implicados en la respuesta inmunitaria, decidimos validar la expresión de algunos de estos genes regulados por este miARN en la corteza de animales WT y TLR4-KO con o sin consumo crónico de alcohol. Para ello seleccionamos 5 genes que pudiesen tener relevancia en los efectos inflamatorios del alcohol (Tabla 5), específicamente validamos: GCNT-1, COX-2, QK-1, SLC12A6 y VAPB, y cuantificamos su expresión génica relativa mediante RT-qPCR.

Uno de los genes que analizamos fue el PTGS2, ya que datos de anteriores del laboratorio habían demostrado que el consumo crónico de alcohol incrementa significativamente los niveles de COX-2 en la corteza de los ratones WT, pero estos efectos no se observaban en el córtex de TLR4-KO tratados o no tratados con etanol (Valles et al, 2004; Alfonso-Loeches et al., 2010).

Los resultados de la Figura 8 confirman estos datos y revelan que el consumo de alcohol incrementa la expresión del gen PTGS2 en corteza de ratones WT, al igual que lo hace los niveles de la proteína que codifica, mientras que el mismo tratamiento de alcohol no afecta la expresión de PTGS2 en corteza de ratones TLR4-KO.

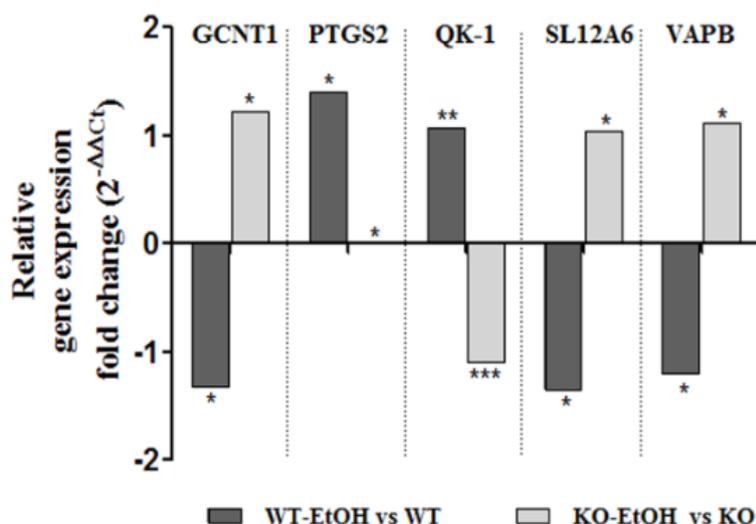


Figura 8: Principales genes controlados por el miARN-143 tras un consumo crónico de alcohol en animales WT y TLR4-KO. La gráfica representa la expresión relativa de los genes que controla el miARN-143 obtenidos del análisis por RT-qPCR en las cortezas de los ratones WT y deficientes para el receptor TLR4 (KO) tras un consumo crónico de alcohol. Las barras muestran el valor de RQ, donde se presenta la activación o inhibición de cada uno de los genes con su grado de significación estadística, con una n= 10-12 casos individuales/grupo (*p<0.05, **p<0,01 y ***p<0,001).

Adicionalmente, observamos que el gen QK-1 presenta el mismo patrón de expresión génica que PTGS2. Considerando el papel del QK-1 en procesos de mielinización (Ryder et al., 2004), alteraciones en la expresión de este gen y la proteína QK1 se podría relacionar con las alteraciones en la materia blanca que se observa en córtex de ratones WT con consumo de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2012). Asimismo, observamos que en los ratones TLR4-KO tratados crónicamente con alcohol, los niveles de expresión de QK-1 disminuyen, aunque no presentan alteraciones en la estructura de la mielina, tal y como se ha descrito en estudios (Alfonso-Loeches et al., 2012).

Otros genes analizados como GCNT-1, SLC12A6 o VAPB, presentan una disminución en sus niveles en la corteza de ratones WT con consumo de alcohol, mientras que el mismo tratamiento produce un aumento en su expresión en córtex de animales TLR4-KO. Estos genes están relacionados con transporte vesicular y autofagia, y el consumo de alcohol altera el transporte vesicular, la glicosilación y autofagia (Tomás et al., 2012; Pla et al., 2014). Los efectos de alcohol que se observan en TLR4-KO, puede estar mediados por mecanismos de compensación para tratar de revertir los efectos adversos del etanol sobre el transporte vesicular y el aumento de estrés oxidativo.

4.5. Estudio y validación de algunas rutas de señalización reguladas por miARN-143 y el TLR4 tras un abuso de alcohol

El siguiente objetivo consistió en evaluar la funcionalidad de algunas de las principales proteínas implicadas en las rutas de señalización que regulaba el miARN-143 tras un consumo prolongado de alcohol, viendo cuál es el papel del receptor TLR4 en estos procesos.

Se ha descrito que el miARN-143 modula la expresión del inflammasoma AIM-2/Casp-1 (Momeni et al., 2013). Además, el reclutamiento de los inflammasomas AIM2 y NLRP3 inducen la activación de la caspasa-1 (Sagulenko et al., 2013) y el procesamiento de pro-IL-1 β a la IL-1 β , con el correspondiente aumento en sus niveles.

Para abordar este objetivo, utilizamos ratones WT y TLR4-KO tratados crónicamente con alcohol durante 5 meses y controles a los que sólo se les suministró agua. Tras este tiempo, se analizaron por inmunoelectrotransferencia los niveles del inflammasoma AIM2, Caspasa-1 activa (Casp-1/p10), la IL-18 activa y la pro-IL-1 β (forma inmadura) en lisados de cortezas cerebrales de estos ratones tratados y no tratados crónicamente con alcohol.

