

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA**

**Papel de las vesículas extracelulares
en la propagación y mantenimiento
de la neuroinflamación inducida
por el consumo de alcohol en la
adolescencia**

Doctorado en Biotecnología



TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Francesc Ibáñez Cabanes

Dirigida por:

Dra. Consuelo Guerri Sirera

Dra. María Pascual Mora



PRINCIPE FELIPE

CENTRO DE INVESTIGACION



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRÍNCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

CONSUELO GUERRI SIRERA, Dra. en Bioquímica por la Universidad de Valencia y MARÍA PASCUAL MORA, Dra. en Farmacia por la Universidad de Navarra,

CERTIFICAN:

Que el trabajo **“Papel de las vesículas extracelulares en la propagación y mantenimiento de la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol en la adolescencia”** ha sido desarrollado por Francesc Ibáñez Cabanes en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, como parte de un proyecto de tesis para la obtención del Doctorado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia.

Valencia, Junio de 2021

Dra. Consuelo Guerri Sirera

Dra. María Pascual Mora

*A mi familia y en especial a
mis abuelos Paco y Teresa*

Agradecimientos

Quién le diría al Paco de 2014, con recién acabada la carrera, mil pájaros en la cabeza y una gran incertidumbre laboral, que un día estaría escribiendo los agradecimientos de su tesis doctoral. Y es que en ningún momento de la carrera ni el máster se me pasó por la cabeza emprender este viaje, pues me parecía algo exclusivo a aquellos expedientes académicos impecables que en ese momento parecían tan lejanos al mío, y un tipo de trabajo que nunca me podría llegar a gustar. Qué equivocado estaba. La verdad que he tenido mucha suerte de poder hacer la tesis en un laboratorio como el de Patología Celular del Alcohol del CIPF, formado por grandes personas y profesionales.

A la Dra. Consuelo Guerri, Chelo, mi directora de tesis, que, a principios de otoño de 2016, supo ver en mí algo más que un número en un expediente, y decidió darme la oportunidad de realizar las prácticas y el Trabajo Final de Máster, que luego por suerte pude encadenar con una beca pre-doctoral. Quién conoce a Chelo no puede negar que su energía, su pasión por su trabajo y sus conocimientos son increíbles. Y no solo eso, es una jefa cercana y amable, algo que, por

Agradecimientos

desgracia, a veces escasea en ciencia. Gracias Chelo por darme esta oportunidad.

A la Dra. María Pascual, mi co-directora de tesis, gracias por estar siempre ahí para guiarme y para enseñarme todo lo que sé. Aunque no conseguiste inculcarme el EndNote y aún sigas regañándome hoy en día por usar Mendeley, poner frases filosóficas en los artículos y ser demasiado crítico.

A Jorge, por iniciarme en el estudio del alcohol y los exosomas, por seguir estando ahí aún a 6000 km de distancia, por aguantarme 3 meses de estancia en la gran manzana y por todos los consejos y sabiduría que me has transmitido. Eres muy grande y llegarás lejos, de eso no tengo duda, espero que en España no tarden en darse cuenta de ello y puedas volver pronto.

A Juan, gracias por ser un referente tanto a nivel profesional como personal. Cuando volviste, aportaste muchos conocimientos y sabiduría, pero, sobre todo, vida al laboratorio. Manejas a la perfección el equilibrio entre la profesionalidad y seriedad de un superior en un ambiente laboral, con la cercanía, amabilidad y “buenrollismo” de un amigo. También quería aprovechar para darle las gracias a Majo, por la vitalidad y la alegría que nos aportas, tu perseverancia y compromiso

con la ciencia tendrá sus frutos, de eso estoy seguro. Sois una pareja increíble.

A Rosa y Susana, las técnicas, el pilar de cualquier laboratorio. Rosa, aunque ya no estés en el grupo, nos acordamos mucho de ti, de tus enseñanzas, de tu calidez (no corporal, ya que podías llevar bufanda hasta en junio) y de tu saber estar. Susana, aunque llevas poco en el grupo, has conseguido integrarte mejor que nadie, y qué sería de nosotros sin tu apoyo en el trabajo y sin tus historietas a la hora de la comida. Esperamos ansiosos el desenlace de esta temporada. Muchas gracias a las dos.

A Carlos, porque no me deshago de ti ni queriendo, entraste en 2015 en mi vida y aún sigues aquí, aguantándome las borderias en casa y en el trabajo. Pero, aunque nos guste lanzarnos cuchillos de vez en cuando, sé que tengo un compañero y un amigo en el que confiar. Compartir laboratorio contigo ha hecho mucho más amena esta etapa doctoral y me alegro enormemente de tenerte a mi lado. “Raro pero en plan bien”, así te definía Marta, aquel día en Rumbo. La verdad que sí, raro eres un rato, pero eso te hace único, te hace destacar y hace que la gente que te conoce no se quede indiferente. No cambias tu forma de ser y de pensar por la opinión de los demás y yo eso es algo que respeto mucho. Vales mucho Carliños, no lo olvides.

Agradecimientos

A Marina, gracias por resolverme tantas dudas durante la tesis y por tus grandes recomendaciones de juegos. ¡Ya nos queda poco para ser libres!

También he de agradecer a todas aquellas personas del Centro de Investigación Príncipe Felipe que han estado ahí para mí en algún momento, ya sean de Servicios, o simplemente amigos y conocidos que me han escuchado y apoyado a lo largo de esta etapa.

