

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSEAMN)**



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRÍNCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Nuevo procedimiento de cultivo primario de astrocitos para evaluar los efectos del etanol en la estimulación de la ruta del receptor TLR4 y sus consecuencias

Trabajo Final de Grado en Biotecnología
Curso académico 2020 - 2021

Autor: Miguel Ángel Marzo Ponce

Dirigido por: Dra. Consuelo Guerri Sirera

Codirigido por: Dr. Juan R. Ureña Peralta

Tutor académico: Prof. Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco



Valencia, 5 de Julio de 2021

Título

Nuevo procedimiento de cultivo primario de astrocitos para evaluar los efectos del etanol en la estimulación de la ruta del receptor TLR4 y sus consecuencias.

Resumen

El alcohol es una droga psicoactiva y neurotóxica cuyo abuso puede provocar alteraciones y lesiones cerebrales, junto con neurodegeneración. Además, su consumo excesivo en patrones de *binge-drinking* entre los jóvenes se ha incrementado en los últimos años, siendo el responsable del 13,5% de muertes en este grupo. Estudios recientes del Laboratorio de Patología Molecular y Celular del Alcohol del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) han puesto de manifiesto el papel del alcohol en la activación de la ruta de los receptores TLR en cultivos de astrogliá y microgliá. En concreto, el etanol es capaz de estimular la ruta del receptor TLR4, provocando la señalización del factor de transcripción NF- κ B y la posterior liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios, tales como TNF- α o IL-1 β . Actualmente, los experimentos de investigación utilizan un número elevado de animales de laboratorio, por lo que resulta esencial la necesidad de planificar un buen diseño experimental y reducir el número de modelos animales, sin que esto afecte a la validez y reproducibilidad de los datos. Por tanto, el objetivo de este trabajo comprende la realización de una comparativa entre un protocolo tradicional de cultivo primario de astrocitos con respecto a una implementación de este, basada en el pase de astrocitos. Para ello, el diseño experimental se fundamenta en el análisis de RT-qPCR e inmunofluorescencia de marcadores inflamatorios relacionados con la ruta de estimulación del receptor TLR4, observando sus niveles de expresión en cultivos tratados con etanol y lipopolisacárido (LPS). Los datos preliminares muestran que el etanol altera los patrones de expresión de los marcadores inflamatorios estudiados en el cultivo tradicional, pero no así en los cultivos alternativos, por lo que se puede concluir la necesidad de realizar futuros experimentos para determinar la significancia de los resultados obtenidos y poder implementar los cultivos.

Palabras clave

Astrocitos; Etanol; LPS; Neuroinflamación; TLR4

Autor del TFG: Miguel Ángel Marzo Ponce

Tutora: Dra. Consuelo Guerri Sirera

Cotutor: Dr. Juan R. Ureña Peralta

Tutor académico: Prof. Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

Valencia, 5 de Julio de 2021

Title

New primary astrocyte culture procedure to evaluate the effects of ethanol on the stimulation of the TLR4 receptor pathway and its consequences.

Abstract

Alcohol is a psychoactive and neurotoxic drug whose abuse can cause brain alterations and lesions, along with neurodegeneration. Moreover, its excessive consumption in binge-drinking patterns among young people has increased in recent years, being responsible for 13,5% of deaths in this group. Recent studies by the Laboratory of Molecular and Cellular Pathology of Alcohol at the Príncipe Felipe Research Centre (CIPF) have highlighted the role of alcohol in the activation of the TLR receptor pathway in astroglia and microglia cultures. Specifically, ethanol can stimulate the TLR4 receptor pathway, leading to signalling of transcription factor NF- κ B and the subsequent release of cytokines and other inflammatory mediators, such as TNF- α or IL-1 β . Currently, research experiments use a large number of laboratory animals, making it essential to plan a good experimental design and reduce the number of animal models, without affecting the validity and reproducibility of the data. Therefore, the aim of this work is to compare a traditional protocol for primary astrocyte culture with an implementation based on astrocyte passaging. For this purpose, the experimental design is based on RT-qPCR and immunofluorescence analysis of inflammatory markers related to the TLR4 receptor stimulation pathway, observing their expression levels in ethanol and lipopolysaccharide (LPS)-treated cultures. Preliminary data show that ethanol alters the expression patterns of the inflammatory markers studied in the traditional culture, but not in the alternative cultures, so it can be concluded that future experiments are needed to determine the significance of the results obtained and to implement the cultures.

Keywords

Astrocytes; Ethanol; LPS; Neuroinflammation; TLR4

Author of the DFP: Miguel Ángel Marzo Ponce

Tutor: Dra. Consuelo Guerri Sirera

Cotutor: Dr. Juan R. Ureña Peralta

Academic Tutor: Prof. Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

Valencia, 5th of July 2021

Agradecimientos

Jamás pensé que llegaría este día, donde mis últimos cuatro años culminan con la presentación de este trabajo. Cuatro años en los que he conocido gente nueva, he aprendido más de lo que imaginaba y mi vida ha cambiado a mejor.

En primer lugar, quiero agradecer a Chelo el haberme dado la oportunidad de pasar estos meses en el I-05 y abrirme las puertas al mundo de la investigación y la neurociencia. A Susana, por enseñarme desde el día uno absolutamente todo lo que he aprendido, siempre con una sonrisa y dispuesta a ayudar. Por no poner ninguna pega cuando alguna vez la he liado en el laboratorio, por escuchar mis dramas y por animarme cuando lo veía todo negro. Es un gusto haber trabajado a tu lado y cualquier laboratorio estaría encantado de tenerte.

A Juan, por ayudarme a mejorar mis inseguridades y nerviosismo, por su infinita paciencia y sus opiniones. Me acuerdo perfectamente cuando me dijiste que tu objetivo era hacernos salir mejor de lo que entramos. Y en mi caso, cuando comparo cómo entré y cómo he salido, me has ayudado muchísimo a cumplir ese objetivo. A Paco, por ayudarme todo lo posible en la realización de este trabajo, aún teniendo la tesis de por medio, por decirme cosas a mejorar y echarme un cable cuando ha sido necesario. Y al resto de miembros del I-05, Carlos, Álex, Majo y María, me he sentido muy a gusto trabajando con todos vosotros. Han sido unos meses intensos, con momentos de estrés, pero sin duda han merecido la pena.

También me gustaría agradecer a mis compis de carrera todo lo que han hecho por mí. A Carla, Edu, Mayka, Javi, María y al resto del grupo Cumple, gracias por los almuerzos en cafetería, los dramas y también las risas. Nos hemos apoyado mutuamente y seguiremos haciéndolo en el futuro. Ahora estamos en una etapa de cambios y, aunque cada uno tome caminos distintos, jamás olvidaré todos los momentos que hemos vivido.

A mis amigos de siempre, Álvaro, Paula, Darío y Alma, por aguantarme todo, hasta cuando hemos pasado semanas sin vernos, por esas cenitas, las sangrías, los viajecitos, los consejos que me habéis dado y por estar ahí. Estoy inmensamente feliz de teneros a mi lado.

Y, por último, quiero agradecer a mi familia, a mi hermana Elena y a mis padres todo el apoyo que me han dado, no sólo para este trabajo, sino desde siempre.

Índice de contenidos

1. Introducción.....	1
1.1. El sistema neuroinmune y las células de la glía	1
1.2. Los PRRs y la neuroinflamación	2
1.2.1.Receptores de Reconocimiento de Patrones.....	2
1.2.2.Neuroinflamación	4
1.3. El alcohol y la respuesta neuroinflamatoria	5
1.4. El uso de animales	6
1.4.1.Situación actual respecto al número de animales de laboratorio utilizados	6
1.4.2.Necesidad de reducción y planificación de un buen diseño experimental	7
2. Objetivos	9
3. Materiales y Métodos.....	10
3.1. Animales de experimentación	10
3.2. Cultivo primario de astrocitos corticales	10
3.3. Tratamiento de astrocitos	12
3.4. Aislamiento total de RNA y cuantificación por NanoDrop	12
3.5. Determinación del nivel de expresión génica RT-qPCR.....	12
3.6. RT-qPCR de microRNAs.....	14
3.7. Inmunofluorescencia	15
3.8. Análisis estadístico	17
4. Resultados.....	18
4.1 La población de astrocitos se mantiene constante en los sucesivos pases de cultivo	18
4.2 El etanol no tiene efecto sobre la activación de las rutas de señalización de TLR4 en los cultivos alternativos.....	19
4.3 Los niveles de expresión de miR-21-5p y miR-146a-5p en respuesta al etanol y LPS .	23
5. Discusión	26
6. Conclusiones	29
7. Referencias Bibliográficas.....	30

Índice de tablas, figuras y ecuaciones

• Tabla 1. Genes estudiados para el análisis de RT-qPCR	13
• Tabla 2. Datos de los microRNAs utilizados en el análisis de qPCR	15
• Tabla 3. Datos de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica de inmunofluorescencia	16
<hr/>	
• Figura 1. Esquema de la organización de tipos celulares del SNC	1
• Figura 2. Esquema de los receptores TLR.....	3
• Figura 3. Porcentaje de muertes atribuibles al alcohol por categoría de enfermedad en individuos alcohólicos	5
• Figura 4. Representación esquemática del diseño experimental del trabajo	11
• Figura 5. Estudio de inmunofluorescencia de los astrocitos del cultivo alternativo	18
• Figura 6. Estudio de la expresión diferencial de <i>IRAK1</i> mediante RT-qPCR.....	20
• Figura 7. Estudio de la expresión diferencial de <i>MAPK14</i> mediante RT-qPCR.....	20
• Figura 8. Estudio de la expresión diferencial de <i>TNF-α</i> mediante RT-qPCR.....	21
• Figura 9. Estudio de la expresión diferencial de <i>NF-κB</i> mediante RT-qPCR	22
• Figura 10. Estudio de la expresión diferencial de <i>IL-1β</i> mediante RT-qPCR.....	22
• Figura 11. Estudio de la expresión diferencial de miR-21-5p mediante RT-qPCR.....	24
• Figura 12. Estudio de la expresión diferencial de miR-125b-5p mediante RT-qPCR.....	24
• Figura 13. Estudio de la expresión diferencial de miR-146a-5p mediante RT-qPCR	25
<hr/>	
• Ecuación 1. Fórmula de Pfaffl para llevar a cabo el análisis de expresión diferencial de los genes a estudio.....	14

Índice de abreviaturas

3Rs: Reemplazo, Reducción y Refinamiento

ARRIVE: Investigación con animales: Informar sobre los experimentos in vivo (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

cDNA: DNA complementario

CEEA: Comité de Ética de Experimentación Animal

CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe

Ct: Número de ciclos (*Cycle Threshold*)

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Peligro (*Damage Associated Molecular Patterns*)

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DEPC-H₂O: Agua desionizada con dietilpicarbonato

DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Eagle Modified Medium*)

FBS: Suero Bovino Fetal (*Fetal Bovine Serum*)

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

IBA1: Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IRAK1: Quinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MAPK14: Proteína quinasa activada por mitógenos 14

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

miRNAs: microRNAs

Myd88: Factor de respuesta primario de diferenciación mieloide 88

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NLRs: Receptores de tipo NOD

NP-40: Nonil Fenoxipolietoxietanol 40

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)

PBS: Solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate-Buffered Saline*)

PEG: Polietilenglicol

PPIA: Peptidil prolil isomerasa A

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones

RLRs: Receptores de Tipo RIG

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

SEM: Error Estándar de la Media (*Standard Error of the Mean*)

SNC: Sistema Nervioso Central

SPF: Zona libre de gérmenes y patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*)

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TLR4: Receptor 4 de Tipo Toll

TLRs: Receptores de Tipo Toll

TM: Temperatura de fusión (*Melting Temperature*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

WT: Fenotipo silvestre (*Wild Type*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El sistema neuroinmune y las células de la glía

El sistema nervioso central (SNC), formado por el cerebro y la médula espinal, está compuesto por varios tipos celulares, entre ellos neuronas y células de la glía, las cuales incluyen principalmente microglía, astroglia y oligodendroglía. Las células gliales presentan un alto grado de diversidad y son componentes fundamentales del SNC, regulando muchas funciones cerebrales, entre ellas actividad neuronal, función endocrina y desarrollo del propio SNC (Miller *et al.*, 2017, Pascual *et al.*, 2020). Del mismo modo, mantienen la homeostasis, el equilibrio metabólico y eliminan desechos celulares, todo ello para establecer un correcto funcionamiento de las complejas redes neuronales (Pósfai *et al.*, 2019).

Por otro lado, los oligodendrocitos también tienen una función destacada en el SNC y expresan factores de crecimiento, afectando a la supervivencia de neuronas y sirviéndoles como apoyo trófico. Además, forman vainas de mielina en torno a los axones de múltiples neuronas (*Figura 1*) (Du y Dreyfus, 2002).