La figura 9, muestra que los ratones WT tratados crónicamente con alcohol presentan una activación de la cascada de señalización del inflammasoma AIM-2/Caspasa-1. De hecho, en la Fig. 9A se observa que el alcohol aumenta la expresión del complejo AIM-2, al mismo tiempo que se produce una ruptura proteolítica de la pro-Casp-1, dando lugar a su forma activa de 10 kDa (Casp-1/p10) en la corteza de los ratones WT. Sin embargo, la activación de este complejo no se produce en la corteza de los ratones TLR4-KO con el mismo tratamiento crónico de alcohol. Además, para corroborar estos resultados se midió la cantidad de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. En la Fig. 9A se muestra la activación de la IL-18 (p18 activa) y una disminución en los niveles de la pro-IL-1 β (p31, forma inmadura) en la corteza de los ratones WT tratados crónicamente con alcohol. Para confirmar el aumento de la citoquina IL-1 β , se realizó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), demostrando un aumento significativo en los niveles de esta citoquina en corteza de los ratones WT tratados con alcohol (Fig. 9B). Sin embargo, no se observaron cambios significativos entre los ratones TLR4-KO tratados y no tratados con alcohol.

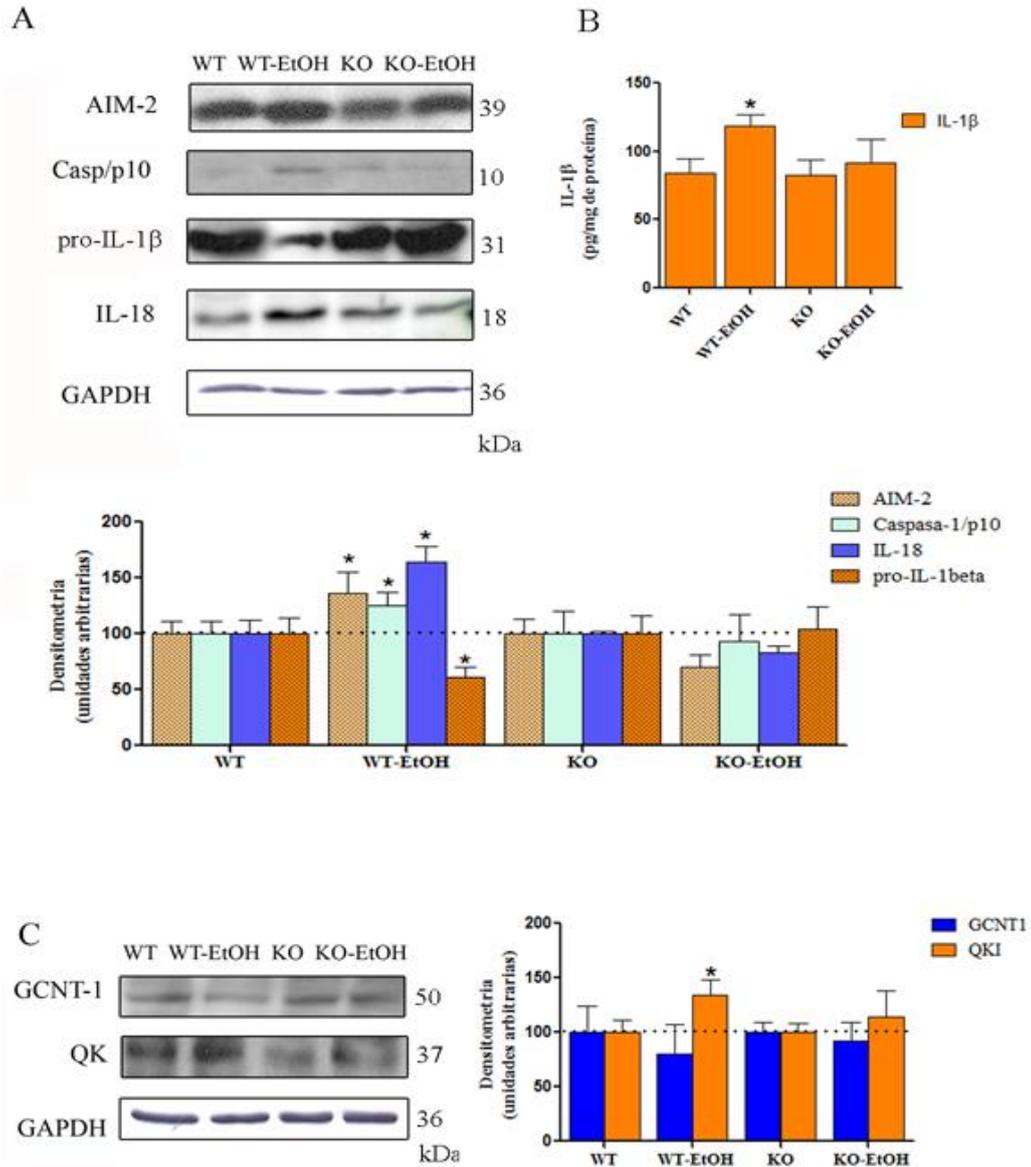


Figura 9: Expresión del inflammasoma AIM-2/Casp-1 y proteínas de señalización, regulada por el miARN-143, en córtex de ratones WT y TLR4-KO con o sin consumo crónico de alcohol. A: Las proteínas mostradas (AIM-2, Caspasa-1 activa, IL-18 y la pro-IL-1 β) participan en la ruta de activación del complejo del inflammasoma AIM-2. (B) Niveles de IL-1 β [pg/mg proteína] evaluados por ELISA (n=4). (C) Westerns blots de las proteínas GCNT-1 y QK-1. Las densitometrías se presentan como la [media \pm SEM] con una n= 3-4 muestras individuales/grupo.