Moltes gràcies als meus amics del poble, els de sempre. No sabeu el be que hem feia escapar el cap de setmana de Valencia i vore-vos, contar-nos les penes, i xir de festa (quan es podia), i riure i disfrutar de la vida amb vosaltres. Sens dubte heu sigut un recolzament molt important per a mí i espere que seguixca sent aixina durant molt de temps.

También aprovecho para dar las gracias a los asturianos valencianos, a los mexican crew, ya sea para unas birras, un Catán o una partida de pádel, siempre habéis estado ahí y, aún lejos de mi familia y amigos, me habéis hecho sentir como en casa.

¿Te imaginas? Esa era tu frase en el laboratorio, Tarei, y poco me imaginaba yo por aquel entonces lo importante que ibas a ser para mí. Se suponía que yo te tenía que enseñar a ti, pero al final resultó ser al revés. Me has enseñado a ser la mejor versión de mí mismo, a quererme

más, a reírme más y a vivir más. No sabes lo agradecido que estoy de que aparecieras en mi vida y te quedaras, no me la imagino sin ti. Has sido un apoyo constante, una compañera de viaje, alguien que me ha animado siempre a dar lo mejor de mí, y no te puedo pedir más, solo que sigas aguantándome. Ahora empieza tu etapa de tesis, pero no te preocupes que, aunque puede resultar imponente, también puede ser muy bonita, y con tus capacidades, estoy seguro que a finales de año estarás publicando ese Cell Metabolism que tanto te mereces. Y tranquila, que siempre voy a estar ahí, apoyándote y haciéndote la puñeta, a partes iguales.

Per últim, volia donar les gràcies a la meva família. Als meus pares, Juan i Paqui, al meu germà Joan i a la meva cunyada María (i a Joanet, la nova incorporació). Heu sigut un suport constant al llarg de la meua vida i mai vos ho podré agrair prou. També als meus oncles i ties, i en especial als meus avis Paco i Teresa. Abuelo, al final hem podré doctorar en la “biología tecnología ixa” com a tu t’agradava nomenar-la, soles desitjaría que poguereu estar ací per a compartir el moment amb vosaltres.

Resumen

El consumo de altas cantidades de etanol durante en un corto período de tiempo, conocido también como *consumo en atracción*, causa importantes alteraciones en el sistema nervioso central del adolescente, activando la respuesta innata inflamatoria, que puede causar muerte neuronal y alteraciones a nivel estructural y de la conducta. Esta respuesta se produce mediante la activación de los receptores de membrana Toll-like, y específicamente por los receptores TLR4, localizados en células gliales. Cuando dicho receptor se une a su ligando y dimeriza, desencadena una cascada de señalización que finaliza con la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, donde se promueve la síntesis y liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias al medio extracelular. Entre los mecanismos que podrían participar en la amplificación de la respuesta neuroinflamatoria se encontrarían un tipo de vesículas extracelulares (VEs), denominadas exosomas. Los exosomas son micropartículas de 30-150 nm de tamaño con un contenido de carácter bioactivo, formado por proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y que cumplen un papel importante en la comunicación intercelular. Por tanto, la hipótesis que planteamos en esta tesis doctoral es que las *VEs ejercen un papel en el mantenimiento y propagación de la neuroinflamación causada por el*

Resumen

consumo de alcohol en forma de atracción. Utilizando VEs de cultivos primarios de astrocitos demostramos que el etanol induce una mayor secreción de VEs y altera los niveles de determinadas proteínas y microARNs (miARNs) asociados con la neuroinflamación. Además, demostramos que cuando las neuronas corticales en cultivo se incuban con VEs procedentes de los astrocitos WT tratados con etanol, se inducen marcadores inflamatorios en las neuronas y presentan mayores niveles de apoptosis.

Durante el proceso de biogénesis exosomal, se ha demostrado la participación de una familia de enzimas, llamadas esfingomielinasas, que estarían relacionadas con la biogénesis y secreción de las VEs. Estudios previos de este laboratorio han demostrado que el etanol es capaz de activar las esfingomielinasas, aunque el mecanismo por el cual esto ocurre se desconoce. En este proyecto de tesis proponemos a las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) como mecanismo regulador de la secreción de VEs mediada por esfingomielinasas. Mediante el análisis de la actividad de transferencia de fosfolípidos, marcador de actividad de MAM, observamos que el etanol, tanto a nivel tisular como en cultivo, es capaz de activar MAM. Además, demostramos que, inhibiendo la actividad tanto de MAM como de las esfingomielinasas, se revierte el

aumento en secreción de VEs causado por el tratamiento con etanol. Estos resultados sugieren que el etanol promueve una mayor liberación de VEs mediante la activación de las enzimas esfingomielinasas a través de MAM.