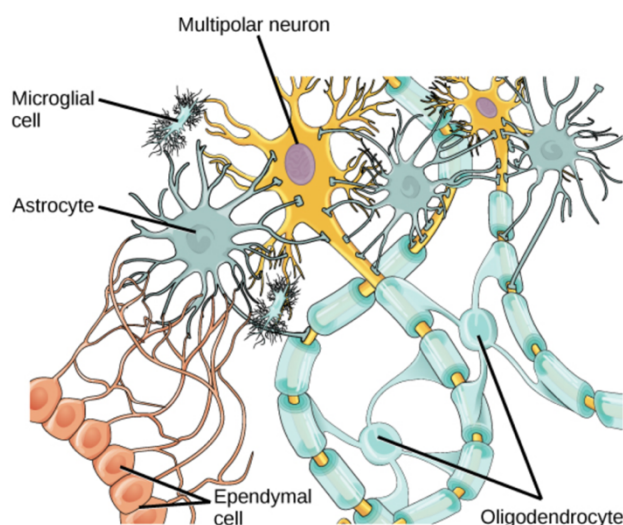


Figura 1. Esquema de la organización de los tipos celulares del sistema nervioso central (SNC), donde las células gliales dan apoyo trófico a las neuronas, manteniendo su entorno (Figura adaptada de Molnar y Gair, 2015)

El sistema neuroinmune en el SNC consta, además de la barrera hematoencefálica, de células especializadas que responden a amenazas que perturban el microambiente neuronal y participan en señalización neuroinmune. Estas células son la microglía, la astroglia y mastocitos, aunque también se ha demostrado que células del sistema inmune como macrófagos o monocitos pueden extravasarse al SNC durante la respuesta inmune (Talbot *et al.*, 2016, Jassam *et al.*, 2017).

El sistema neuroinmune tiene como función proteger al SNC frente a patógenos. Para ello, se encarga del mantenimiento de la barrera hematoencefálica, interviene en la neuroinflamación y reparación de tejidos (Nasr *et al.*, 2019). En algunos casos, se ha visto que puede participar en la etiología de ciertas patologías, perdurando en un estado inflamatorio crónico, con problemas en la plasticidad celular y fisiológica (O'Reilly *et al.*, 2020). El sistema neuroinmune también cuenta con mastocitos, otro tipo celular que desempeña funciones en procesos fisiológicos y patológicos. Éstas incluyen defensa contra agentes infecciosos, presentación antigénica y reclutamiento de linfocitos, así como angiogénesis y remodelación tisular (Forsythe, 2019).

Astrocitos y microglía poseen una coordinación entre ambos a la hora de realizar sus funciones, siendo células equiparables a macrófagos y células estromales de otros órganos respectivamente. (Vainchtein y Molofsky, 2020). Mientras que la microglía se activa para ejercer su actividad fagocítica, los astrocitos se hipertrofian para reforzar la barrera hematoencefálica, formar una barrera física y mantener la homeostasis y la integridad estructural del cerebro. (Liu *et al.*, 2020). Estudios realizados con modelos murinos sugieren que la microglía constituye una primera línea de defensa, mientras que los astrocitos liberan mediadores inflamatorios que ayudan a la microglía y pueden formar cicatrices gliales, limitando el daño en la zona afectada (Matejuk y Ransohoff, 2020).

1.2 Los PRRs y la neuroinflamación

1.2.1 Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs)

Los procesos inflamatorios del sistema neuroinmune presentan una serie de receptores especializados en detectar patógenos, los cuales son conocidos colectivamente como PRRs (Receptores de Reconocimiento de Patrones). Pueden encontrarse en citoplasma, endosomas, membrana plasmática o suero. Dentro de los mismos, destacan los receptores de tipo Toll (TLRs), los receptores de tipo RIG (RLRs) y los receptores de tipo NOD (NLRs) (Vidya *et al.*, 2018). Estos PRRs actúan como sensores ante condiciones de estrés, lesiones tisulares e invasión patogénica. Por tanto, son capaces de reconocer señales DAMPS (Patrones Moleculares Asociados a Peligro), las cuales engloban componentes de células apoptóticas que actúan como señales endógenas de estrés; y señales PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), las cuales son expresadas por patógenos o microbios invasores y comprenden lípidos, lipoproteínas, ácidos nucleicos y/o proteínas (Kawasaki y Kawai, 2014).

La familia de los receptores *Toll-like* (TLR) es una familia de proteínas que comprende un amplio abanico de tipos de receptores capaces de detectar diferentes conjuntos de PAMPs y DAMPs. Se han descrito 10 TLRs en humano (1-10) y 12 en ratón (1-13) (Figura 2), con gran conservación evolutiva entre ambos (Nie *et al.*, 2018). Los TLRs son derivados de una familia de genes Toll y las señales que reciben permiten producir síntesis y secreción de factores de transcripción y citocinas proinflamatorias (El-Zayat *et al.*, 2019). Como se observa en la Figura 2, estos receptores ejercen múltiples funciones, siendo una de las más relevantes la activación del factor de transcripción *NF- κ B* y producción de factores de crecimiento como *IL-1 β* , *TGF- β* y *TNF- α* . Entre ellos, destaca el receptor TLR4, implicado en la estimulación de la respuesta inmune y que reconoce al ligando LPS (lipopolisacárido).

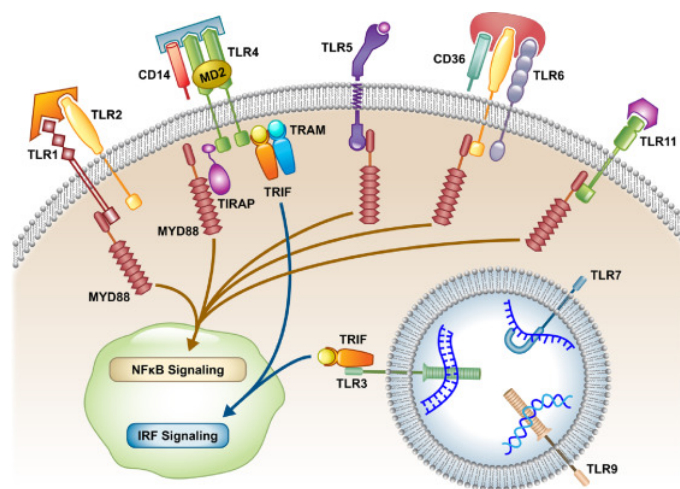


Figura 2. Esquema de los receptores de tipo Toll (TLRs), donde se observa tanto la localización como la señalización de los mismos, una vez se unen a sus ligandos, activando factores de transcripción específicos como *NF- κ B* (Figura adaptada de Ibrahim *et al.*, 2020)

La expresión de TLRs puede variar entre tipos celulares, dependiendo de la especie, del estado de activación y de la autorregulación debida a la señalización de éstos (Jack *et al.*, 2005). Los TLRs actúan como homodímeros o heterodímeros con otros TLRs, reconociendo distintos tipos de PAMPs (Zhang *et al.*, 2002).

La transducción de la señal de TLRs es compleja y dependiente de la presencia de correceptores y proteínas accesorias, regulando las rutas de señalización iniciadas por cada receptor (Kawasaki y Kawai, 2014). Cuando los TLRs detectan patógenos invasores, se unen a estos ligandos, formando el complejo TLR-PAMP. Así se produce una dimerización de los TLR que induce una cascada de señalización con el objetivo final de incrementar la expresión de genes de citocinas, interferón, quimiocinas, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), entre otros, aumentando funciones efectoras de fagocitosis y presentación de antígenos a células T (Arumugam *et al.*, 2008).

1.2.2 Neuroinflamación

La neuroinflamación se describe como una respuesta inflamatoria producida en el cerebro y la médula espinal, la cual está mediada por la producción de una serie de mediadores inflamatorios: citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otros. Esta respuesta es dirigida contra elementos patogénicos que pueden afectar la homeostasis del SNC y se ha relacionado con procesos como infiltración de macrófagos/linfocitos, activación glial, desmielinización y pérdida axonal (Pittock y Lucchinetti, 2007, Morales *et al.*, 2016).

La neuroinflamación es un proceso fisiológico que cumple un papel protector en el SNC. Sin embargo, una respuesta inflamatoria prolongada debida a un estímulo constante o a la imposibilidad de su resolución, puede tener efectos perjudiciales para el organismo (Dokalis y Prinz, 2019). El grado de daño neuroinflamatorio depende de la duración, del contexto y de la estimulación que se produzca. Por ejemplo, la neuroinflamación puede llevar desde el reclutamiento de células inmunes hasta la muerte celular (DiSabato *et al.*, 2016). Esta sobreactivación de señales neuroinmunes puede deberse a la exposición a factores ambientales o la formación de factores endógenos, tales como patógenos, toxinas, estrés y agregados de proteínas (Pascual *et al.*, 2020).

La producción de los mediadores inflamatorios es llevada a cabo por células gliales residentes activadas del SNC: microglía y astrogía (Norden *et al.*, 2016). En condiciones fisiológicas, estas células se encuentran en un estado quiescente, caracterizado por la secreción de niveles bajos de citocinas, y la liberación controlada de neurotransmisores y hormonas. Asimismo, estas células regulan rutas de comunicación entre neuronas y otras estructuras cerebrales, así como funciones en procesos neuroinflamatorios de vigilancia inmunitaria (Lian y Zheng, 2016).

En respuesta a una exposición frente a DAMPs o PAMPs, estas células se activan, alternando su morfología y funciones, y siendo capaces de producir mediadores inflamatorios. Por tanto, la inflamación presenta un papel causal muy importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como las lesiones cerebrales traumáticas y accidentes cerebrovasculares, entre otros.

Dentro de la neuroinflamación, estudios previos han observado una regulación de la función génica mediada por microRNAs (miRNAs). Estos oligonucleotidos conforman una clase de RNAs pequeños no codificantes que regulan negativamente la expresión génica, interfiriendo con la región 3' UTR de RNAs mensajeros y promoviendo su degradación o bloqueando su

traducción, dependiendo del grado de complementariedad (Su *et al.*, 2019). Normalmente, los genes son transcritos por la RNA polimerasa II, en forma de una estructura *stem-loop*. Estos miRNAs pueden ser regulados a nivel transcripcional y también en los diferentes pasos de su biogénesis (Slota y Booth, 2019). Asimismo, pueden ser liberados por las células a partir de vesículas extracelulares, tales como exosomas, por lo que miRNAs (presentes en diversas enfermedades) pueden participar en la comunicación intercelular (Bayraktar *et al.*, 2017).

1.3 El alcohol y la respuesta neuroinflamatoria

El alcohol es una droga psicoactiva ampliamente integrada en la sociedad actual. Derivado directa o indirectamente de su consumo, se producen cada año 3 millones de muertes a nivel mundial. El consumo de alcohol es considerado un factor relevante en más de 200 lesiones y enfermedades, incluyendo trastornos mentales, cirrosis hepática, enfermedades cardiovasculares y algunos cánceres. El interés por el consumo compulsivo de alcohol (*binge-drinking*) ha aumentado en las últimas décadas, siendo especialmente común en los jóvenes desde la adolescencia hasta la edad adulta temprana (Lannoy *et al.*, 2021). Especialmente, estos patrones de *binge-drinking* suponen que el 13,5% de muertes en este grupo sean atribuibles al alcohol (Informe sobre la Situación Mundial sobre el Alcohol y la Salud, Organización Mundial de la Salud, 2018). Como se muestra en la *Figura 3*, un elevado número de muertes debidas a enfermedades digestivas y cardiovasculares, además de diabetes, son atribuibles al alcohol.

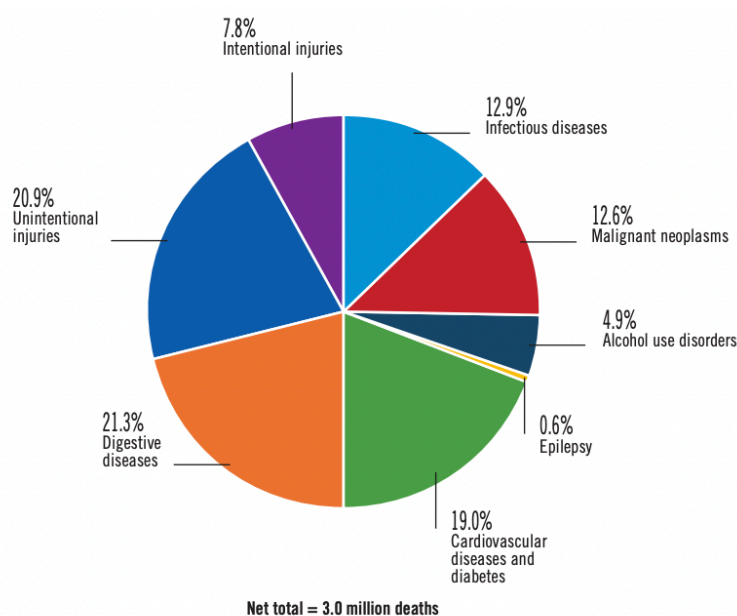


Figura 3. Porcentaje de muertes atribuibles al alcohol por categoría de enfermedad en individuos alcohólicos (Figura adaptada del Informe sobre la Situación Mundial sobre el Alcohol y la Salud, Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018).