Adicionalmente, evaluamos los posibles cambios en los niveles de proteína de GCNT-1 y QKI en el córtex de ratones WT y TLR4-KO tratados con etanol. La Fig. 9C muestra que las proteínas QKI y GCNT-1 presentan un aumento significativo y una pequeña disminución en sus niveles, respectivamente, en la corteza de los ratones WT

con abuso de alcohol, respecto a sus controles. No se observaron cambios significativos en los ratones TLR4-KO tratados y no tratados con alcohol.

Considerando la relevancia del miARN-143 en la neuroinflamación que causa en abuso de alcohol, estamos analizando este miARN en plasma de ratones WT y TLR4-KO para evaluar si pudiese servir como biomarcador de neuroinflamación asociada con el abuso de alcohol.

5. DISCUSIÓN

Durante la última década con el desarrollo de técnicas Omicas, como la secuenciación masiva junto con la Bioinformática, ha permitido la caracterización los miARNs, y la importancia de estos RNAs de pequeño tamaño en la regulación de diferentes patologías, incluyendo enfermedades autoinmunes (Shi et al, 2014), neuroinflamación, daño cerebral y neurodegeneración (Ksiazek-Winiarek et al., 2013; Yang et al., 2017). Además, recientemente se han empezado a utilizar los miARNs como biomarcadores (Ej. miR-155, miR-146a, miR-191, miR-342-3p, miR-16, etc.) en diversas patologías del sistema inmunitario y del SNC, como glioblastomas, artritis reumatoide, dermatitis atópica, Esclerosis múltiple y Alzheimer entre otras (Quinn et al., 2011; Yang, 2014; Femminella et al, 2015). Incluso, algunos miARNs se están utilizado en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades como el Alzheimer (Femminella et al, 2015), lesiones cerebrales traumáticas (Di Pietro et al., 2017), etc.

En el presente trabajo, utilizando la SM con la plataforma de Illumina (Loman et al. 2012) hemos evaluado como el consumo crónico de alcohol altera el patrón de expresión de ciertos miARNs en la corteza cerebral de ratones, y como este patrón se ve afectado por la presencia o ausencia del receptor TLR4.

5.1. Efecto del etanol en la regulación por miARNs en corteza cerebral: papel de la respuesta de los receptores TLR4

Trabajos de los últimos años han demostrado los efectos del alcohol y su regulación por los miARNs en diferentes patologías asociadas con el abuso de alcohol. Así, datos recientes demuestran el papel de ciertos miARNs en la aparición fibrosis hepática (Saikia et al., 2017) o en la teratogénesis del alcohol, como muestran las

alteraciones en los miR-9, miR-21 y miR-153 (Tsai et al., 2014) tras la exposición al alcohol en cultivos de células madre neuronales fetales.

En cerebro adulto, la administración crónica e intermitente al alcohol causa, en corteza cerebral, disfunciones en la expresión de las familias miR-181 y let-7 (Smith et al., 2016). Asimismo, el tratamiento crónico de alcohol altera diferentes miARNs y ARNm en corteza prefrontal, que se asocian con dependencia al alcohol en ratas (Tapocik et al., 2016). Disfunciones de diferentes miARNs también se han observado en cerebros post-mortem de alcohólicos (Most et al., 2016)

En el presente trabajo, mediante el uso de la secuenciación masiva y análisis bioinformáticos ha permitido obtener resultados de ciertos miARNs que se expresan de forma diferencial en el córtex cerebral de ratones WT o TLR4-KO con o sin tratamiento crónico de alcohol. Sin embargo, aunque hemos obtenido una gran abundancia de miARNs que se alteran por el tratamiento de alcohol, decidimos centrarnos en aquellos miARNs asociados con inflamación.

Los resultados de SM y análisis bioinformáticos para filtrar los miARNs asociados con inflamación y daño neural, indican que el consumo de alcohol induce un aumento en la expresión de ciertos miARNs, como el miARN-181c, el miARN-486b, el miARN-125b, mientras que otros sufren una disminución en su expresión como el miARN-183, el miARN-26, el miARN-143, la familia del miARN-9 (miR 9-1, 9-2 y 9-3) y del miARN-let-7f (Tabla 4) en el córtex cerebral de animales WT. Es interesante señalar que el miARN-let-7 regula la expresión de los receptores TLR4 (Chen et al., 2007) y la inmunidad innata (Sathe and Reddy, 2014) y una reducción en su expresión aumentaría la respuesta de los TLR4 tal y como se ha demostrado en estudios anteriores (Alfonso-Loeches et al., 2010; 2012). Además, de acuerdo con nuestros resultados, se han descrito disfunciones de los miARNs -181 y -let7, tras un consumo crónico e intermitente de alcohol en corteza cerebral (Smith et al., 2016).

Los datos obtenidos también indican que en el córtex de ratones TLR4-KO, el tratamiento de alcohol incrementa los niveles de expresión de ciertos miARNs como el miARN-146a y el miARN-181d. Hay que destacar que estos miARNs regulan la inmunidad innata, la inflamación y la respuesta de los TLRs (Lee et al., 2016) y un aumento en su expresión modularía o induciría a una disminución o represión de genes asociados a inflamación y en la respuesta de los TLRs.