Además, puesto que las VEs tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB) y tener estabilidad en la circulación, se han considerado como posibles candidatos a biomarcadores de situaciones patológicas. Uno de los elementos presentes en las VEs, que se ha utilizado recientemente como biomarcador en diversos estudios, son los miARNs, moléculas de ARN no codificante de cadena corta implicados en la regulación génica. Se ha descrito que, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson u otras, se detectan patrones de expresión diferencial de miARNs en las VEs circulantes, en comparación con pacientes control. En este estudio demostramos que el etanol es capaz de alterar los perfiles de miARNs relacionados con la inflamación presentes en VEs circulantes de jóvenes con intoxicación etílica aguda (IEA). Estos efectos presentan diferencias de género, siendo las mujeres/hembras más vulnerables a los efectos del alcohol, ya que la expresión de marcadores inflamatorios en cerebro y en VEs circulantes son más elevadas en mujeres/hembras que en hombres/machos. Estos

Resumen

resultados ponen de manifiesto que las VEs circulantes y sus perfiles de miARNs son posibles candidatos a biomarcadores de la neuroinflamación asociadas con el abuso de alcohol.

Resum

El consum d'elevades quantitats d'alcohol durant un curt període de temps, conegut també com a consum en afartament, causa importants alteracions en el sistema nerviós central de l'adolescent, activant la resposta innata inflamatòria, que pot causar mort neuronal i alteracions a nivell estructural i de conducta. Aquesta resposta es produeix mitjançant l'activació dels receptors de membrana Toll-like, i específicament pels receptors TLR4, localitzats en cèl·lules gials. Quan aquest receptor s'uneix al seu lligant i dimeritza, desencadena una cascada de senyalització que finalitza amb la translocació al nucli del factor de transcripció NF- κ B, on es promou la síntesi i alliberament de citokines i quimioquines pro-inflamatòries al medi extracel·lular. Dins dels mecanismes que podrien participar en l'amplificació de la resposta neuroinflamatòria es trobarien un tipus de vesícules extracel·lulars (VEs), denominades exosomes. Els exosomes són micropartícules de 30-150 nm de grandària amb un contingut de caràcter bioactiu, format per proteïnes, lípids i àcids nucleics, i que compleixen un paper important en la comunicació intercel·lular. Per tant, la hipòtesi que plantegem en aquesta tesi doctoral és que les VEs exerceixen un paper en el manteniment i propagació de la neuroinflamació causada pel consum d'alcohol en forma d'afartament.

Resum

Utilitzant VEs de cultius primaris d'astròcits demostrarem que l'etanol indueix una major secreció de VEs i una alteració dels nivells de determinades proteïnes i microARNs (miARNs) associats amb la neuroinflamació. A més a més, també observarem que quan les neurones corticals en cultiu s'incubaven amb VEs procedents dels astròcits WT tractats amb etanol, s'induien marcadors inflamatoris en les neurones i aquestes presentaven majors nivells d'apoptosi.

Durant el procés de biogènesi exosomal, s'ha demostrat la participació d'una família d'enzims, anomenats esfingomielinases, que estarien relacionats amb la biogènesi i secreció de les VEs. Estudis previs d'aquest laboratori han demostrat que l'etanol és capaç d'activar les esfingomielinases, encara que el mecanisme pel qual això passa es desconeix. En aquest projecte de tesi proposem a les membranes associades a mitocòndries (MAM), juntament amb les esfingomielinases com el mecanisme regulador de la secreció de VEs induïda pel consum d'alcohol. Mitjançant l'anàlisi de l'activitat de transferència de fosfolípids, marcador d'activitat de MAM, observarem que l'etanol, tant a nivell tissular com en cultiu, era capaç d'activar MAM. A més, demostrarem que inhibint l'activitat tant de MAM com de les esfingomielinases, revertiem l'augment en la secreció de VEs causat pel tractament amb etanol. Aquests resultats suggereixen, que

l'etanol promou una major alliberament de VEs mitjançant l'activació dels enzims esfingomielinases a través de MAM.

A més, ja que les VEs tenen la capacitat de creuar la barrera hematoencefàlica (BBB) i ser estables en circulació, s'han considerat bons candidats a biomarcadors de situacions patològiques. Un dels elements presents en les VEs que s'ha utilitzat recentment com a biomarcador en diversos estudis, són els miARNs, molècules d'ARN no codificant de cadena curta implicats en la regulació gènica. S'ha descrit que, en pacients amb malalties neurodegeneratives, com l'Alzheimer o Parkinson, es detecten patrons d'expressió diferencial de miARNs a les VEs circulants, en comparació amb pacients control. A aquest estudi demostrem que l'etanol és capaç d'alterar els perfils de miARNs relacionats amb la inflamació presents en VEs circulants de joves amb intoxicació etílica aguda (IEA). Aquests efectes presenten diferències de gènere, sent les dones / noies més vulnerables als efectes de l'alcohol, ja que l'expressió de marcadors inflamatoris en cervell i en VEs circulants són més elevades en noies que en nois. Aquests resultats posen de manifest a les VEs circulants i els seus perfils de miARNs com a possibles candidats a biomarcadors de la neuroinflamació associades amb l'abús d'alcohol.

Abstract

Heavy alcohol intake during a short period of time, also known as binge drinking, has been proved to produce negative effects on the individual's central nervous system by activating an inflammatory response that can lead to neuronal death and structural and behavioral alterations. This response is produced by glial cells, the main component of the neuroimmune system, through the activation of TLR4, a transmembrane receptor of the TLR family. When TLR4 binds to its ligand and dimerizes, it triggers a signaling cascade that ends up with the translocation of NF- κ B to the nucleus, acting as a transcription factor, where it promotes the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines and chemokines to the extracellular milieu. Among the mechanisms responsible for the transmission and amplification of this neuroinflammatory response, one candidate could be a kind of extracellular vesicles (VEs) called exosomes. Exosomes are microparticles of 30-150 nm in size, with a bioactive content, composed mostly by proteins, lipids and nucleic acids, which play an important role in intercellular communication. Therefore, the hypothesis of this thesis is that VEs play an important role in the transmission of the neuroinflammatory response caused by ethanol

binge drinking. Using VEs from primary cultures of astrocytes, we show that ethanol is able to induce a higher secretion of VEs and alters their composition of inflammatory related protein and microRNAs (miARNs). Furthermore, incubation of these VEs in primary cultures of neurons lead to the development of inflammatory protein and gene markers, and higher apoptosis levels.