Estudios han demostrado que el alcohol tiene un impacto significativo en el sistema neuroinmune, contribuyendo a la adicción, así como a la expresión de factores neuroinmunes que modulan funciones cerebrales, tales como actividad neuronal y desarrollo del SNC (Cui *et al.*, 2014).

En los últimos años, se ha demostrado que el consumo de alcohol produce una respuesta neuroinflamatoria mediante la activación del anteriormente nombrado TLR4 (Blanco *et al.*, 2005, Fernández-Lizarbe *et al.*, 2008). Esta respuesta inflamatoria inducida por el consumo de alcohol desemboca en daño y muerte celular. El mecanismo por el cual el alcohol es capaz de activar este receptor transmembrana no está totalmente esclarecido, pero estudios del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Alcohol indican que podría estar haciéndolo mediante la movilización de balsas lipídicas, las cuales favorecerían la dimerización y activación del TLR4 (Blanco *et al.*, 2008, Fernández-Lizarbe *et al.*, 2008).

El alcohol es un compuesto neurotóxico que puede inducir cambios estructurales, moleculares y morfológicos a nivel cerebral. Por ello, un abuso crónico excesivo de alcohol deteriora la transmisión de señales neuronales (Alfonso-Loeches *et al.*, 2012). También se ha demostrado que patrones de *binge-drinking* de alcohol están asociados con una alteración de la plasticidad sináptica y un deterioro de las fibras de mielina. Se ha visto que estos efectos no ocurren en animales *knock-out* para el TLR4, poniendo de manifiesto el importante papel que éste cumple en los efectos neurotóxicos asociados al consumo del alcohol. (Montesinos *et al.*, 2015).

1.4 El uso de animales

Actualmente, el uso de animales de experimentación ha beneficiado a la investigación en múltiples áreas, siendo los ratones y otros roedores el 95% de animales utilizados. Esto se debe tanto a las similitudes anatómicas como los procesos y mecanismos fisiológicos internos que comparten con los humanos (Rai y Kaushik, 2018). Los estudios con animales consumen muchos recursos debido a la puesta a punto de éstos: se necesitan varios individuos adultos para el apareamiento, junto con el periodo de gestación de las hembras, por lo que los animales son mantenidos durante largos periodos de tiempo.

1.4.1 Situación actual respecto al número de animales de laboratorio utilizados

Alrededor de 115 millones de animales al año son utilizados en experimentos de laboratorio. (Taylor *et al.*, 2008). Su uso es esencial para el avance de nuevas tecnologías y el desarrollo de medicamentos. Todo ello requiere resultados de experimentación animal para poder otorgar

permisos y autorizaciones, con el objetivo de realizar ensayos clínicos de diversos medicamentos e investigaciones para el descubrimiento de fármacos (Rai y Kaushik, 2018).

Actualmente, hay una gran problemática en el uso de animales en los laboratorios de investigación. En algunos casos, no se comprueba la validez de resultados publicados, los cuales no son reproducibles debido a varios factores (modelos animales mal validados, uso de estadística inapropiada, error sistemático, entre otros) y los animales usados en estas investigaciones no concluyentes son desaprovechados. De hecho, durante la última década, el porcentaje de validez científica de los datos de investigaciones biomédicas no ha sido muy elevado, evidenciándose una escasa reproducibilidad de los experimentos y problemas a la hora de plantear diseños experimentales con modelos animales (Würbel, 2017).

Por este motivo, las investigaciones científicas requieren de justificación en sus planteamientos experimentales cuando se utilizan animales, en parte también por las exigencias de la sociedad general en cuestiones éticas y morales. Esta justificación debe estar basada en la adopción de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), concepto desarrollado por Russell y Burch, que tiene un beneficio directo sobre la calidad de los datos (Sneddon *et al.*, 2017). El reemplazo implica el uso de alternativas distintas a los animales, la reducción hace referencia a la minimización del número de animales para alcanzar los objetivos de los experimentos y el refinamiento implica mejorar el bienestar de los animales y reducir la invasividad de las técnicas utilizadas (Russell y Burch, 1959).

1.4.2 Necesidad de reducción y planificación de un buen diseño experimental

En concreto, la necesidad de reducir el número de animales utilizado es esencial a la hora de plantear el diseño experimental y garantizar una reproducibilidad de los datos. Por ejemplo, una revisión de estudios clínicos en oncología puso de manifiesto que únicamente 6 de 53 estudios mostraron resultados reproducibles, mientras que otra pudo comprobar que existían bastantes discrepancias en los resultados obtenidos (Begley y Ellis, 2012).

Todos estos datos generaron la necesidad de documentar los resultados de experimentación animal y conllevaron a desarrollar las directrices ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*). Estas directrices pretenden garantizar descripciones completas y transparentes del uso de especies vivas, así como describir investigaciones comparativas entre laboratorios. En concreto, estas directrices recogen 20 elementos con información sobre investigaciones con animales (como la especie, el sexo, la cría y antecedentes genéticos, entre otros). (Kilkenny *et al.*,

2010). Sin embargo, estudios recientes pueden haber demostrado falta de información en cuanto al establecimiento de estas directrices, especialmente relevantes a la aleatorización, justificación del tamaño de la muestra y características de animales. Es por ello que ha surgido una mejora en estas directrices, llamada ARRIVE 2.0, con criterios de inclusión y exclusión, registro de protocolos, diseño experimental cuidadoso y acceso a datos de otros laboratorios (Percie du Sert *et al.*, 2020).

El cálculo del número de animales utilizados en experimentación es una práctica esencial a la hora de planificar cualquier experimento, siendo necesario para evaluar la estadística de los datos experimentales obtenidos. De este modo, estos resultados serán veraces y representativos, con el objetivo de maximizar la información disponible de cada animal (Kilkenny *et al.*, 2010). En consistencia con lo anterior, el bienestar animal queda vinculado a la calidad de los datos de investigación, de tal manera que los resultados obtenidos puedan ser reproducibles en futuros estudios.

2. OBJETIVOS

Estudios realizados en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Alcohol del CIPF utilizan de manera habitual cultivos primarios de astrocitos corticales de crías de ratón. Ello conlleva el uso de una gran cantidad de animales de laboratorio, lo que requiere de una mejora del protocolo con el fin de reducir este número.

El objetivo de este trabajo se basará en realizar una comparativa entre un protocolo tradicional de cultivo primario de astrocitos con respecto a uno nuevo, basado en el pase de cultivos de astrocitos. La hipótesis del presente estudio consiste en demostrar si este nuevo procedimiento de cultivo basado en pases permite obtener unos resultados reproducibles al protocolo tradicional, con el fin de implementarse como práctica común en el laboratorio, reduciendo así el número de animales de experimentación utilizados.

Para demostrar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Se realizarán en paralelo cultivos de astrocitos según el protocolo tradicional y según el protocolo alternativo, recibiendo los mismos tratamientos.
2. Se observará, mediante técnicas de inmunofluorescencia, la calidad y pureza de ambos tipos de cultivos.
3. Se llevarán a cabo técnicas de RT-qPCR de una serie de genes inflamatorios y microRNAs relacionados con la respuesta inmune como control positivo de respuesta al tratamiento.
4. Se compararán los resultados obtenidos de ambos cultivos, evaluando patrones de respuesta y efecto de los pases sobre los astrocitos, teniendo como objetivo final la reducción del uso de animales de laboratorio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

Para el desarrollo del presente trabajo, se han utilizado crías de ratón de fenotipo silvestre o *wild type* (WT) de la cepa C57BL/6. Los animales utilizados para este estudio se criaron bajo estrictas condiciones SPF (zona libre de gérmenes y patógenos específicos), fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, una temperatura de 23 °C y humedad en torno al 60%. Los animales se mantuvieron con una dieta sólida *ad libitum* y agua. Después del apareamiento, las hembras preñadas se separaron en cajas diferentes durante la etapa de gestación, para evitar periodos de estrés.

Una vez se produjo el nacimiento de las crías de ratón, éstas se sacrificaron mediante decapitación, para poder realizar el cultivo de astrogliá. Los experimentos con uso de animales se han llevado a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, junto con la autorización de la Fundación Centro de Investigación Príncipe Felipe, que cuenta con un Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA).

3.2 Cultivo primario de astrocitos corticales

Las cortezas cerebrales de crías de ratón se han empleado para obtener los cultivos primarios de astrocitos utilizados en este estudio. La *Figura 4* muestra todo el proceso del diseño experimental en rasgos generales, desde la gestación de las hembras hasta la extracción de RNA de las muestras.

En la cabina de flujo laminar vertical, con condiciones efectivas de esterilidad, se realizó la decapitación y se diseccionó el cráneo. Después, se escindió el cerebelo y se separaron ambos hemisferios. Las cortezas cerebrales se depositaron en placas de 5 mL, las cuales contenían Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). Todo ello se recogió con una pipeta de 10 mL estéril y se depositó en un tubo de cristal, donde se aspiró el cultivo 10 veces para realizar una disgregación mecánica eficiente. Una vez pipeteado, el extracto celular se agitó durante 1 minuto en un vórtex (MS2 *Minishaker* IKA) a máxima velocidad, permitiendo la muerte de neuronas, las cuales no crecen en el cultivo. Posteriormente, se filtraron las células a través de una malla de nylon estéril con un tamaño de poro de 90 μ m.

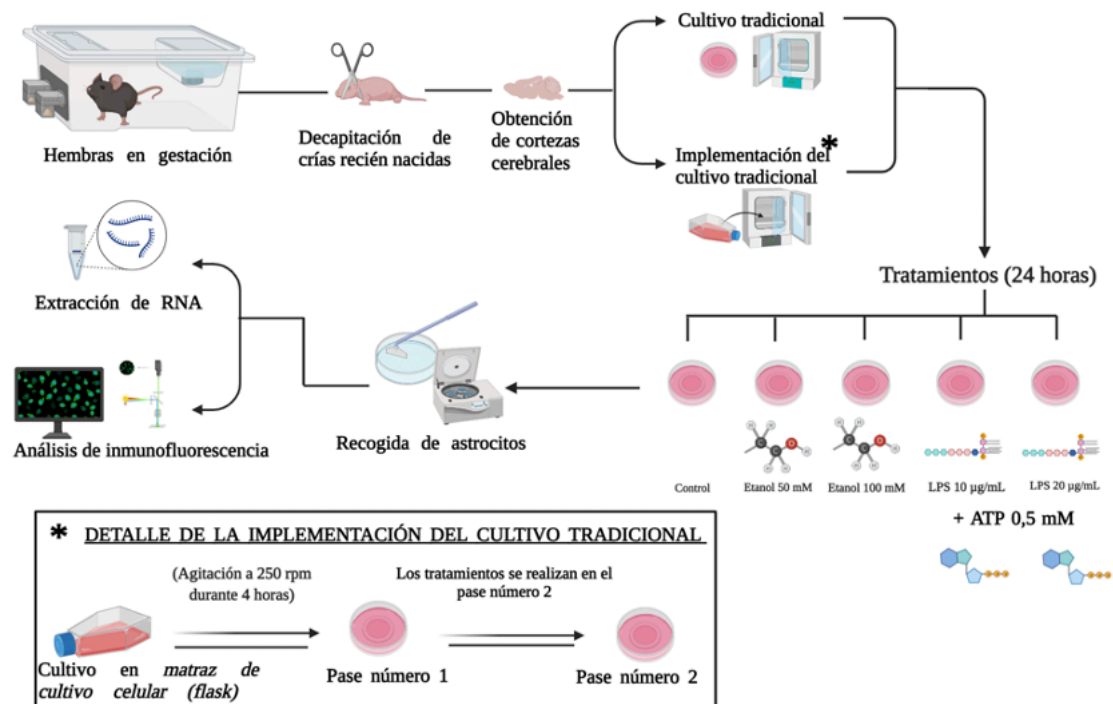


Figura 4. Representación esquemática del diseño experimental del trabajo.

Las células se depositaron sobre un medio completo, el cual contenía DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 20%, 1% glutamina (2mM), 1% glucosa (1g/L) y 1% antibiótico (100U/mL penicilina/estreptomicina). Los astrocitos se sembraron en placas de 5mL (los correspondientes al cultivo tradicional) y en un matraz de cultivo celular de 10mL (correspondiente al cultivo alternativo), y se cultivaron en un incubador Heracell (Heraeus) a 37°C y al 5% de CO₂ / 95 % de aire.

Una vez incubados los astrocitos, se procedió a cambiar el medio de cultivo cada 3-4 días. En el día 7, el medio se sustituyó por un medio de diferenciación, que contenía DMEM con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% Glutamina (2mM), 1% antibiótico (100U/mL penicilina/estreptomicina) y 1% fungizona (2.5µg/mL). La glucosa se eliminó del medio. Los astrocitos continuaron creciendo hasta alcanzar confluencia del 90-95%.

El medio del cultivo alternativo también se cambió cada 3-4 días. En el día 7, estos cultivos se sometieron al nuevo procedimiento de cultivo alternativo expuesto en los estudios realizados por Hao Pan, donde los matraces de cultivo celular se sacudieron a 250rpm durante 4 horas para deshacerse de la microglía y otras células menos adherentes del cultivo (Pan *et al.*, 2012). Después, las células se pasaron 2 veces, ya en placas de 5mL. Los tratamientos correspondientes se realizaron en el pase número 2.