Nuestros resultados de SM también muestran que ciertos miARNs se expresan diferencialmente a causa del genotipo. Así, cuando se analiza la comparativa, TLR4-KO vs. WT (Tabla 4), se observa una disminución en la expresión de ciertos miARNs (miARN-183, miARN-26a, miARN-143, miARN-21a, miARN-146a, miARN-9) mientras que otros miARNs se encuentran sobreexpresados (miARN-125b, el miARN-181a y el miARN-486b).

Un objetivo importante ha sido el validar algunos miARNs que se expresaban diferencialmente entre grupos, así como comprobar la expresión de algunos genes que estén regulados por un determinado miARN. Hay que destacar, sin embargo, que aunque los miARNs modulan diferentes genes (Lee and Ambros 2001), modificando y/o silenciando su traducción, algunos actúan en forma de *clusters*, y en ciertos casos, un aumento o disminución en la expresión del miARN no está directamente relacionada con una disminución o aumento en la expresión de los genes que modula.

En el presente trabajo, hemos validado la expresión de los miARNs: miARN-125b, miARN-21a, miARN-146a miARN-143-3p, miARN-26a, miARN-181 y el miARN-let7, miRNA-183, estos tres últimos no incluido en resultados. Algunos de estos miARNs, como el miARN-125b y miARN-146a se ha demostrado que actúan conjuntamente en la regulación de la respuesta inmune modulando la vía de señalización de NF- κ B (Yang and Wang, 2016), una de las vías de señalización activada por la respuesta del receptor TLR4. Sin embargo, otros *clusters* actúan de forma opuesta. En nuestro caso, observamos la presencia de diferentes *clusters* como los miARNs- 9-1, 9-2 y 9-3 o en los miARNs-let7f1 y miARNs-let7f2.

La validación mediante RT-qPCR del miARN-125b, confirmó que el tratamiento de alcohol aumenta significativamente su expresión (Fig. 5D), mientras que el miARN-143 disminuye significativamente sus valores con el mismo tratamiento en animales WT (Fig.6). Es interesante resaltar, que los animales TLR4-KO presentan cierta neuroprotección frente a los daños que causa el abuso de alcohol en corteza cerebral (Fig. 5C y Fig.6).

Nuestros resultados también confirman, que los niveles del miARN-21a, miARN-146a, miARN-26a y el miARN-486b están sobreexpresados mientras que los niveles de expresión del miARN-183, miARN-let7f y el miARN-9 están inhibidos en córtex de ratones WT con consumo crónico de alcohol, datos que confirman los obtenidos mediante

el análisis de SM (tabla 4, Figura 5). Asimismo, observamos que la ausencia o presencia del receptor TLR4, determina la expresión diferencial de ciertos miARNs (Tabla 4).

5.2. El miARN-143-3p y su papel en la neuroinflamación tras un abuso de alcohol.

Uno de los miARNs que validamos su expresión en las diferentes condiciones experimentales y que evaluamos su regulación en la expresión de diferentes genes fue el miARN-143-3p. La expresión de este miARN disminuye con el tratamiento crónico de alcohol en corteza de animales WT, sugiriendo un aumento en la expresión de genes que regulaba. Para ello, buscamos el interactoma de este miARN (Fig.7), y evaluamos la expresión de algunos genes implicados en la respuesta inmune (Tabla 4), tales como GCNT-1, PTGS2, QK-1, SLC12A6 y VAPB en corteza cerebral de animales WT con o sin consumo de alcohol.

Nuestros resultados demuestran que el consumo de alcohol incrementa la expresión en ciertos genes como el PTGS2, que codifica el mediador inflamatorio COX-2 (Hla and Neilson, 1992) y el QKI que participa en diferenciación de oligodendrocitos y formación de la mielina (Ryder and Williamsom, 2004), mientras que el mismo tratamiento disminuye su expresión en ratones TLR4-KO. Hay que resaltar, que un aumento de COX-2 se produce en procesos de neuroinflamación y en trastornos neurodegenerativos (Teismann, 2012), y resultados anteriores del laboratorio han demostrado que el consumo crónico de alcohol incrementa significativamente los niveles de COX-2 en la corteza de los ratones WT tratados crónicamente con etanol (Valles et al, 2004; Alfonso-Loeches et al., 2010). Además, el abuso de alcohol induce disfunciones en la estructura de la mielina (Alfonso-Loeches et al., 2012) correlacionándose con la expresión de QKI. Es interesante resaltar, que estos efectos no se observan en el córtex de los ratones TLR4-KO tratados o no tratados con etanol. Por tanto, los resultados tendrían cierta coherencia y explicarían las acciones del etanol en la corteza cerebral.

Sin embargo, no en todos los genes evaluados y regulados por el miARN-143 observamos un incremento en su expresión, ya que los genes GCNT-1, SLC12A6 o VAPB, disminuye su expresión en la corteza de los ratones WT con consumo de alcohol, mientras que el mismo tratamiento produce un aumento en el córtex de los animales TLR4-KO. Hay que señalar, que gran parte de estos genes están relacionados con transporte vesicular y autofagia, y el consumo de alcohol altera y reduce el transporte

vesicular y los procesos de glicosilación (Tomás et al., 2012), así como los procesos de endocitosis y autofagia (Pla et al., 2014). Al mismo tiempo, observamos incrementos en la expresión de estos genes en los animales TLR4-KO que presentan un abuso de alcohol. Este incremento podría estar mediado por mecanismos de compensación para tratar de revertir los efectos adversos del etanol sobre el transporte vesicular y el aumento de estrés oxidativo, ya que las alteraciones en los procesos de endocitosis y autofagia no se observan en córtex de ratones TLR4-KO tratados con etanol (Pla et al., 2014).