Exosomal release has been shown to be partly regulated by a family of enzymes called sphingomyelinases, since inhibition of these enzymes resulted in a reduction of secreted VEs. Previous studies from this laboratory have shown that ethanol is able to activate sphingomyelinases, but the mechanism involved in the process is currently unknown. We propose membrane-associated mitochondria (MAM), along with sphingomyelinases, as the responsible for the increased VEs release after ethanol intake. We show that ethanol is capable of increasing phospholipid transfer activity, a marker of MAM activity. Moreover, MAM and sphingomyelinase inhibition resulted in depleted VEs secretion. These results suggest that ethanol promotes increased release of VEs by activating sphingomyelinase enzymes through MAM.

VEs display certain biological characteristics, like the ability to cross the blood-brain barrier (BBB) or their high stability in serum,

Abstract

which make them good candidates for biomarkers of pathological situations. One of the elements present in VEs that has recently been used as a biomarker in various studies are miARNs, which are short-chain non-coding RNA molecules involved in gene regulation. It has been described that differential expression patterns of miARNs in circulating VEs can be detected in patients with neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's or others, when compared to healthy patients. In this study we demonstrate that ethanol is able to alter the inflammatory-related miARNs expression patterns in circulating VEs of young people with acute alcohol intoxication (IEA). Notably, the alterations in miARNs are dependent on the patient's gender, being women/females more affected by alcohol than men/males, since women/females showed lower presence of anti-inflammatory miARNs and a higher expression of inflammatory markers in brain tissue than men/males. These results reveal that circulating VEs and their miARNs profiles content as possible candidates for biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation.

Publicaciones

Resultados producto de la realización de esta tesis doctoral y otras contribuciones han resultado en las siguientes publicaciones en revistas científicas indexadas:

- **Ibáñez, F.**, Montesinos, J., Ureña-Peralta, J. R., Guerri, C., & Pascual, M. (2019). TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 136.
- Pascual, M., **Ibáñez, F.**, & Guerri, C. (2020). Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation. *Neural regeneration research*, 15(5), 796–801.
- **Ibáñez, F.**, Ureña-Peralta, J. R., Costa-Alba, P., Torres, J. L., Laso, F. J., Marcos, M., Guerri, C., & 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.
- Cuesta, C. M., **Ibáñez, F.**, Lopez-Hidalgo, R., Ureña, J., Duro-Castano, A., Armiñán, A., Vicent, M. J., Pascual, M., & Guerri, C. (2021). A targeted polypeptide-based nanoconjugate as a

nanotherapeutic for alcohol-induced
neuroinflammation. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and
medicine*, 34, 102376

Listado de abreviaturas y siglas

ACTB-DsRed	β Actina conjugada a proteína roja fluorescente
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AGO2	Argonaute-2
AIM-2	Absent in melanoma 2
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASC	Apoptosis associated speck-like protein
BALs	Niveles de alcohol en sangre
BBB	Barrera hematoencefálica
Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II
CARD	Dominio de reclutamiento y activación de caspasas
CD9	Cluster of differentiation 9
CD11-b	Cluster of differentiation 11-b
CD14	Cluster of differentiation 14
CD63	Cluster of differentiation 63
CD81	Cluster of differentiation 81
CPF	Corteza prefrontal
DAMP	Patrón molecular asociado a daño endógeno
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

Listado de abreviaturas y siglas

dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DTT	Ditiotreitol
Foxo3	Forkhead box O3
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HMGB1	High mobility group box 1
HRP	Peroxidasa de rábano
IEA	Intoxicación etílica aguda
IFN-β	Interferon Beta
IFN16	Interferon gamma 16
IL-1β	Interleuquina-1Beta
IL-1R	Receptor de la Interleuquina-1Beta
ILV	Vesículas intraluminales
IQR	Intercuartil range
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
IRF3	Interferon regulatory factor 3
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Dominio rico en repeticiones de leucina
MAL	MyD88 adapter-like

Listado de abreviaturas y siglas

MAM	Membranas asociadas a mitocondrias
MAP-2	Microtubule associated protein 2
MAPK	Mitogen activated protein kinases
Mapk14	Mitogen activated protein kinase 14
MBP	Myelin basic protein
MD-2	Myeloid differentiation factor 2
MEM	Medio mínimo esencial
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
miARN	MicroARN
MVB	Cuerpos multivesiculares
MyD88	Mouse Myeloid differentiation primary response 88
NaVO3	Ortovanadato sódico
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	Nod-like Receptor
NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pre-miARN	Cadena precursora de miARN
Pri-miARN	Cadena primaria de miARN
Pro-	Forma inactiva/inmadura de una proteína