3.3 Tratamientos de los astrocitos

Los cultivos de astrocitos se clasificaron en cinco grupos diferentes (un grupo control, otro con etanol a 50mM, un grupo con etanol 100mM, un cuarto con LPS a 10 μ g/mL y un último con LPS a 20 μ g/mL). Antes de llevar a cabo los tratamientos de etanol y LPS, los astrocitos permanecieron 8 horas en un medio de diferenciación con albúmina de suero bovino (BSA) 1mg/mL y sin FBS. Esto se realiza para evitar precipitación de proteínas del FBS al medio y atenuar el metabolismo celular. 30 minutos antes de la recogida, se procedió a añadir ATP 0,5mM a los cultivos tratados con LPS. Pasado este tiempo, las células se recogieron y lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), sin Ca⁺² ni Mg⁺², siendo levantadas con un raspador. La fracción celular obtenida se centrifugó a 3000rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet a -80°C para su posterior uso.

3.4 Aislamiento total de RNA y cuantificación por NanoDrop

Para la extracción de RNA, se utilizó el método *T9424 TRI Reagent*, basado en el uso de trizol, cloroformo e isopropanol, siguiendo el protocolo y las instrucciones descritas por el fabricante (Sigma-Aldrich). Este método se basa en los principios activos del fenol (el cual inhibe RNasas), el tiocianato de guanidina como componente de la lisis, el cloroformo (que genera las diferentes fases donde quedarán suspendidas las moléculas) y el isopropanol (que provoca el precipitado del RNA). Seguidamente, el RNA se lavó dos veces con etanol al 75%, precipitó gracias a la centrifugación y se resuspendió en agua desionizada con dietilpicarbonato (DEPC-H₂O). A continuación, el RNA extraído se midió en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, para establecer la concentración obtenida y su grado de pureza. Se tuvieron en cuenta las ratios 260/280nm (nivel de contaminación de proteínas, que absorben a 280nm) y 260/230nm (contaminación de etanol, isopropanol u otras sustancias químicas, las cuales absorben a 230nm).

3.5 Determinación del nivel de expresión génica RT-qPCR

Para llevar a cabo la generación de DNA complementario (cDNA) se realizó la reacción de transcripción reversa, utilizando el *NZY First-Strand cDNA Synthesis Flexible Pack* (NZYTech, Lda.) partiendo de 250ng de RNA. Este kit contiene 10mM de cada dNTPs, 10X de *Reaction Buffer*, 200U/ μ L de la enzima retrotranscriptasa, 40U/ μ L de *Ribonuclease Inhibitor* y 50ng/ μ L de *Random Hexamer Primers*. Las condiciones del ciclo de reacción se establecieron y son las siguientes: 10 minutos a 25°C, 40 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C y 20 minutos a 37°C. Antes del último paso, tras los primeros 55 minutos, el ciclo se pausó momentáneamente para incorporar

5U/ μ L de RNasa H (para asegurar que todo el RNA que hubiese podido quedar y no ser transcrito se eliminara). El cDNA obtenido se guardó a -20°C para su posterior uso.

A continuación, se llevó a cabo la técnica de PCR a tiempo real (RT-qPCR) para cuantificar los niveles de expresión relativa de los genes de estudio, relacionados con la estimulación de las rutas de señalización del receptor TLR4. En este caso, se necesitan cuantificar los datos con respecto a un gen de referencia/control interno, el cual se estableció que fuera el gen *PPIA* (ciclofilina A), así como un control negativo (en el que se usó H_2O en vez de cDNA). La reacción de qPCR se realizó en un *LightCycler® 480 System* (Roche, Mannheim, Germany). Cada muestra contenía 2,5 μ l *AceQ qPCR SYBR Green Master Mix* (Vazyme Biotech Co.), 2 μ l de la muestra de cDNA (dilución 1:10), 0,25 μ l del cebador directo (dilución 1:10) a 10 μ M y 0,25 μ l de 10 μ M del cebador reverso (dilución 1:10) a 10 μ M. Tal y como se observa en la *Tabla 1*, se muestran los cebadores (directo y reverso) de todos los genes analizados en la qPCR.

Tabla 1. Genes estudiados para el análisis de RT-qPCR, donde se muestra la secuencia de los cebadores (tanto directo como reverso), así como la temperatura de fusión (TM, *melting temperature*) y el tamaño de amplificación de éstos.

Genes a estudio	Secuencia de los cebadores	TM	Tamaño de amplificación
<i>PPIA</i>	Directo: CGC GTC TCC TTC GAG CTG TTT G	60.5 $^{\circ}\text{C}$	150 pb
	Reverso: TGT AAA GTC ACC ACC CTG GCA CA	60.7 $^{\circ}\text{C}$	
<i>IRAK1</i>	Directo: CGT AGCT GAC CTC GTT CAC A	56.8 $^{\circ}\text{C}$	167 pb
	Reverso: GAA AAG CTG GGG AGA GGA AG	55.4 $^{\circ}\text{C}$	
<i>MAPK14</i>	Directo: GAC CGT TTC AGT CCA TCA TTC	63.3 $^{\circ}\text{C}$	99 pb
	Reverso: AAC ACA TCC AAC AGA CCA ATC A	64.2 $^{\circ}\text{C}$	
<i>NF-κB</i>	Directo: TAC CCT CAG AGG CCA GAA GA	57.1 $^{\circ}\text{C}$	104 pb
	Reverso: CAG TTC CGT AGG GAT CAT CG	54.8 $^{\circ}\text{C}$	
<i>TNF-α</i>	Directo: GAA CTG GCA GAA GAG GCA CT	65.2 $^{\circ}\text{C}$	184 pb
	Reverso: AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	62.6 $^{\circ}\text{C}$	
<i>IL-1β</i>	Directo: CTC ATT GTG GCT GTG GAG AA	63.9 $^{\circ}\text{C}$	119 pb
	Reverso: TCT AAT GGG AAC GTC ACA CA	59.7 $^{\circ}\text{C}$	

Para realizar el análisis de los niveles de expresión génica de los genes analizados se utilizó la fórmula de Pfaffl, la cual tiene en cuenta la eficiencia de la reacción de qPCR. En este caso se relacionó la eficiencia elevada al ciclo en el que se expresa el gen de estudio dividido entre la eficiencia elevada al ciclo en el que se expresa un gen de referencia o *housekeeping*, *PPIA* en este caso (Pfaffl, 2001). Todo ello se ve reflejado en la *Ecuación 1*, donde E se corresponde con la eficiencia de los cebadores utilizados y Ct con el número de ciclos (*Cycle Threshold*).

$$Ratio = \frac{(E_{gen\ de\ estudio})^{\Delta Ct_{gen\ de\ estudio}(control-muestra)}}{(E_{gen\ de\ referencia})^{\Delta Ct_{gen\ de\ referencia}(control-muestra)}}$$

Ecuación 1. Fórmula de Pfaffl para llevar a cabo el análisis de expresión diferencial de los genes a estudio, donde E se corresponde con la eficiencia de los cebadores utilizados y Ct con el número de ciclos (*Cycle Threshold*) (Ecuación adaptada de Pfaffl, 2001).

3.6 RT-qPCR de microRNAs

Para la realización del ensayo de miRNAs se utilizó el *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* de Applied Biosystems, partiendo de 100ng de muestra de RNA. Este protocolo se dividió en cuatro etapas.

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de poliadenilación (añadir una cola poli(A); *Poly(A) tailing reaction*). Para ello, se preparó un mix con *10X Poly(A) Buffer*, ATP, *Poly(A) Enzyme*, junto con agua libre de RNasas y la muestra correspondiente. En todos los pasos se produjo una centrifugación para mezclar el mix con la muestra correspondiente y todas las reacciones se realizaron de nuevo en un *LightCycler® 480 System* (Roche, Mannheim, Germany). Las condiciones del ciclo de reacción se establecieron y son las siguientes: 45 minutos a 37°C (reacción de poliadenilación) y 10 minutos a 65°C. La reacción se paró a 4°C para proceder con el siguiente paso.

Este paso consistió en realizar la reacción de ligación del adaptador. Para ello, se preparó un mix con *5X DNA Ligase Buffer*, 50% polietilenglicol (PEG) 8000, *25X Ligation Adaptor*, RNA ligasa y agua libre de RNasas. El mix se centrifugó junto con el producto obtenido de la reacción de poliadenilación. A continuación, se llevó a cabo la reacción de ligación durante 60 minutos a 16°C. El proceso se interrumpió de nuevo a 4°C para proseguir con el paso de la reacción de transcripción reversa. La reacción requiere de nuevo el uso de un mix compuesto por *5X RT Buffer*, 25mM de cada dNTP, 20X de cebadores universales de RT, *10X RT Enzyme Mix* y agua libre de RNasas. La reacción prosiguió durante 15 minutos a 42°C (reacción de transcripción), y después 5 minutos a 85°C (la reacción se detuvo), antes de pararse de nuevo a 4°C.

El último paso consistió en llevar a cabo la reacción de amplificación miR-Amp, la cual requirió de un mix formado por *2X miR-Amp Master Mix*, *20X miR-Amp Primer Mix* y agua libre de RNasas. Este mix se añadió al producto de la reacción de PCR y se estableció el siguiente procedimiento: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C (para activar la enzima) 14 ciclos de 3 segundos a 95°C (para realizar la desnaturalización) y 30 segundos a 60 °C (para realizar la extensión

(*annealing*). Después, se prosiguió con 1 ciclo de 10 minutos a 99°C (para detener la reacción) y se paró a 4°C, donde el producto obtenido se almacenó a -20°C para su posterior uso.

A partir de este momento se llevó a cabo la técnica de PCR a tiempo real (RT-qPCR), donde se estudiaron 3 miRNAs que se pueden observar en la *Tabla 2*. Como miRNA de referencia se utilizó el miR-181a-5p, debido a su amplia expresión en tipos celulares y su conservación a lo largo de la evolución (Indrieri *et al.*, 2020). La reacción de qPCR se realizó en un *LightCycler® 480 System* (Roche, Mannheim, Germany). Cada muestra contenía 2,5µl *TaqMan Fast Advanced Master Mix (2x)*, 2µl de la muestra de cDNA (después de realizar la reacción miR-Amp), 0,25µl de 20X Advanced miRNA Assay y 0,25µl de agua libre de RNAsas.

Tabla 2. Datos de los microRNAs utilizados en el análisis de qPCR, donde se muestra la secuencia de estos y su localización cromosómica.

miRNAs	Secuencia del miRNA	Localización cromosómica
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	Chr.9: 124692442 - 124692551 [+] on Build GRCh 38
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	Chr.17: 59841266 - 59841337 [+] on Build GRCh 38
hsa-miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	Chr.5: 160485352 - 160485450 [+] on Build GRCh38
hsa-miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	Chr.11: 122099757 - 122099844 [-] on Build GRCh38

Para realizar el análisis de los niveles de expresión génica de los miRNAs analizados se utilizó la fórmula de Pfaffl, igual a la que se usó para estudiar los genes analizados de la qPCR (*Ecuación 1*). En este caso se relacionó la eficiencia elevada al ciclo en el que se expresa el miRNA de estudio dividido entre la eficiencia elevada al ciclo en el que se expresa el miRNA de referencia, siendo el miR-181a-5p el utilizado en este caso.

3.7 Inmunofluorescencia

En relación con la técnica de inmunofluorescencia, se realizó un análisis de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado1 (IBA1) en los tres pases del cultivo alternativo: Pase 0 (Control), Pase 1 y Pase 2. Las muestras se depositaron en

una placa de 12 pocillos con fondo de diámetro 2,26 y se sembraron encima de un cubreobjetos de cristal, el cual se encontraba en el fondo del pocillo.

A continuación, tras realizar lavados con PBS, se procedió a fijar las células sobre el cubreobjetos, mediante el uso de paraformaldehído al 4% en PBS. Seguidamente, se permeabilizaron utilizando 0,25% de Triton X-100, y posteriormente se bloquearon en 3% BSA durante 30 minutos. Después, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C. En la *Tabla 3* se observan los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el experimento de inmunofluorescencia.

Al día siguiente, se lavaron las muestras con 0,1% de Nonil Fenoxipolietoxietanol 40 (NP-40) 3 veces, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, ya en condiciones de oscuridad. Finalmente, se lavó con PBS de nuevo y se procedió a incorporar 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en dilución 1:20000 durante 10 minutos en oscuridad. Tras lavar de nuevo, se procedió al montaje del portaobjetos. Para ello, se depositó una gota de *mounting fluid* (*Fluor Save Reagent*, Calbiochem) sobre el portaobjetos, por un lado, y los cristales se despegaron de los pocillos. La superficie con las células se posicionó sobre el *mounting fluid*, de manera que el cubreobjetos quedó sellado. El proceso se realizó en condiciones de oscuridad y los portaobjetos se guardaron a 4°C para su posterior uso.

Tabla 3. Datos de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica de inmunofluorescencia, con el detalle de la dilución a la que se usaron, el huésped, la casa comercial y la referencia.