Además, evaluamos algunas proteínas que codifican los genes GCNT-1, implicado en infiltración leucocitaria (Marth and Grewal, 2008), y de QKI, relacionado con procesos de mielinización (Ryder et al., 2004). En la Fig. 9C se muestra que QKI presenta un aumento significativo mientras que GCNT-1 presenta una tendencia a disminuir sus niveles en la corteza de ratones WT con abuso de alcohol, cuando comparamos con sus controles, mientras que no se produjeron cambios significativos en los ratones TLR4-KO tratados y no tratados crónicamente con alcohol.

Adicionalmente, puesto que el miARN-143 modula el reclutamiento de los inflammasomas AIM2 y NLRP3 (Momeni et al., 2013) e induce la activación de la caspasa-1 (Sagulenko et al., 2013), analizamos la posible activación del inflammasoma por el consumo de alcohol. Demostramos que el tratamiento de alcohol induce una activación del inflammasoma y la liberación de la citoquina IL-1 β en el córtex de animales WT, aunque estos efectos no se observan en el de animales TLR4-KO tratados con etanol. Estos resultados que coinciden con datos anteriores del laboratorio (Alfonso-Loeches et al., 2014) demuestran que una de las vías por las que el consumo de alcohol causa y amplifica la neuroinflamación es a través de la activación del inflammasoma.

En resumen, los resultados obtenidos confirman resultados de la secuenciación masiva, tras validar algunos miARNs que se expresan diferencialmente por el consumo de alcohol en corteza cerebral de animales WT y TLR4-KO, e indican que el alcohol activa vías de inflamación, estrés oxidativo y daño neural. Estos resultados abren la posibilidad de búsqueda de biomarcadores plasmáticos en la neuroinflamación y daño neural asociados al consumo de alcohol.

6. CONCLUSIONES

- 1- Los resultados de la secuenciación masiva y niveles de expresión de miARNs en el córtex cerebral de ratones WT vs. WT+EtOH muestran que aproximadamente 70 miARNs se encuentran diferencialmente expresados por el consumo crónico de alcohol. De estos, 45% están involucrados en mecanismos de respuesta inmunitaria o señalización inflamatoria y el resto en procesos de daño neural.
- 2- Demostramos que el consumo de alcohol induce un aumento en la expresión de ciertos miARNs (miARN-181c, miARN-486b y miARN-125b, miARN-21^a; miARN-146^a, miARN-26a), mientras que otros sufren una disminución en su expresión como el miARN-183, el miARN-143 y las familias del miARN-9 (miR-9-1, 9-2 y 9-3) y del miARN-let7 (miR-let.7f, etc.) en el córtex cerebral de los animales WT. La expresión de estos miARNs no varía en el córtex de los animales TLR4-KO, o bien se producen cambios para compensar los efectos del etanol.
- 3- Todos los miRNAs que expresan diferencialmente con el consumo de alcohol han sido validados mediante ddPCR o RT-qPCR.
- 4- Finalmente, hemos validado la expresión del miARN-143-3p y algunos de los genes que regula y se asocian a vías de señalización de neuroinflamación o daño neural, confirmando el papel de este miARN en los efectos neuroinflamatorios del alcohol en cerebro y sugiriendo su posible papel como biomarcador.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Alexander-Kaufman K, James G, Sheedy D, Harper C, Matsumoto I. Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. *Mol Psychiatry*. Nature Publishing Group; 2006 Jan 20;11(1):56–65.
2. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage. *J Neurosci*. 2010 Jun 16;30(24):8285–95.
3. Alfonso-Loeches S, Pascual M, Gómez-Pinedo U, Pascual-Lucas M, Renau-Piqueras J, Guerri C. Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia*. 2012 May;60(6):948–64.
4. Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Front Cell Neurosci*. 2014 Aug 1;8:216.
5. Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta J, Morillo-Bargues MJ, Gómez-Pinedo U, Guerri C. Ethanol-induced TLR4/NLRP3 neuroinflammatory response in microglial cells promotes leukocyte infiltration across the BBB. *Neurochem Res*. 2016 Feb 11;41(1–2):193–209.
6. Bernstock JD, Lee Y, Peruzzotti-Jametti L, Southall N, Johnson KR, Maric D, et al. A novel quantitative high-throughput screen identifies drugs that both activate SUMO conjugation via the inhibition of microRNAs 182 and 183 and facilitate neuroprotection in a model of oxygen and glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016 Feb;36(2):426–41.
7. Blanco AM, Perez-Arago A, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C. Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J Neurochem*. Blackwell Publishing Ltd; 2008 Jul 1;106(2):625–39.
8. Blanco AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C. 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*. 2005 Nov 15;175(10):6893–9.
9. Blanco AM, Guerri C. Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:2616–30.
10. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015 Mar 21;33(1):257–90.
11. Chandler LJ, Sutton G, Norwood D, Sumners C, Crews FT. Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol*. 1997 May;51(5):733–40.
12. Chandler LJ, Newsom H, Sumners C, Crews F. Chronic Ethanol Exposure