Listado de abreviaturas y siglas

PRR	Receptores detectores de patrones
PtdChol	Fosfatidilcolina
PtdEtn	Fosfatidiletanolamina
PtdSer	Fosfatidilserina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PYD	Dominio de unión a pirinas
RE	Retículo endoplasmático
RFP	Proteína roja fluorescente
RISC	RNA-induced silencing complex
SBF	Suero bovino fetal
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de base única
Stat3	Signal transducer and activators of transcription 3
TBK1	TANK-binding kinase 1
TIR	Toll/Interleukin receptor
TIRAP	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TLC	Thin layer chromatography
TLRs	Receptores Toll-Like
TLR4	Receptor Toll-like 4

Listado de abreviaturas y siglas

TLR4-KO	Knock-out para TLR4
Traf6	TNF receptor associated factor 6
TRAM	TRIF-related adapter protein
TRBP	Enzima de unión a ARN en respuesta a transactivación
TRIF	IR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TSG101	Tumor susceptibility gene 101
UTR	Untranslated region
VEs	Vesículas extracelulares
VE-WT-C	Vesículas extracelulares de astrocitos WT control
VE-WT-ET	Vesículas extracelulares de astrocitos WT tratados con etanol
VE-KO4-C	Vesículas extracelulares de astrocitos TLR4-KO control
VE-KO4-ET	Vesículas extracelulares de astrocitos TLR4-KO tratados con etanol
WT	Wild-type

Índice

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

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

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

1. Introducción

1.1. El sistema neuroinmune y las células de la glía

El sistema nervioso central (SNC) ha sido considerado durante mucho tiempo como un sistema autónomo, aislado del resto del organismo mediante la barrera hematoencefálica (BBB), que permite la entrada de moléculas pequeñas y excluye la de otras células del cuerpo y de organismos patógenos. Recientemente se ha demostrado que realmente sí ocurre una acción inmune en el cerebro. Esta acción es llevada a cabo por el sistema neuroinmune, un sistema compuesto principalmente por células de la glía y mastocitos^{1,2}. Durante una respuesta neuroinmune, se ha visto que, algunas células del sistema inmune, como los macrófagos o las células T, también pueden extravasar al SNC^{3,4}. Este sistema cumple funciones importantes tanto en el mantenimiento de la homeostasis del tejido como en la protección frente a las infecciones y lesiones^{5,6}. Además, se ha comprobado que el sistema neuroinmune regula positivamente aspectos tan importantes como el aprendizaje, la memoria y la generación de nuevas neuronas, así como su plasticidad⁷. Estas acciones las ejercen principalmente dos tipos celulares, la microglía y la astrogía. La microglía es activada mediante estímulos procedentes de una infección y/o lesión, procesos tras los cuales sufre una transformación y se vuelve capaz de fagocitar, de sintetizar citoquinas inflamatorias y de presentar antígenos, ya que

Introducción

en este estado su contenido proteico varía⁸. Estas capacidades ponen a la microglía como unas de las primeras líneas de defensa frente a las infecciones en el SNC.

Por otra parte, los astrocitos cumplen una función dirigida al mantenimiento de los tejidos y la regulación del ambiente cerebral, ya que contribuyen directamente en la formación y establecimiento de la BBB, controlan el pH del espacio extracelular, aportan apoyo a las neuronas en forma de nutrientes y las ponen en contacto con vasos sanguíneos^{9,10}. Estas células también están involucradas en procesos de recuperación de lesiones mediante la regulación de la inflamación cerebral^{8,11}.

La neuroinflamación, orquestada por las células de la glía, ejerce una función protectora frente al ataque de microorganismos, y sus beneficios han sido ampliamente demostrados^{4,12}. No obstante, una inflamación continuada y desregulada, debida a una imposibilidad en la resolución del estado inflamatorio o a un estímulo constante, puede desembocar en efectos negativos sobre los propios tipos celulares del cerebro, que a su vez producen efectos a mayor escala en la memoria, la plasticidad neuronal y la neurogénesis^{13,14}. Se ha asociado un gran número de enfermedades neurodegenerativas con una sobre activación

del sistema neuroimmune, como por ejemplo en Alzheimer, Parkinson o esclerosis múltiple¹⁵⁻²⁰.

1.2. La respuesta neuroinflamatoria y sus receptores

La inflamación es un proceso celular de gran importancia para la supervivencia del individuo, en el cual actúan de manera conjunta diferentes elementos celulares con el fin de que el proceso se lleve a cabo de manera efectiva y controlada¹². Uno de los encargados de empezar la reacción inflamatoria son los receptores proteicos presentes en las células de la glía, que detectan los patógenos causantes de la infección²¹. Estos receptores reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y su función radica en la detección de los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs)²². La unión de estos elementos a dichos receptores desencadena una cascada de señalización que culmina con la síntesis y liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias al medio extracelular²³. Una de las familias de PRR mejor estudiadas, que en primera instancia fueron descubiertas en *Drosophila melanogaster*, son la familia de los receptores *Toll-like*²⁴ (TLR). Esta familia de proteínas comprende un

Introducción

amplio abanico de tipos de receptores capaces de detectar diferentes conjuntos de PAMPs y DAMPs²⁵. Se han descrito 10 TLRs en humano (1-10) y 12 en ratón (1-13) (Figura 1), con gran conservación evolutiva entre ambos²⁶. Consisten en glicoproteínas transmembrana de clase I compuestas por un dominio TIR (*Toll/Interleukin receptor*) intracitoplasmático y un dominio extra-citoplasmático rico en residuos de leucina (LRR) que adquiere una forma cóncava, cuya utilidad está relacionada con la detección y unión a sus respectivos PAMPs y DAMPs²⁷.