Anticuerpo anti-	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
GFAP	1:1000	Ratón	Sigma-Aldrich	G3893
IBA1	1:500	Conejo	Wako Chemicals	019-19741
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse	1:2000	Ratón	Life Technologies	A31571
Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit	1:2000	Conejo	Life Technologies	A11008

Para realizar la cuantificación de las muestras de fluorescencia, se utilizó el microscopio ZEISS APOTOME, a partir del cual se obtuvieron una serie de imágenes, las cuales se procesaron utilizando el software ZEN Microscopy. La fluorescencia de los anticuerpos secundarios *Alexa Fluor 633 goat antirabbit IgG* (Life Technologies) y *Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG* (Life Technologies) se detectó gracias al uso del microscopio confocal LEICA TCS SP8 MP.

3.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las muestras obtenidas y la obtención de las gráficas mostradas en el apartado de resultados se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 9.0, tanto en la RT-qPCR, como en inmunofluorescencia y la qPCR de miRNAs. Los datos se representaron utilizando la media obtenida de las diferentes muestras junto con el error \pm SEM (Error Estándar de la Media) y N = 3. Del mismo modo, se procedió a realizar un análisis one-way ANOVA sobre las muestras, seguido por la prueba Bonferroni de comparativas múltiples. Todo ello con el objetivo de intentar establecer significancias estadísticas en los datos.

4. RESULTADOS

4.1 La población de astrocitos se mantiene constante en los sucesivos pases de cultivo

Como se ha comentado previamente, las muestras del cultivo alternativo se sometieron a diferentes pases, realizándose los tratamientos en el pase número 2. El objetivo consistía en determinar si el porcentaje de astrocitos variaba conforme se realizaban los pases. Para ello, se realizó una incubación de las muestras con GFAP e IBA1 (detallado en la sección de Materiales y Método).

DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) es un marcador de DNA que se fija en el surco menor de secuencias ricas en adenina y timina del DNA, siendo uno de los fluorocromos más usados en microscopía de fluorescencia (Kapusinski., 1995). En las imágenes de la *Figura 5* podemos observar varios núcleos, indicando la presencia de células en la población de los cultivos y la eficacia de DAPI.

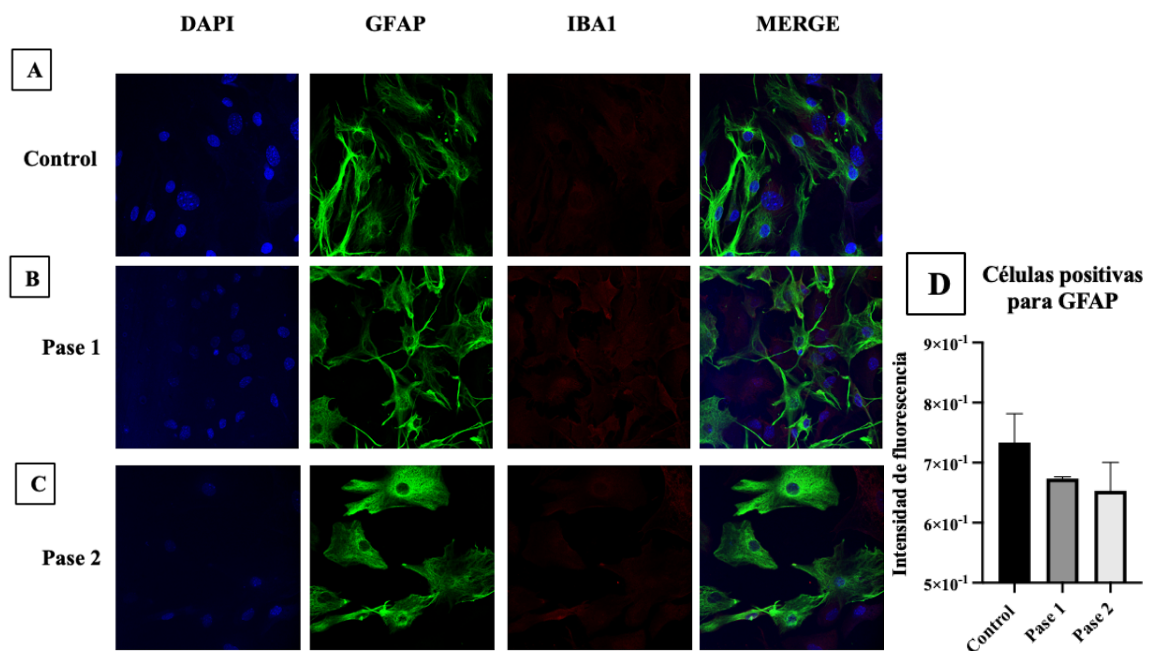


Figura 5. Estudio de inmunofluorescencia de los astrocitos del cultivo alternativo. Imágenes de microscopía de fluorescencia de astrocitos cultivados en Pase 0/Control (A), en Pase 1 (B) y en Pase 2 (C). En azul, la señal DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), marcador de núcleos. En verde, la señal GFAP (proteína ácida fibrilar glial), marcador de astrocitos. En rojo, la señal de IBA1 (molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1), marcador de microglía. La última columna (*Merge*) se corresponde con la unión de las tres imágenes anteriores. D) Gráficas de barras del porcentaje de células positivas para GFAP con respecto al Pase 0/Control, Pase 1 y Pase 2. Datos representados con media \pm SEM, N = 3. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es uno de los marcadores más importantes de la activación de astrocitos, considerada como filamento intermedio de los mismos y que presenta hasta 10 isoformas distintas. Además, es capaz de reorganizarse en un sistema complejo junto con vimentina y nestina (Hol y Pekny, 2015). Como podemos observar en la *Figura 5*, la presencia y los niveles de GFAP son relativamente similares entre el control y los diferentes pases. En el control, el porcentaje de astrocitos en la población es de 73%, mientras que en el Pase 1 se corresponde con 67% y en el Pase 2 con 65%. Gracias a la estadística utilizada, el análisis mediante one-way ANOVA nos indica que las diferencias no son significativas. De igual manera, es interesante destacar que se produce una ligera disminución del porcentaje de células positivas para GFAP en los diferentes pases con respecto al control.

También se evaluó la presencia en los cultivos de IBA1, el cual es un marcador disponible para detectar la presencia de microglía. En concreto, IBA1 (molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1), media señales de calcio en linaje monocítico y microglía (Lafrenaye *et al.*, 2020). En relación a las imágenes obtenidas de la *Figura 5*, observamos una presencia mínima de este marcador en las poblaciones del control y los pases. Si nos fijamos en la gráfica de barras, el control presenta un 27% de población no astrocítica, mientras que en el Pase 1 es de 33% y en el Pase 2 de 35%. Podemos observar como la población de microglía aumenta entre un grupo y el siguiente, pero de nuevo este aumento no es significativo, por lo que los cultivos están enriquecidos en astrocitos y el método de agitación permitió aislar eficientemente los mismos.

4.2 El etanol no tiene efecto sobre la activación de las rutas de señalización de TLR4 en los cultivos alternativos

Estudios previos han determinado como el etanol puede inducir procesos inflamatorios a través de la activación de la vía de señalización del receptor TLR4 (Blanco *et al.*, 2008). Para determinar y comparar los dos tipos de cultivo celular en función de la capacidad de activar la ruta del receptor TLR4 en respuesta al etanol, éstos se estimularon a diferentes concentraciones (detallado en Materiales y Método). Los experimentos realizados han tenido como objetivo evaluar el nivel de expresión de diferentes marcadores relacionados con neuroinflamación, en cultivos de astrocitos sometidos a diferentes tratamientos. En este caso, se ha utilizado como gen control *PPIA* (ciclofilina A), debido a su ubicuidad y estabilidad en tipos celulares.

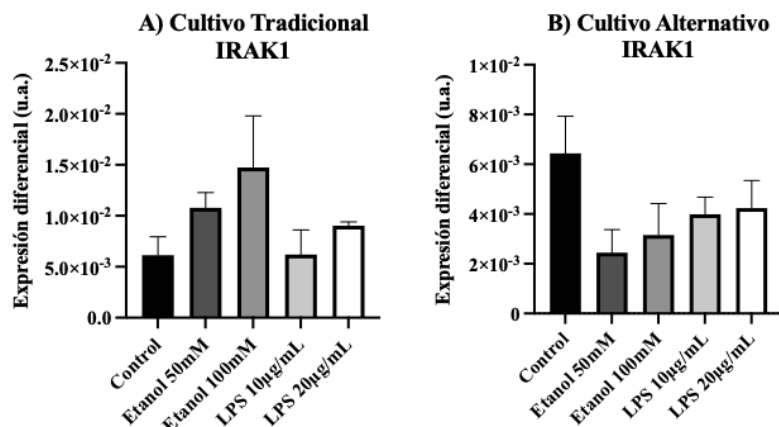


Figura 6. Estudio de la expresión diferencial de *IRAK1* mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de *IRAK1* en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) de los 5 grupos, relativizados con respecto a un gen control (*PPIA*) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media ± SEM, N = 3. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

Uno de los genes inflamatorios analizados es la quinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1 (*IRAK1*), el cual está íntimamente relacionado con la ruta de respuesta del receptor TLR4. En concreto, cuando el LPS se une al receptor TLR4, se activa una cascada de señalización, la cual incluye *IRAK1*. Esta serin treonina quinasa activa el complejo de la MAPK, lo que a la larga permite que *NF-κB* se una a la región promotora de genes diana tales como *TNFα*, *IL-6* e *IL-1β* (Mandrekar *et al.*, 2009). Como se ve en la *Figura 6*, la expresión de *IRAK1* aumenta en los cultivos tratados con etanol (especialmente la concentración de etanol a 100mM), con respecto al cultivo tradicional. Del mismo modo, la estimulación con LPS aumenta ligeramente los niveles de *IRAK1* con respecto al control, indicando activación en la ruta del TLR4. En el cultivo alternativo la situación es distinta, y los tratamientos sobre los cultivos no aumentan los niveles de expresión de *IRAK1*.

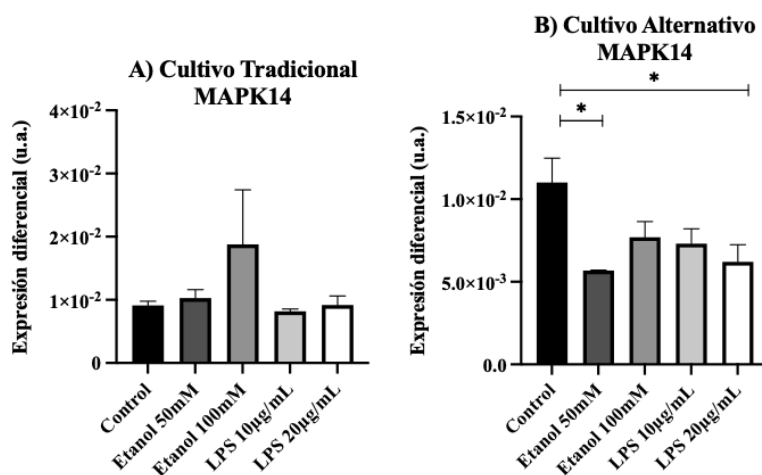


Figura 7. Estudio de la expresión diferencial de *MAPK14* mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de *MAPK14* en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) de los 5 grupos, relativizados con respecto a un gen control (*PPIA*) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media ± SEM, N = 3, *p<0,05. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

Otro marcador de especial relevancia en la estimulación de las rutas inflamatorias causada por el etanol es el *MAPK14*. Esta proteína es una quinasa activada por mitógenos, la cual se activa por señales metabólicas e inflamatorias a través de la vía de las MAPK. Su activación influye en procesos biológicos de proliferación, apoptosis, senescencia, diferenciación e inflamación celular (Wu *et al.*, 2019). Tal y como se observa en la *Figura 7*, con respecto al cultivo tradicional, la expresión de *MAPK14* se encuentra elevada en los tratamientos con etanol, especialmente etanol 100mM, a la vez que no se observan diferencias entre el grupo control y los tratados con LPS. La situación cambia con respecto al cultivo alternativo, donde la máxima expresión de *MAPK14* se observa en el control, mientras que los cultivos tratados con etanol y con LPS presentan una menor expresión del gen. Aún así, se observan diferencias significativas en etanol 50mM y LPS 20µg/mL.