- Potentiates NMDA Excitotoxicity in Cerebral Cortical Neurons. *J Neurochem.* 1993 Apr;60(4):1578–81.
13. Chen XM, Splinter PL, O'Hara SP, LaRusso NF. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. *J Biol Chem.* 2007 Sep 28;282(39):28929–38.
 14. Collins MA, Zou JY, Neafsey EJ. Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology;* 1998 Feb 1;12(2):221–30.
 15. Collins MA, Neafsey EJ. Alcohol, Excitotoxicity and Adult Brain Damage: An Experimentally Unproven Chain-of-Events. *Front Mol Neurosci. Frontiers Media SA;* 2016;9:8.
 16. Crews FT, Vetreno RP, Broadwater MA, Robinson DL. Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior. *Pharmacol Rev.* 2016 Oct 27;68(4):1074–109.
 17. de la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol.* 1988 Sep;45(9):990–2.
 18. Di Pietro V, Ragusa M, Davies D, Su Z, Hazeldine J, Lazzarino G, et al. MicroRNAs as Novel Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Mild and Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2017 Jun 1;34(11):neu.2016.4857.
 19. Dorin JR, McHugh BJ, Cox SL, Davidson DJ. Mammalian Antimicrobial Peptides; Defensins and Cathelicidins. In: *Molecular Medical Microbiology: Second Edition.* 2014. p. 539–65.
 20. Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jun 5;19(6):586–93.
 21. Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Frontiers in Physiology.* 2015. p. 40.
 22. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical Role of TLR4 Response in the Activation of Microglia Induced by Ethanol. *J Immunol.* 2009 Oct 1;183(7):4733–44.
 23. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A, Guerri C. Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol Immunol.* 2008 Apr;45(7):2007–16.
 24. Griffiths RC, Benito-Sipos J, Fenton JC, Torroja L, Hidalgo A. Two distinct mechanisms segregate Prospero in the longitudinal glia underlying the timing of interactions with axons. *Neuron Glia Biol.* 2007 Feb 13;3(1):75–88.
 25. Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., & Miller, C. C. J. (2017). ER-Mitochondria signaling regulates autophagy. *Autophagy*, 8627(May), 00–00.
 26. Han Y, Dai Q-C, Shen H-L, Zhang X-W. Diagnostic value of elevated serum miRNA-143 levels in sepsis. *J Int Med Res.* 2016 Aug 10;44(4):875–81.

27. Harper C, Dixon G, Sheedy D, Garrick T. Neuropathological alterations in alcoholic brains. Studies arising from the New South Wales Tissue Resource Centre. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2003 Sep;27(6):951–61.
28. Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005. p. 73–8.
29. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson K V. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. 1988 Jan 29;52(2):269–79.
30. Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7384–8.
31. Ignacio C, Hicks SD, Burke P, Lewis L, Szombathyne-Meszaros Z, Middleton FA. Alterations in serum microRNA in humans with alcohol use disorders impact cell proliferation and cell death pathways and predict structural and functional changes in brain. *BMC Neurosci*. 2015 Sep 5;16(1):55.
32. Ikegami Y, Goodenough S, Inoue Y, Dodd PR, Wilce PA, Matsumoto I. Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neurosci Lett*. 2003;349(3):201–5.
33. Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, et al. The Inflammasome Sensor, NLRP3, Regulates CNS Inflammation and Demyelination via Caspase-1 and Interleukin-18. *J Neurosci*. 2010 Nov 24;30(47):15811–20.
34. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer H-D. Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):818–31.
35. Kilic ID, Dodurga Y, Uludag B, Alihanoglu YI, Yildiz BS, Enli Y, et al. MicroRNA -143 and -223 in obesity. *Gene*. 2015 Apr 15;560(2):140–2.
36. Korbo L. Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jan;23(1):164–8.
37. Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience*. 1997 Aug;79(4):983–98.
38. Kril JJ, Halliday GM. Brain shrinkage in alcoholics: A decade on and what have we learned?. *Progress in Neurobiology*. 1999. p. 381–7.
39. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010 Jul 27;11(9):597–610.
40. Ksiazek-Winiarek DJ, Kacperska MJ, Glabinski A. MicroRNAs as novel regulators of neuroinflammation. *Mediators of Inflammation*. Hindawi Publishing Corporation; 2013. p. 172351.
41. Lancaster FE. Alcohol, Nitric Oxide, and Neurotoxicity: Is There a Connection????a Review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1992 Jun;16(3):539–41.
42. Lee H-M, Kim TS, Jo E-K. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep [Internet]*. 2016 Jun [cited 2017 Jul 4];49(6):311–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26996343>

43. Lee RC, Ambros V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-). 2001 Oct 26;294(5543):862–4.
44. Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD. Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Nov;35(11):1928–37.
45. Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, et al. Patterns of Gene Expression in the Frontal Cortex Discriminate Alcoholic from Nonalcoholic Individuals. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Jul 2;31(7):1574–82.
46. Liu J, Asuncion-Chin M, Liu P, Dopico AM. CaM kinase II phosphorylation of slo Thr107 regulates activity and ethanol responses of BK channels. *Nat Neurosci*. NIH Public Access; 2006;9(1):41–9.
47. Loman NJ, Misra R., Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance Comparison of Benchtop High-Throughput Sequencing Platforms. *Nat Biotechnol*. 2012 May 22;30(5):434–9.
48. Marth JD, Grewal PK. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* . 2008 Nov;8(11):874–87.
49. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394–7.
50. Miguel-Hidalgo JJ, Overholser JC, Meltzer HY, Stockmeier CA, Rajkowska G. Reduced glial and neuronal packing density in the orbitofrontal cortex in alcohol dependence and its relationship with suicide and duration of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. NIH Public Access; 2006 Nov;30(11):1845–55.
51. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation*. BioMed Central; 2008 Dec 12;5:53.
52. Momeni M, Mirzaei MR, Zainodini N, Hassanshahi G, Arababadi MK. MiR-143 induces expression of AIM2 and ASC in jurkat cell line. *Iran J Immunol*. 2013 Jun;10(2):103–9.
53. Montesinos J, Alfonso-Loeches S, Guerri C. Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System. *Alcohol Clin Exp Res* . 2016 Nov;40(11):2260–70.
54. Monti PM, Miranda R, Nixon K, Sher KJ, Swartzwelder HS, Tapert SF, et al. Adolescence: booze, brains, and behavior. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Feb;29(2):207–20.
55. Most D, Leiter C, Blednov YA, Harris RA, Mayfield RD. Synaptic microRNAs Coordinately Regulate Synaptic mRNAs: Perturbation by Chronic Alcohol Consumption. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Jan 24;41(2):538–48.
56. Neven B, Callebaut I, Prieur A-M, Feldmann J, Bodemer C, Lepore L, et al. Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2809–15.