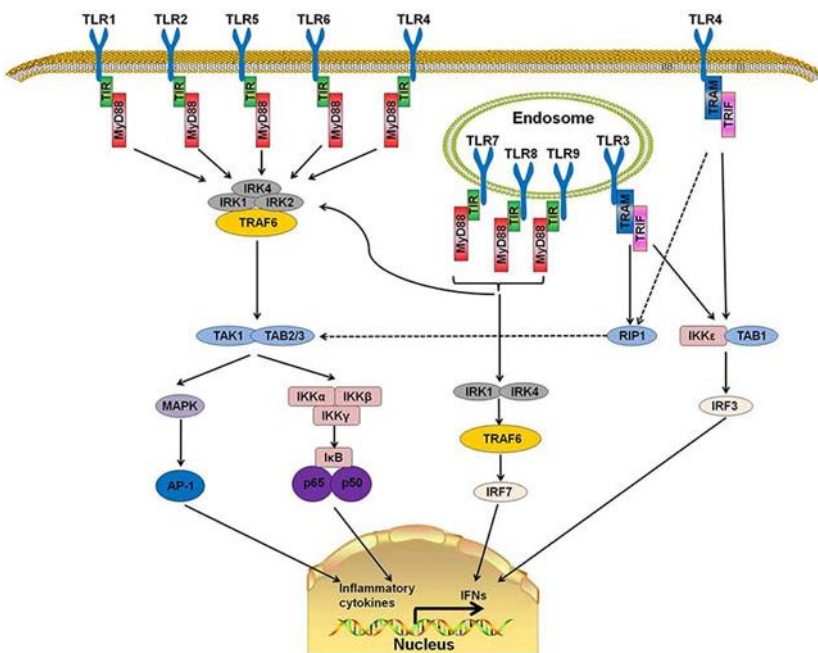


Figura 1: Localización y señalización de los diferentes receptores de la familia TLR. Extraída de Zheng y colaboradores²⁸, con licencia CC BY 4.0.

Una de las proteínas más destacadas de la familia de los TLRs es el TLR4, un receptor transmembrana que puede encontrarse en la membrana plasmática de un gran número de tipos celulares de nuestro organismo, pero que se encuentra principalmente en las células gliales²⁹. El ligando principal de esta proteína es el lipopolisacárido (LPS) presente en las paredes celulares de las bacterias Gram negativas, aunque también es capaz de reconocer otras moléculas, como el ácido hialurónico, o incluso otras proteínas como la HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*)^{29,30}. Una vez que el ligando se une a la parte extracelular del TLR4, éste es transferido al co-receptor CD14 (*Cluster of differentiation 14*), que a su vez se une al cofactor de diferenciación mielóide 2 (MD-2), formándose un complejo entre las 3 proteínas^{31,32}. Éste complejo debe formar un dímero con otro complejo igual (LPS/MD-2/TLR4) para que se transfiera la señal. Se ha experimentado con ratones deficientes para MD-2 y se ha observado que no existe respuesta inflamatoria al LPS en éstos³¹. Tras la dimerización, se produce el reclutamiento de diferentes proteínas en las llamadas balsas lipídicas³³, que son unos microdominios de la membrana de características de fluidez y contenido diferentes al resto de la membrana plasmática³⁴. Llegados a este paso, se pueden seguir dos posibles vías de señalización: la ruta dependiente de MyD-88

Introducción

(*Mouse Myeloid differentiation primary response 88*) y la ruta dependiente de TRIF (*IR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*).

La primera vía de señalización, conocida como la vía dependiente de MyD-88, utiliza adaptadores MyD-88 (MAL) y proteínas asociadas a TIR (TIRAP) que activa a las quinasas IRAK1 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) e IRAK4 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 4*), desencadenando una estimulación rápida de NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), así como la activación de quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y la proteína activadora-1 (AP-1)^{35,36}. Estos elementos han sido descritos como reguladores de citoquinas y quimioquinas inflamatorias^{25,27,37}. Además, NF- κ B no solo contribuye a la reacción inflamatoria y a la apoptosis celular, sino que también es esencial para la supervivencia neuronal, protegiéndolas de estrés oxidativo o neurodegeneración causada por isquemia³⁸.

En cuanto a la ruta dependiente de TRIF, el reclutamiento de los adaptadores TRIF y TRAM (*TRIF-related adaptor protein*) promueve la unión a la proteína TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), la cual fosforila a IRF3 (*IFN regulatory factor 3*), que se traslada al

núcleo, donde actúa como factor de transcripción de genes relacionados con IFN- β (*Interferon Beta*)^{36,39,40}.

Otra parte del engranaje molecular que participa activamente en el proceso inflamatorio son los inflamasomas. Los inflamasomas son complejos multiméricos compuestos por una molécula sensora conectada a caspasa 1 mediante la proteína adaptadora ASC^{41,42} (*Apoptosis associated speck-like protein*). ASC está formada por un dominio de unión a pirinas (PYD) y un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (CARD). Uno de los inflamasomas mejor descritos hasta el momento son los NLR (*Nod-like receptor*) y en especial el NLRP3 (*NLR Family Pyrin Domain Containing 3*), compuesto por un dominio central de unión a nucleótidos, un dominio LRR en el extremo C-terminal y un PYD en el extremo N-terminal^{43,44}. NLRP3 no posee un dominio CARD propio, por lo que debe unirse a ASC mediante su dominio PYD para la continuación del ensamblaje y su posterior activación de caspasa 1^{41,44}. La activación de caspasa-1, mediante el inflamasoma, conlleva el procesamiento y posterior activación de interleuquinas pro-inflamatorias como pro-IL-1 β o pro-IL-6, que son liberadas al medio extracelular, generando inflamación^{43,45}.