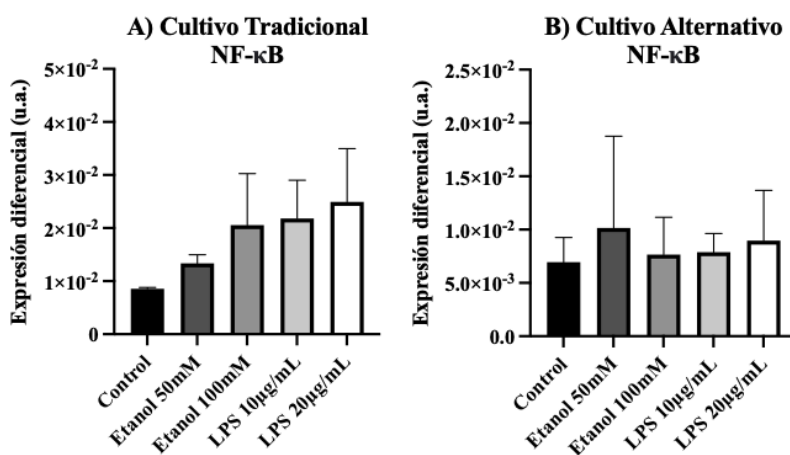


Figura 8. Estudio de la expresión diferencial de *NF-κB* mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de *NF-κB* en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) de los 5 grupos, relativizados con respecto a un gen control (*PPIA*) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media ± SEM, N = 3. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

El siguiente gen que se analizó fue el *NF-κB*. Este heterodímero es un factor de transcripción con un importante papel en la respuesta inmune. Es conocido por ser estimulado por citocinas y receptores inflamatorios, tales como los TLR. Se ha demostrado que el abuso de etanol puede inducir la activación de *NF-κB* y un aumento de su expresión en el cerebro (Nennig y Schank, 2017). Efectivamente, esto se puede comprobar en los resultados obtenidos y que se muestran en la *Figura 8*. Si nos fijamos en el cultivo tradicional, se puede observar notablemente como los tratamientos con etanol y con LPS aumentan los niveles de expresión de *NF-κB*, tal y como cabría esperar, al producirse la unión entre el etanol o LPS y el receptor TLR4. Por otro lado, en el cultivo alternativo se observa como prácticamente los tratamientos no afectan a los niveles de expresión de este factor de transcripción, y se mantienen más o menos constantes con respecto al control.

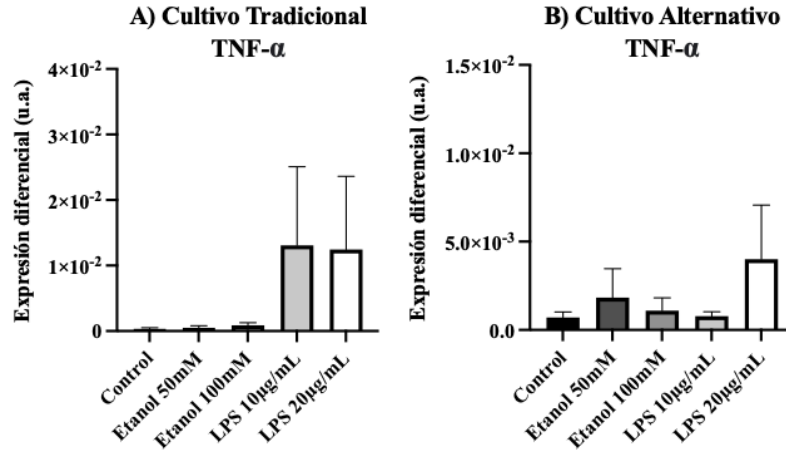


Figura 9. Estudio de la expresión diferencial de *TNF-α* mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de *TNF-α* en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) de los 5 grupos, relativizados con respecto a un gen control (*PPIA*) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media \pm SEM, N = 3. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

El siguiente marcador analizado fue el *TNF-α* (factor de necrosis tumoral alfa), uno de los mediadores inflamatorios por excelencia, el cual induce apoptosis y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Brown *et al.*, 2001). Además, su papel patofisiológico en el SNC es fundamental: es liberado *de novo* por astrocitos, produciendo una respuesta neuroinflamatoria asociada con trastornos neurológicos (Olmos y Lladó, 2014). Los resultados mostrados en la *Figura 9* ponen de manifiesto que únicamente se produce una expresión considerable de *TNF-α* en los tratamientos con LPS, especialmente aquellos del cultivo tradicional. En este caso, el etanol 50mM y 100mM tampoco tienen una gran relevancia y la expresión de este mediador inflamatorio no se ve excesivamente activada. Por el contrario, se confirma que los tratamientos del cultivo alternativo no parecen tener un gran efecto sobre la expresión de mediadores inflamatorios como el *TNF-α*.

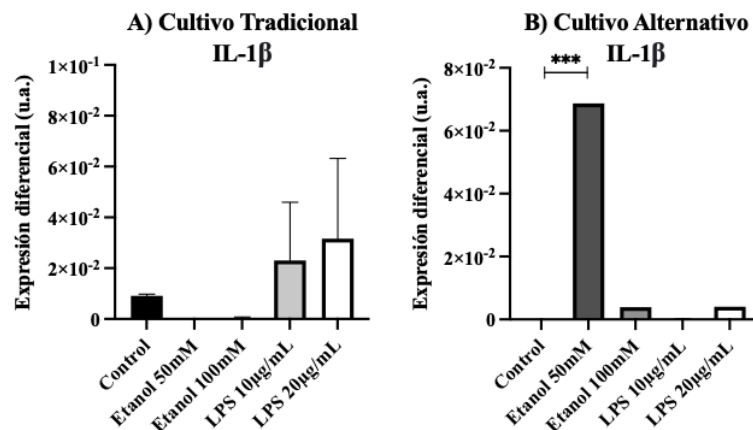


Figura 10. Estudio de la expresión diferencial de *IL-1β* mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de *IL-1β* en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) de los 5 grupos, relativizados con respecto a un gen control (*PPIA*) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media \pm SEM, N = 3, *** $p < 0,0001$. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

Finalmente, uno de los últimos genes que hemos podido analizar es el correspondiente a *IL-1 β* . La producción de este mediador inflamatorio acontece tras la activación del receptor TLR4 por LPS, y está involucrado en diferenciación de células innatas, así como en la patogénesis de enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes (Tilg *et al.*, 2016). En este caso, sucede algo similar a lo que pasaba con el marcador *TNF- α* . Como se aprecia en la *Figura 10*, los tratamientos con LPS del cultivo tradicional muestran una expresión elevada de *IL-1 β* , indicando que efectivamente, el LPS ha desencadenado la ruta de activación del receptor TLR4. Si nos fijamos en los resultados del cultivo alternativo, de nuevo se confirma como los cultivos tratados tanto con LPS como etanol no muestran ningún tipo de efecto y los niveles de *IL-1 β* no se encuentran prácticamente diferenciados con respecto al control, excepto en el caso de etanol 50mM, donde se produce una diferencia significativa en sus niveles con respecto al control.

4.3 Los niveles de expresión de miR-21-5p y miR-146a-5p en respuesta al etanol y LPS

Estudios previos han demostrado cómo los miRNAs se ven alterados en enfermedades neurodegenerativas, donde cada uno puede regular y modificar a otros miles de mRNA (Nejad *et al.*, 2018). En este estudio, se han analizado tres miRNAs para observar sus niveles de expresión cuando los cultivos son tratados con etanol.

Tal y como sucedía con los datos de qPCR, necesitamos normalizar los datos con respecto a un miRNA control. Para este trabajo, se ha utilizado como microRNA control el miR-181a-5p, debido a su alta conservación a lo largo de la evolución. Este miRNA pertenece a la familia miR-181, la cual participa en múltiples procesos de proliferación celular, autofagia, respuesta inmune y apoptosis (Indrieri *et al.*, 2020). En concreto, el patrón de expresión de miR-181a-5p está altamente sobreexpresado en neuronas y otras células gliales en cerebro de ratón, siendo por ejemplo importante para la supervivencia de las células Purkinjee (Schaefer *et al.*, 2007).

Uno de los miRNAs que se han estudiado para este trabajo es el miR-21-5p. Este miRNA ejerce funciones relevantes en astrocitos y otros tipos celulares del SNC como microglía, neuronas u oligodendrocitos (Slota y Booth, 2019). En concreto, miR-21-5p es inducido por la señalización de TLR4, desregulando los niveles de *NF- κ B* e induciendo la presencia de IL-10. Del mismo modo, miR-21 impide la activación astrocítica durante etapas tempranas de astrogliosis (Bhalala *et al.*, 2012).

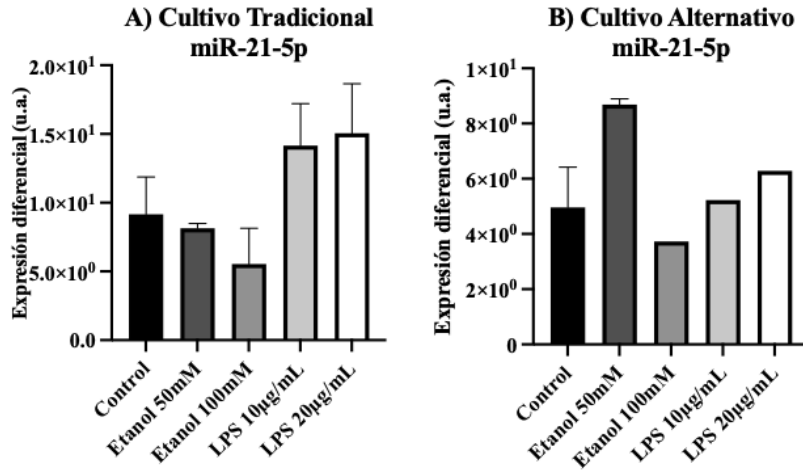


Figura 11. Estudio de la expresión diferencial de miR-21-5p mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de miR-21-5p en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) del control y los tratamientos utilizados, relativizados con respecto a un miRNA control (miR-181a-5p) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media \pm SEM, N = 3. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

Como se observa en la *Figura 11*, los niveles de expresión del miR-21-5p son elevados cuando se utilizan los tratamientos con LPS en el cultivo tradicional. Por el contrario, los cultivos tratados con etanol, así como la mejora de los mismos, no parece producir un efecto demasiado elevado ni generar un patrón característico del mismo, excepto en el caso de etanol 50mM del cultivo alternativo, donde se observa un aumento de los niveles de miR-21-5p.

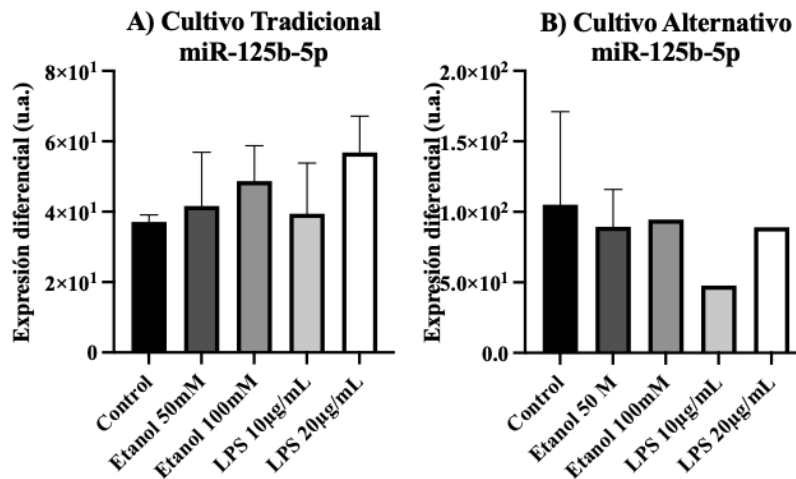


Figura 12. Estudio de la expresión diferencial de miR-125b-5p mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de miR-125b-5p en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) del control y los tratamientos utilizados, relativizados con respecto a un miRNA control (miR-181a-5p) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos mostrados con media \pm SEM, N = 3. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

Otro de los miRNAs observados en este estudio es el miR-125b-5p, perteneciente a la familia de miR-125. Los transcritos de este miRNA participan en metástasis, regulación inmunitaria y proliferación celular. En concreto, miR-125b-5p presenta un papel supresor de tumor en varios

cánceres de ovario, mama y pulmón, disminuyendo la migración e invasión celular y conduciendo a apoptosis (Yuan *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos, que se pueden observar en la *Figura 12*, muestran un aumento de la expresión de este miRNA en la mejora del cultivo con respecto al cultivo tradicional, donde los niveles prácticamente se mantienen constantes. De igual modo, no hay una expresión excesivamente elevada del mismo comparando los tratamientos del cultivo alternativo con respecto a su control.

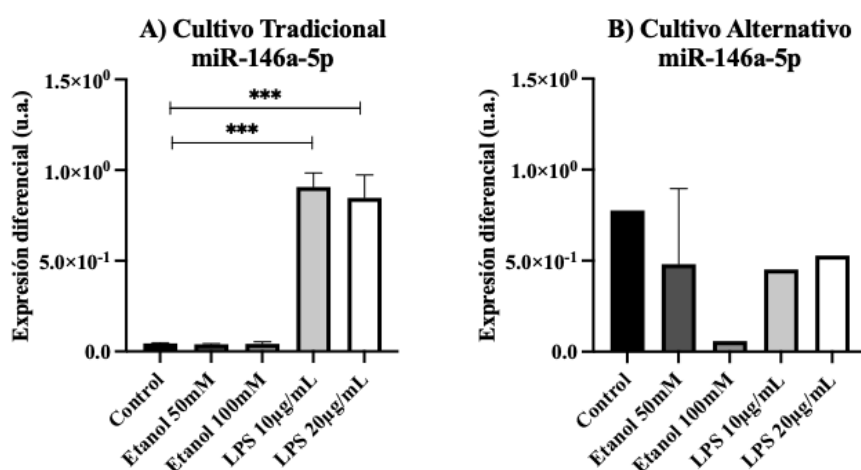


Figura 13. Estudio de la expresión diferencial de miR-146a-5p mediante RT-qPCR. Gráficas de barras de la expresión de los niveles de miR-146a-5p en cultivo tradicional (A) y cultivo alternativo (B) de los 5 tratamientos utilizados, relativizados con respecto a un miRNA control (miR-181a-5p) y representados en unidades arbitrarias (u.a.). Datos representados con media \pm SEM, N = 3, ***p<0,0001. Estadística realizada mediante un análisis one-way ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni para comparativas múltiples.