57. Nunes KP, Guisbert E, Szasz T, Webb C. The Innate Immune System via Toll-Like Receptors (TLRs) in Type 1 Diabetes - Mechanistic Insights. In: Major Topics in Type 1 Diabetes. InTech; 2015. p. 1–20.
58. Oscar-Berman, M., and Hunter, N. Frontal lobe changes after chronic alcohol ingestion. In: Hunt, W.A., and Nixon, S.J., Eds. Alcohol-Induced Brain Damage, NIAAA Research Monographs No. 22. Rockville, MD: National Institutes of Health, 1993, pp. 121–156.
59. Pla A, Pascual M, Guerri C. Autophagy Constitutes a Protective Mechanism against Ethanol Toxicity in Mouse Astrocytes and Neurons. Am?d?e T, editor. PLoS One. 2016 Apr 12;11(4):e0153097.
60. Qu K, Wang Z, Lin XL et al. MicroRNAs: Key regulators of endothelial progenitor cell functions. Clin Chim Acta Int J Clin Chem 2015; 448:65–73.
61. Quinn SR, O’Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. Int Immunol. 2011 Jul 1;23(7):421–5.
62. Rosenbloom M, Sullivan E V, Pfefferbaum A. Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. Alcohol Res Health. 2003;27(2):146–52.
63. Ruvkun G. MOLECULAR BIOLOGY: Glimpses of a Tiny RNA World. Science (80-). 2001 Oct 26;294(5543):797–9.
64. Ryder SP, Williamson JR. Specificity of the STAR/GSG domain protein Qk1: Implications for the regulation of myelination. RNA. 2004 Sep 1;10(9):1449–58.
65. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. Cell Death Differ. 2013 Sep 3;20(9):1149–60.
66. Saikia P, Bellos D, McMullen MR, Pollard KA, de la Motte C, Nagy LE. miR181b-3p and its target importin α 5 regulate TLR4 signaling in Kupffer cells and liver injury in mice in response to ethanol. Hepatology. 2017 Mar 3;
67. Sathe A and ..Reddy KVR, Inflammation and Cell Signalling, 2014
68. Schock BC, Van der Vliet A, Corbacho AM, Leonard SW, Finkelstein E, Valacchi G, Obermueller-Jevic U, Cross CE & Traber MG (2004). Enhanced inflammatory responses in alpha-tocopherol transfer protein null mice. Arch Biochem Biophys 423:162-169
69. Shekarabi M, Moldrich RX, Rasheed S, Salin-Cantegrel A, Laganière J, Rochefort D, et al. Loss of neuronal potassium/chloride cotransporter 3 (KCC3) is responsible for the degenerative phenotype in a conditional mouse model of hereditary motor and sensory neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. J Neurosci. 2012 Mar 14;32(11):3865–76.
70. Shi, Y. L., Weiland, M., Lim, H. W., Mi, Q. S., & Zhou, L. (2014). Serum miRNA expression profiles change in autoimmune vitiligo in mice. Experimental Dermatology, 23(2), 140–142. <http://doi.org/10.1111/exd.12319>

71. Smith ML, Lopez MF, Archer KJ, Wolen AR, Becker HC, Miles MF. Time-Course Analysis of Brain Regional Expression Network Responses to Chronic Intermittent Ethanol and Withdrawal: Implications for Mechanisms Underlying Excessive Ethanol Consumption. Dopico AM, editor. PLoS One. 2016 Jan 5;11(1):e0146257.
72. Sullivan E V., Pfefferbaum A. Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Aug 15;180(4):583–94.
73. Tam Tam S, Bastian I, Zhou XF, Vander Hoek M, Michael MZ, Gibbins IL, et al. MicroRNA-143 expression in dorsal root ganglion neurons. *Cell Tissue Res*. 2011 Nov 3;346(2):163–73.
74. Tang Y-W. *Molecular medical microbiology*.. 2214 p.
75. Tapocik JD, Solomon M, Flanigan M, Meinhardt M, Barbier E, Schank JR, et al. Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. *Pharmacogenomics J*. 2013 Jun 22;13(3):286–96.
76. Tapocik JD, Ceniccola K, Mayo CL, Schwandt ML, Solomon M, Wang B-D, et al. MicroRNAs Are Involved in the Development of Morphine-Induced Analgesic Tolerance and Regulate Functionally Relevant Changes in Serpini1. *Front Mol Neurosci*. 2016 Mar 24;9:20.
77. Teismann P. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *Biofactors*. 2012 Nov;38(6):395–7.
78. Teng Y, Zhang R, Liu C, Zhou L, Wang H, Zhuang W, et al. miR-143 inhibits interleukin-13-induced inflammatory cytokine and mucus production in nasal epithelial cells from allergic rhinitis patients by targeting IL13R α 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 30;457(1):58–64.
79. Thounaojam MC, Kaushik DK, Basu A. MicroRNAs in the brain: it's regulatory role in neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2013 Jun 12;47(3):1034–44.
80. Tomás M, Marín MP, Martínez-Alonso E, Esteban-Pretel G, Díaz-Ruiz A, Vázquez-Martínez R, et al. Alcohol induces Golgi fragmentation in differentiated PC12 cells by deregulating Rab1-dependent ER-to-Golgi transport. *Histochem Cell Biol*. 2012 Sep 22;138(3):489–501.
81. Tsai P-C, Bake S, Balaraman S, Rawlings J, Holgate RR, Dubois D, et al. MiR-153 targets the nuclear factor- κ B family and protects against teratogenic effects of ethanol exposure in fetal neural stem cells. *Biol Open*. 2014 Jul 25;3(8):741–58.
82. Ureña-Peralta J. Tesis doctoral: Papel de los receptores TLR y el inflamasoma en el daño que induce el etanol en el cerebro. Universidad de Valencia. 2016 Sept.
84. Vallés SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol*. 2004 Oct;14(4):365–71.
85. Wade WF. Chapter 26 – Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Network. In: *Molecular Medical Microbiology*. 2015. p. 449–74.
86. Yang T-Q, Lu X-J, Wu T-F, Ding D-D, Zhao Z-H, Chen G-L, et al. MicroRNA-