Introducción

El enlace entre el inflamasoma de NLRP3 y la proteína TLR4 ocurre mediante la activación de TLR4 por la unión a su ligando LPS, lo que produce un incremento en los niveles de ARNm intracelular de NLRP3 y pro-IL-1 β ⁴⁶. Tras esto, se requiere de un segundo estímulo para la completa activación del inflamasoma. Esto puede darse por diferentes estímulos, como la presencia de ARNm bacteriano en el interior celular, la secreción de IFN de tipo 1 derivada de la misma activación de TLR4, especies reactivas de oxígeno y/o flujos iónicos, entre otros^{44,47}. El NLRP3 se expresa en microglía, astrogliá, y neuronas y se ha relacionado con diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, como el Alzheimer, diabetes, obesidad o artritis⁴⁸⁻⁵¹, aunque en la primera enfermedad en la que se identificó su papel principal fue en síndromes periódicos asociados a criopirinas⁴³.

1.3. El alcohol y la respuesta neuroinflamatoria

Las primeras evidencias de los efectos neuroinflamatorios del alcohol en el SNC se remontan a 2004, donde Blanco y colaboradores⁵² propusieron los receptores TLR4/IL-R como medio de acción por el cual el etanol sería capaz de activar rutas inflamatorias en células de la glía. Poco más tarde, en 2008, los mismos autores describieron que el

etanol era capaz de promover la dimerización e internalización (y consecuente activación) de dichos receptores mediante la movilización de balsas lipídicas en células astrogliales³³. La activación de estas proteínas sería el paso inicial de una cascada de señalización que llevaría a la activación de la ruta de NF- κ B, promoviendo la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias en microglía y astroglia^{33,53} (Figura 2). Estudios *in vivo* recientes de este laboratorio demostraron que el etanol, administrado en altas dosis a tiempos cortos (3g/kg, 8 dosis espaciadas durante 14 días) a ratones de cepa silvestre o *Wild-type* (WT) en etapa adolescente, producía una respuesta inflamatoria y daños en la estructura mielínica en la corteza prefrontal (CPF), provocando en última instancia alteraciones conductuales en la memoria de trabajo y el procesamiento de la información⁵⁴. Sin embargo, al llevar a cabo este mismo estudio en ratones *knock-out* para el TLR4 (TLR4-KO), no se observaron ninguno de los efectos perjudiciales presentes en los ratones WT, dejando de manifiesto el importante papel del TLR4 en la respuesta inmune producida por el alcohol en el cerebro adolescente y adulto⁵⁴. Montesinos y colaboradores^{55,56} demostraron que la respuesta neuroinflamatoria producida por el etanol era más acusada en ratones adolescentes hembras y que además ésta era capaz de generar cambios a nivel

Introducción

estructural que se mantenían en el organismo durante 14 días sin nuevas administraciones de etanol.

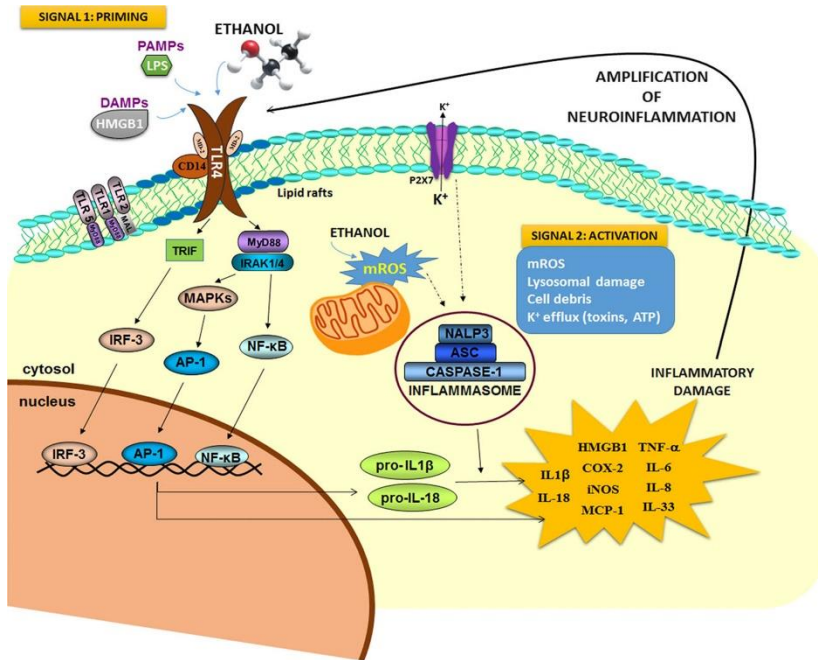


Figura 2: Representación esquemática de la activación de la ruta del TLR4 e inflammasoma de NLRP3 por acción del etanol. Extraída de Montesinos y colaboradores⁵⁷.