Finalmente, el tercer miRNA analizado es el miR-146a-5p. Este miRNA es un regulador negativo de inflamación expresado en astrocitos, además de neuronas y microglía, el cual es inducido a través de *NF- κ B* por la activación de las rutas de señalización del TLR4 (Su *et al.*, 2014). En concreto, miR-146a-5p se dirige a mediadores inflamatorios del complejo de señalización del factor de respuesta primario de diferenciación mielóide 88 (MyD88), disminuyendo la señalización en el SNC y limitando una excesiva neuroinflamación (Slota y Booth, 2019). Tal y como se muestra en la *Figura 13*, en el cultivo tradicional, únicamente los tratamientos con LPS consiguen aumentar la expresión de miR-146a-5p. Por otro lado, el cultivo alternativo presenta una expresión más elevada con respecto al cultivo tradicional. Sin embargo, dentro de este segundo grupo, los niveles obtenidos de este miRNA con respecto al control son más bajos.

En general, los datos obtenidos mediante la realización de pruebas estadísticas han resultado ser no significativos, por lo que convendría aumentar el número de experimentos (mayor N) para reducir el error obtenido y verificar si las diferencias en los niveles de expresión de los marcadores inflamatorios estudiados son significativas o no cuando los cultivos son tratados con etanol y LPS.

5. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio, que se ha llevado a cabo para intentar demostrar la hipótesis basada en un nuevo procedimiento de cultivo, centrado en el pase de astrocitos, ponen de manifiesto que el etanol ha sido capaz de estimular las rutas de inflamación asociadas al receptor TLR4, aumentando niveles de mediadores y factores de transcripción inflamatorios. Sin embargo, no se ha logrado observar una expresión clara de los niveles de estos marcadores en los astrocitos del nuevo procedimiento de cultivo, por lo que el objetivo del trabajo para poder reducir el uso de animales en el laboratorio ha quedado condicionado por estos resultados.

Los astrocitos comprenden entre el 20% y el 40% de las células de la glía, siendo un tipo celular muy heterogéneo y necesario en funciones fisiológicas del SNC. Por ello, la alteración de estas funciones puede conllevar un aumento de patologías del sistema nervioso, afectando a su homeostasis (Cohen y Torres, 2019). Estudios previos han demostrado que la exposición al etanol puede afectar al desarrollo funcional de astrocitos durante la maduración glial (Guerra *et al.*, 1990). El alcohol induce daño oxidativo que provoca alteraciones en astrocitos, generando radicales libres en el cerebro y cambios en citoesqueleto (Montoliu *et al.*, 1995). Del mismo modo, cuando el etanol se une al receptor TLR4 desencadena una respuesta inflamatoria que produce la liberación de mediadores inflamatorios y causa neuroinflamación, como se ha comprobado en varios estudios del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del Alcohol (Alfonso-Loeches *et al.*, 2012, Fernández-Lizarbe *et al.*, 2013). En perspectiva, es necesario desarrollar un buen diseño experimental para optimizar los cultivos, de manera que este trabajo se ha sostenido en esta premisa para poder evaluar si la reducción del número de animales es viable.

Con respecto a los resultados obtenidos en inmunofluorescencia, aunque éstos muestran una ligera tendencia a la baja del porcentaje de células positivas para GFAP, la población de astrocitos se mantiene conforme se realizan los sucesivos pases y no supone un problema al no ser diferencias significativas. Por otro lado, se ha detectado poca presencia IBA1 en comparación con GFAP, por lo que la agitación a 250rpm durante 4 horas parece funcionar y elimina de forma eficaz microglía del matraz de cultivo celular.

Centrándonos en los marcadores inflamatorios analizados en este estudio, hemos demostrado que los tratamientos realizados sobre los astrocitos del cultivo alternativo no parecen tener ningún efecto ni generar expresión de los mediadores inflamatorios. Por ejemplo, varios estudios han demostrado que *NF- κ B*, una vez activado, se une al DNA e induce la transcripción de citocinas proinflamatorias como *TNF- α* e *IL-1 β* (Thompson y Van Eldik, 2009). Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía, ya que ambas citocinas presentan unos niveles de expresión muy

bajos (independientemente del cultivo tradicional u alternativo). Esto es debido a que son liberadas de manera constante y en niveles relativamente bajos en contraposición con *NF- κ B*, cuya expresión se encuentra mucho más elevada.

El propio pase de los astrocitos puede ser un factor a tener en cuenta a la hora de dilucidar por qué los tratamientos no han tenido efecto, así como el tiempo transcurrido desde que son cultivados hasta que se realizan los tratamientos. Debemos resaltar que, en el cultivo alternativo, pasan en torno a 22 días desde que los astrocitos se cultivan en el matraz de cultivo celular hasta que se realizan los tratamientos, con dos pases de por medio. Sin embargo, en el cultivo tradicional, los astrocitos permanecen unos 12 días en la placa de cultivo, sin producirse ningún pase, hasta que los tratamientos se llevan a cabo. Varios estudios han demostrado que el cultivo de astrocitos mediante pases presenta características morfológicas, funcionales y moleculares de células senescentes (lo que se conoce como astrosenescencia) en comparación con astrocitos que no han sufrido pases (Bang *et al.*, 2021). Estas características se correlacionan, entre otras, con reducción de mediadores inflamatorios tales como *TNF- α* , *IL-6*, *IL-1 β* , detenimiento del ciclo celular, alteraciones en la cromatina y morfología alterada, entre otras (Han *et al.*, 2020). Por tanto, podemos sugerir que la astrosenescencia ha afectado a los cultivos que se eligieron para el cultivo alternativo, ya sea debido a la aparición de factores de estrés externo o disminución de la proliferación de astrocitos (justificada en parte por la ligera bajada de la población en los resultados obtenidos en inmunofluorescencia). Los datos obtenidos implican un comportamiento clásico en el caso del cultivo tradicional, mientras que la tendencia que puedan seguir los cultivos alternativos es más difusa, necesiándose más experimentos para establecer cómo afectan los tratamientos a los niveles de expresión de los marcadores inflamatorios a estudio.

En relación con los resultados obtenidos con los microRNAs, la expresión de miR-21-5p es elevada en los cultivos tratados con etanol y LPS. Esto puede deberse de nuevo al fenotipo envejecido de los astrocitos de los cultivos alternativos. Estudios previos han demostrado que la expresión de los niveles miR-21-5p se encuentra aumentada en vesículas extracelulares de cortezas cerebrales de ratones cuando se estimulan con etanol (Ibáñez *et al.*, 2020). Del mismo modo, este miRNA suprime la expresión de genes que participan en los procesos de apoptosis y se encuentra sobreexpresado en muchos cánceres derivados de células nerviosas, indicando su papel como oncogen (Buscaglia y Li, 2011). Hemos observado resultados similares en nuestro estudio, siendo el etanol y el LPS los responsables de activar el TLR4 e inducir la elevada presencia de miR-21-5p.

Otro de los miRNAs analizados es el miR-125b-5p. Estudios previos sobre este miRNA han demostrado que la exposición de etanol disminuía sus niveles, así como provocaba una reducción de la activación de caspasa 3 y el retraso en el crecimiento en embriones de ratón *in vivo* (Chen *et al.*, 2015). Por tanto, los resultados que hemos obtenido, donde se observa que los tratamientos con etanol también reducen la expresión de miR-125b-5p, van en concordancia con la literatura.

Finalmente, el tercer miRNA analizado es miR-146a-5p, cuya activación disminuye citocinas proinflamatorias, inhibiendo *IRAK1*. Nuestros resultados muestran que el miR-146a-5p aumenta sus niveles de expresión en el cultivo alternativo. Esto puede correlacionarse con los niveles de *IRAK1*, donde se produce una inhibición tardía por parte de miR-146a-5p como mecanismo de feedback negativo. De hecho, una deficiencia en miR-146a-5p puede elevar la respuesta hacia LPS, siendo un regulador clave en la tolerancia a esta endotoxina. Del mismo modo, este miRNA previene la señalización de *NF- κ B* (Lee *et al.*, 2016). Esto pone de manifiesto el papel de este miRNA como regulador de la inflamación vinculada al TLR4.

Por todo ello, podemos concluir que los resultados obtenidos no pueden implementarse en futuros experimentos y necesitaríamos realizar pruebas con más muestras (usando una N más elevada) para determinar si los cultivos alternativos responden a los tratamientos con etanol y si realmente el pase de los mismos afecta a la calidad de los resultados y provoca diferencias significativas.

6. CONCLUSIONES

Este trabajo se ha centrado en una hipótesis inicial basada en el uso de un nuevo procedimiento de cultivo realizado a partir de pases de astrocitos. El objetivo final consistía en utilizar un número reducido de animales de laboratorio en futuros diseños experimentales, optimizándose así los cultivos. Una vez observados los resultados, podemos obtener las siguientes conclusiones:

1. La población de astrocitos se ha mantenido constante conforme se han realizado los sucesivos pases del cultivo alternativo.
2. El etanol ha aumentado los niveles de expresión de los marcadores inflamatorios *IRAK1*, *MAPK14*, *NF- κ B*, *TNF- α* e *IL-1 β* en astrocitos del cultivo tradicional.
3. Los tratamientos con etanol no han afectado a los astrocitos del cultivo alternativo, donde los marcadores inflamatorios se han mantenido constantes o no han aumentado su expresión.
4. Los niveles de expresión de miRNAs como miR-21-5p y miR-146a-5p han modificado su expresión tras los tratamientos con etanol y LPS.
5. Aunque los datos no sean significativos, sería recomendable realizar nuevos experimentos utilizando más muestras para evaluar la significancia de las diferencias obtenidas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO-LOECHES, S.; PASCUAL, M.; GÓMEZ-PINEDO, U.; PASCUAL-LUCAS, M.; RENAUPQUERAS, J.; Y GUERRI, C. (2012). Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia*, 60(6), 948-964. doi: <https://doi.org/10.1002/glia.22327>

ARUMUGAM, T. V.; OKUN, E.; TANG, S. C.; THUNDYIL, J.; TAYLOR, S. M.; Y WOODRUFF, T. M. (2009). Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 32(1), 4-16. doi: <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318193e333>

BANG, M.; GONZALES, E. L.; SHIN, C. Y.; Y KWON, K. J. (2021). Late Passage Cultivation Induces Aged Astrocyte Phenotypes in Rat Primary Cultured Cells. *Biomolecules and Therapeutics*, 29(2), 144. doi: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2020.175>

BAYRAKTAR, R.; VAN ROOSBROECK, K.; Y CALIN, G. A. (2017). Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Molecular oncology*, 11(12), 1673-1686. doi: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12144>

BEGLEY, C. G.; Y ELLIS, L. M. (2012). Raise standards for preclinical cancer research. *Nature*, 483(7391), 531-533. doi: <https://doi.org/10.1038/483531a>

BHALALA, O. G.; PAN, L.; SAHNI, V.; MCGUIRE, T. L.; GRUNER, K.; TOURTELLOTTE, W. G.; Y KESSLER, J. A. (2012). microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 32(50), 17935-17947. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3860-12.2012>

BLANCO, A. M.; PÉREZ-ARAGÓ, A.; FERNÁNDEZ-LIZARBE, S.; Y GUERRI, C. (2008). Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *Journal of neurochemistry*, 106(2), 625-639. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05425.x>

BLANCO, A. M.; VALLÉS, S. L.; PASCUAL, M.; Y GUERRI, C. (2005). Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6893-6899. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6893>

BROWN, L. A. S.; HARRIS, F. L.; Y GUIDOT, D. M. (2001). Chronic ethanol ingestion potentiates TNF- α -mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281(2), L377-L386. doi: <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.2.L377>

BUSCAGLIA, L. E. B.; Y LI, Y. (2011). Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer*, 30(6), 371. doi: <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10132>

CHEN, X.; LIU, J.; FENG, W. K.; WU, X.; Y CHEN, S. Y. (2015). MiR-125b protects against ethanol-induced apoptosis in neural crest cells and mouse embryos by targeting Bak 1 and PUMA. *Experimental neurology*, 271, 104-111. doi: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.026>

COHEN, J.; Y TORRES, C. (2019). Astrocyte senescence: evidence and significance. *Aging cell*, 18(3), e12937. doi: <https://doi.org/10.1111/acel.12937>

CUI, C.; SHURTLEFF, D.; Y HARRIS, R. A. (2014). Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *International review of neurobiology*, 118, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00001-4>

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; Y GODBOUT, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 139, 136-153. doi: <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>