16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor- κ B1/MMP9 signaling pathway. *Cancer Sci.* 2014 Mar 105(3):265–71.

87. Yang Y, Ye Y, Su X, He J, Bai W, He X. MSCs-Derived Exosomes and Neuroinflammation, Neurogenesis and Therapy of Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci.* 2017 Feb 28;11:55.

8. ANEXO I

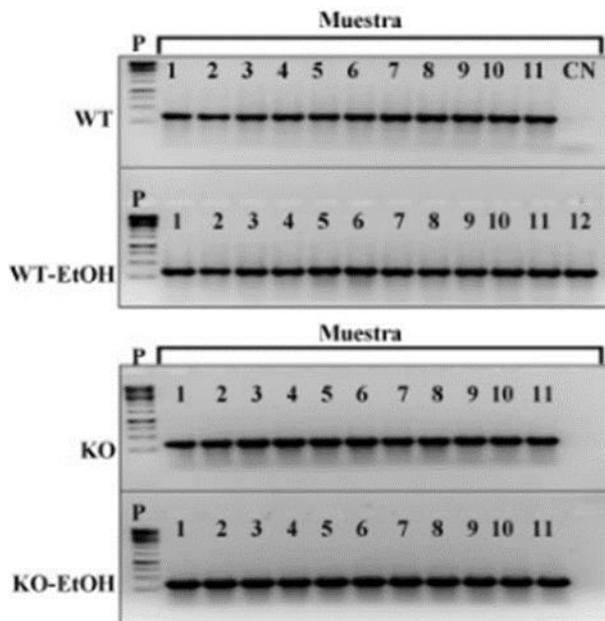


Figura 10. Comprobación de la calidad del ADNc mediante electroforesis en gel de agarosa. Tras la retrotranscripción (RT), observamos la banda del ADNc amplificado para cada una de las muestras de estudio. El control negativo (CN) se observa en la localización 12 (gel WT).

9. ABREVIATURAS

TLR4 → Toll-like receptor 4

CIPF → Centro de Investigación Príncipe Felipe

NF-κB → Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, complejo proteico que controla la transcripción el ADN.

TLR → Toll-like receptor

NLR → NOD-like receptor

PRRs → Pattern recognition receptors

PAMPs → Pathogen associated molecular patterns

DAMPs → Danger associated molecular patterns

IRFs → Factores reguladores del interferón.

IL → Interleucina

LPS → Lipopolisacárido

AP-1 → Proteína activadora 1, un factor de transcripción.

ARN → Ácido ribonucleico.

ARNsi → ARN pequeño de interferencia

miARN → micro ARN, ARN monocatenario de pequeño tamaño

ARNm → ARN mensajero

KO → Knock-out, deficiente

WT → Wild type, silvestre

TLR4^{+/+} → Silvestre para el TLR4

TLR4^{-/-} → Knock out para el TLR4

WT+EtOH → Silvestre con tratamiento crónico de alcohol

TLR4-KO → Knock out para TLR4

TLR4-KO+EtOH → Knock out para TLR4 con tratamiento crónico de alcohol

KO+EtOH → Knock-out para TLR4 con tratamiento crónico de alcohol

PCR → Reacción en cadena de la polimerasa, técnica de amplificación del material genético.

Unidades de medida: Nm → Nanómetro ng → Nanogramo μg → Microgramo

μl → Pícolitro ml → Mililitro rpm → Revoluciones por minuto

rcf → Online relative centrifugal force o G-force, medida de centrifugación

xg → Fuerza centrífuga

ADN → Ácido desoxirribonucleico.

RT-PCR → Real time PCR

dNTPs → Desoxirribonucleótidos trifosfato

cDNA → DNA complementario

miR → Micro ARN

ncARNs → ARNs no codificantes

mM → milimolar

ddPCR → Droplet digital PCR, método para realizar PCR digitales

SM → Secuenciación masiva

Agradecimientos: Tanto a la Dra. Consuelo Guerri Sirera y a la Dra. Silvia Alfonso Loeches, porque sin ambas este TFM habría sido casi imposible. También a los bioinformáticos (Dr. Codoñer y Dr. Panadero) que han estado involucrados en la obtención y el análisis de los datos de la secuenciación masiva.