DOKALIS, N.; Y PRINZ, M. (2019). Resolution of neuroinflammation: mechanisms and potential therapeutic option. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 41, No. 6, pp. 699-709). Springer Berlin Heidelberg. doi: <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00764-1>

DU, Y.; Y DREYFUS, C. F. (2002). Oligodendrocytes as providers of growth factors. *Journal of neuroscience research*, 68(6), 647-654. doi: <https://doi.org/10.1002/jnr.10245>

EL-ZAYAT, S. R.; SIBAI, H.; Y MANNAA, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-12. doi: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>

FERNÁNDEZ-LIZARBE, S.; MONTESINOS, J.; Y GUERRI, C. (2013). Ethanol induces TLR 4/TLR 2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *Journal of neurochemistry*, 126(2), 261-273. doi: <https://doi.org/10.1111/jnc.12276>

FERNÁNDEZ-LIZARBE, S.; PASCUAL, M.; GASCON, M. S.; BLANCO, A.; Y GUERRI, C. (2008). Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Molecular immunology*, 45(7), 2007-2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.10.025>

FORSYTHE, P. (2019). Mast cells in neuroimmune interactions. *Trends in neurosciences*, 42(1), 43-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.006>

GUERRI, C.; SAEZ, R.; SANCHO-TELLO, M.; DE AQUILERA, E. M.; Y RENAU-PIQUERAS, J. (1990). Ethanol alters astrocyte development: a study of critical periods using primary cultures. *Neurochemical research*, 15(5), 559-565. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00966217>

HAN, X.; ZHANG, T.; LIU, H.; MI, Y.; Y GOU, X. (2020). Astrocyte senescence and Alzheimer's disease: a review. *Frontiers in aging neuroscience*, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00148>

HOL, E. M.; Y PEKNY, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*, 32, 121-130. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>

IBÁÑEZ, F.; UREÑA-PERALTA, J. R.; COSTA-ALBA, P.; TORRES, J. L.; LASO, F. J.; MARCOS, M.; GUERRI, C.; Y PASCUAL, M. (2020). Circulating MicroRNAs in Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers of Alcohol-Induced Neuroinflammation in Adolescence: Gender Differences. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6730. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21186730>

IBRAHIM, J.; GARANTZIOTIS, S.; Y SAVANI, R. C. (2020). The Inflammation Superhighway: Tolls, Signals, and Pathways to Bronchopulmonary Dysplasia. In *Updates on Neonatal Chronic Lung Disease* (pp. 131-150). Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-68353-1.00009-9>

INDRIERI, A.; CARRELLA, S.; CAROTENUTO, P.; BANFI, S.; Y FRANCO, B. (2020). The pervasive role of the miR-181 family in development, neurodegeneration, and cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2092. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21062092>

JACK, C. S.; ARBOUR, N.; MANUSOW, J.; MONTGRAIN, V.; BLAIN, M.; MCCREA, E.; SHAPIRO, A.; Y ANTEL, J. P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4320-4330. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4320>

JASSAM, Y. N.; IZZY, S.; WHALEN, M.; MCGAVERN, D. B.; Y EL KHOURY, J. (2017). Neuroimmunology of traumatic brain injury: time for a paradigm shift. *Neuron*, 95(6), 1246-1265. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.010>

KAPUSCINSKI, J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5), 220-233. doi: <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>

KAWASAKI, T.; Y KAWAI, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, 5, 461. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>

KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; Y ALTMAN, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8(6), e1000412. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

LAFRENAYE, A. D.; MONDELLO, S.; WANG, K. K.; YANG, Z.; POVLISHOCK, J. T.; GORSE, K.; WALKER, S.; HAYES, R.; Y KOCHANNEK, P. M. (2020). Circulating GFAP and Iba-1 levels are associated with pathophysiological sequelae in the thalamus in a pig model of mild TBI. *Scientific reports*, 10(1), 1-17. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70266-w>

LANNOY, S.; DUKA, T.; CARBIA, C.; BILLIEUX, J.; FONTESSE, S.; DORMAL, V.; GIERSKI, F.; LÓPEZ-CANEDA, E.; SULLIVAN, E. V.; Y MAURAGE, P. (2021). Emotional processes in binge drinking: A systematic review and perspective. *Clinical psychology review*, 84, 101971. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2021.101971>

LEE, H. M.; KIM, T. S.; Y JO, E. K. (2016). MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB reports*, 49(6), 311. doi: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.6.056>

LIAN, H.; Y ZHENG, H. (2016). Signaling pathways regulating neuron–glia interaction and their implications in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 136(3), 475-491. doi: <https://doi.org/10.1111/jnc.13424>

LIU, L. R.; LIU, J. C.; BAO, J. S.; BAI, Q. Q.; Y WANG, G. Q. (2020). Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular unit. *Frontiers in Immunology*, 11, 1024. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01024>

MANDREKAR, P.; BALA, S.; CATALANO, D.; KODYS, K.; Y SZABO, G. (2009). The opposite effects of acute and chronic alcohol on lipopolysaccharide-induced inflammation are linked to IRAK-M in human monocytes. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1320-1327. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803206>

MATEJUK, A.; Y RANSOHOFF, R. M. (2020). Crosstalk between astrocytes and microglia: an overview. *Frontiers in Immunology*, 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416>

MILLER, S. J.; ZHANG, P. W.; GLATZER, J.; Y ROTHSTEIN, J. D. (2017). Astroglial transcriptome dysregulation in early disease of an ALS mutant SOD1 mouse model. *Journal of neurogenetics*, 31(1-2), 37-48. doi: <https://doi.org/10.1080/01677063.2016.1260128>

MOLNAR, C.; Y GAIR, J. (2013). Neurons and Glial Cells, en *Concepts of Biology-1st Canadian Edition*. Editorial BCcampus, Houston: 549-561

MONTESINOS, J.; PASCUAL, M.; PLA, A.; MALDONADO, C.; RODRÍGUEZ-ARIAS, M.; MIÑARRO, J.; Y GUERRI, C. (2015). TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain, behavior, and immunity*, 45, 233-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.015>

MONTOLIU, C.; SANCHO-TELLO, M.; AZORIN, I.; BURGAL, M.; VALLES, S.; RENAU-PIQUERAS, J.; Y GUERRI, C. (1995). Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 65(6), 2561-2570. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65062561.x>

MORALES, I.; FARÍAS, G. A.; CORTES, N.; Y MACCIONI, R. B. (2016). Neuroinflammation and neurodegeneration. *Update on Dementia*. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/64545>

NASR, I. W.; CHUN, Y.; Y KANNAN, S. (2019). Neuroimmune responses in the developing brain following traumatic brain injury. *Experimental neurology*, 320, 112957. doi: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.112957>

NEJAD, C.; PÉPIN, G.; BEHLKE, M. A.; Y GANTIER, M. P. (2018). Modified polyadenylation-based RT-qPCR increases selectivity of amplification of 3'-MicroRNA isoforms. *Frontiers in genetics*, 9, 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00011>

NENNIG, S. E.; Y SCHANK, J. R. (2017). The role of NFkB in drug addiction: beyond inflammation. *Alcohol and Alcoholism*, 52(2), 172-179. doi: <https://doi.org/10.1093/alcalc/agw098>

NIE, L.; CAI, S. Y.; SHAO, J. Z.; Y CHEN, J. (2018). Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Frontiers in immunology*, 9, 1523. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01523>

NORDEN, D. M.; TROJANOWSKI, P. J.; VILLANUEVA, E.; NAVARRO, E.; Y GODBOUT, J. P. (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2), 300-316. doi: <https://doi.org/10.1002/glia.22930>

OLMOS, G.; Y LLADÓ, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation*, 2014. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/861231>

O'REILLY, M. L.; Y TOM, V. J. (2020). Neuroimmune system as a driving force for plasticity following CNS injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00187>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (2018). Informe sobre la Situación Mundial sobre el Alcohol y la Salud.

PAN, H.; WANG, H.; WANG, X.; ZHU, L.; Y MAO, L. (2012). The absence of nrf2 enhances nf-b-dependent inflammation following scratch injury in mouse primary cultured astrocytes. *Mediators of inflammation*, 2012. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/217580>

PASCUAL, M.; UREÑA-PERALTA, J. R.; Y GUERRI, C. (2020). The regulatory role of miRNAs in ethanol-induced TLR4 activation and neuroinflammation. *Current Pathobiology Reports*, 8, 37-45. doi: <https://doi.org/10.1007/s40139-020-00208-8>

PERCIE DU SERT, N.; HURST, V.; AHLUWALIA, A.; ALFAM, S.; AVEY, M. T.; BAKER, M.; BROWNE, W.; CLARK, A.; CUTHILL, I.; DIRNAGL, U.; EMERSON, M.; GARNER, P.; HOGLATE, S.; HOWELLS, D.; KARP, N.; LAZIC, S.; LIDSTER, K.; MACCALLUM, C.; MACLEOD, M.; PEARL, E.; PETERSEN, O.; RAWLE, F.; REYNOLDS, P.; K ROONEY, K.; SENA, E.; SILBERBERG, SK.; STECKLER, T.; Y WÜRBEL, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(9), 1769-1777. doi: <https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>

PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

PITTOCK, S. J.; Y LUCCHINETTI, C. F. (2007). The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *The neurologist*, 13(2), 45-56. doi: <https://doi.org/10.1097/01.nrl.0000253065.31662.37>

PÓSFAL, B.; CSERÉP, C.; ORSOLITS, B.; Y DÉNES, Á. (2019). New insights into microglia–neuron interactions: a neuron’s perspective. *Neuroscience*, 405, 103-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.046>

RAI, J.; Y KAUSHIK, K. (2018). Reduction of animal sacrifice in biomedical science & research through alternative design of animal experiments. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(6), 896-902. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.03.006>

RUSSELL, W. M. S.; Y BURCH, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Editorial Methuen. Londres

SCHAEFER, A.; O'CARROLL, D.; TAN, C. L.; HILLMAN, D.; SUGIMORI, M.; LLINAS, R.; Y GREENGARD, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *The Journal of experimental medicine*, 204(7), 1553-1558. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20070823>

SLOTA, J. A.; Y BOOTH, S. A. (2019). MicroRNAs in neuroinflammation: implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. *Non-coding RNA*, 5(2), 35. doi: <https://doi.org/10.3390/ncrna5020035>

SNEDDON, L. U.; HALSEY, L. G.; Y BURY, N. R. (2017). Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *Journal of Experimental Biology*, 220(17), 3007-3016. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.147058>

SU, W.; HOPKINS, S.; NESSER, N. K.; SOPHER, B.; SILVESTRONI, A.; AMMANUEL, S.; JAYADEV, S.; MÖLLER, T.; WEINSTEIN, J.; Y GARDEN, G. A. (2014). The p53 transcription factor modulates microglia behavior through microRNA-dependent regulation of c-Maf. *The Journal of Immunology*, 192(1), 358-366. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301397>

TALBOT, S.; FOSTER, S. L.; Y WOOLF, C. J. (2016). Neuroimmunity: physiology and pathology. *Annual review of immunology*, 34, 421-447. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055340>

TAYLOR, K.; GORDON, N.; LANGLEY, G.; Y HIGGINS, W. (2008). Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Alternatives to Laboratory Animals*, 36(3), 327-342. doi: <https://doi.org/10.1177/026119290803600310>

TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; Y SZABO, G. (2016). Interleukin-1 and inflammasomes in alcoholic liver disease/acute alcoholic hepatitis and nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 64(3), 955-965. doi: <https://doi.org/10.1002/hep.28456>

VAINCHTEIN, I. D.; Y MOLOFSKY, A. V. (2020). Astrocytes and microglia: in sickness and in health. *Trends in neurosciences*, 43(3), 144-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.003>

VIDYA, M. K.; KUMAR, V. G.; SEJIAN, V.; BAGATH, M.; KRISHNAN, G.; Y BHATTA, R. (2018). Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 20-36. doi: <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1380200>

THOMPSON, W. L.; Y VAN ELDIK, L. J. (2009). Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-7 through NF κ B and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain research*, 1287, 47-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.081>

WU, W.; ZHANG, W.; CHOI, M.; ZHAO, J.; GAO, P.; XUE, M.; SINGER, H.; JOURD'HEUIL, D.; Y LONG, X. (2019). Vascular smooth muscle-MAPK14 is required for neointimal hyperplasia by suppressing VSMC differentiation and inducing proliferation and inflammation. *Redox biology*, 22, 101137. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101137>

WÜRBEL, H. (2017). More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. *Lab animal*, 46(4), 164-166. doi: <https://doi.org/10.1038/lablan.1220>

YUAN, M.; DA SILVA, A. C. A.; ARNOLD, A.; OKEKE, L.; AMES, H.; CORREA-CERRO, L. S.; VIZCAINO, M.; HO, C.; EBERHART, C.; Y RODRIGUEZ, F. J. (2018). MicroRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low-grade glioma. *Scientific reports*, 8(1), 1-14. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30942-4>

ZHANG, H.; TAY, P. N.; CAO, W.; LI, W.; Y LU, J. (2002). Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS letters*, 532(1-2), 171-176. doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03669-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03669-4)