1.4. La adolescencia como período de iniciación al consumo de alcohol

Las bebidas alcohólicas fermentadas aparecieron en las sociedades humanas hace aproximadamente unos 9.000 años y desde

entonces se han integrado y establecido como elemento fundamental en multitud de relaciones sociales humanas, ya sea para celebrar un triunfo deportivo o cerrar un trato con posibles clientes. Esta amplia aceptación por parte de la sociedad no exonera a las bebidas alcohólicas de sus extensos efectos negativos, especialmente en determinados grupos sociales, como son los más jóvenes. El consumo de alcohol entre éstos ha ido aumentando en los últimos años, convirtiéndose en la droga más consumida por este grupo de población (14-18 años), según datos de los últimos años (77,9% de la población⁵⁸). Este consumo tan extendido está asociado con consecuencias negativas a nivel sanitario, social y económico⁵⁹. A parte de ser la droga más consumida en este grupo de población, presenta una temprana edad media de inicio al consumo (14,1 años) y es ligeramente más prevalente en mujeres que en hombres (79,4 % de mujeres frente al 76,3% de hombres⁵⁸). El patrón de consumo de alcohol preferido por los adolescentes corresponde al popularmente conocido como “botellón”, basado en una ingesta de alcohol en atracón en poco tiempo (la ingesta en atracón corresponde a 5 bebidas alcohólicas en hombres y 4 en mujeres o cuando se han alcanzado niveles de alcohol en sangre superiores a 0,08% en un período de 2 horas o inferior⁶⁰). Este tipo de ingesta les permite alcanzar

Introducción

rápido un estado de embriaguez donde sienten una mayor desinhibición, lo que les facilita el entablar o fortalecer relaciones sociales y a ser más propensos a tomar decisiones y acciones de alto riesgo, lo que supone un peligro para ellos y para otros⁶¹. Este tipo de consumo en esta edad es especialmente peligroso debido a que estos adolescentes aún se encuentran en un período de maduración, no solo a nivel corporal, sino también a nivel neurológico y cognitivo, lo que les confiere una mayor versatilidad para el aprendizaje, pero también una mayor vulnerabilidad a los efectos neurotóxicos asociados al consumo de drogas, entre ellas el alcohol⁶². Una de las regiones cerebrales más tardías en su maduración es la CPF, presente en la parte anterior del lóbulo frontal y la encargada del procesamiento cognitivo y las funciones ejecutivas^{63,64} (entiéndase por funciones ejecutivas aquellas relacionadas con juicios morales, control social, expresión de la personalidad, toma de decisiones o inhibición de comportamientos de riesgo). Esta región finaliza su maduración a los 19-21 años. Alteraciones en esta región han demostrado afectar a la memoria de trabajo, atención selectiva y comportamientos anómalos relacionados con el procesamiento de la información y el aprendizaje^{65,66}. Además, existen estudios que demuestran que el iniciarse en el consumo de bebidas alcohólicas a edades tempranas aumenta en gran medida las

posibilidades de desarrollar problemas de alcoholismo en la edad adulta⁶⁷.

1.5. Exosomas y vesículas extracelulares

La comunicación intercelular está mediada principalmente por contactos célula-célula y por los secretomas de las células, que liberan proteínas y otros componentes al medio extracelular mediante exocitosis endosomal⁶⁸. Estos componentes liberados por las células reciben el nombre de vesículas extracelulares (VEs) y se pueden clasificar en tres grandes grupos acorde a su tamaño y origen: exosomas (30-150 nm), microvesículas (100-1000 nm) y cuerpos apoptóticos (>1000 nm)⁶⁹⁻⁷¹. Los exosomas han recibido una gran atención en los últimos años debido a la gran cantidad de información emergente que ha aparecido demostrando la importancia de su función en la comunicación celular. Estas vesículas fueron descritas por primera vez en 1983 por Pan y Johnstone⁷², quienes las descubrieron asociadas a receptores de transferrina liberados a la sangre por reticulocitos maduros de oveja. La importancia de los exosomas radica en su contenido, que mayormente presenta proteínas, ácidos nucleicos de diferente naturaleza y lípidos⁶⁹⁻⁷¹. Dicho contenido se transporta

Introducción

desde la célula de origen hasta la célula diana, donde es liberado y donde puede afectar al estado fisiológico o patológico de dicha célula⁷³⁻⁷⁶. Aunque el presente proyecto de tesis se basa en el estudio de exosomas, debido a la naturaleza imperfecta de las técnicas utilizadas para su aislamiento, nos referiremos a este tipo de muestra con su término general, VEs.

1.5.1. Biogénesis exosomal

La biogénesis exosomal es un proceso complejo compuesto por 3 fases. La primera fase corresponde a una invaginación de la membrana plasmática celular, que produce una encapsulación de elementos presentes en ésta y el citosol, formando endosomas tempranos. La siguiente fase corresponde a la maduración de estos endosomas a endosomas tardíos, donde ocurre un segundo evento de invaginación de membrana, en este caso de la membrana del endosoma, formando vesículas intraluminales (ILV). Una vez se ha producido esta maduración, los endosomas reciben el nombre de cuerpos multivesiculares (MVB)⁷⁷. La tercera y última fase corresponde a la liberación de esas ILV presentes dentro de los MVB, que puede darse en 3 lugares diferentes: pueden transportarse al complejo del lisosoma para su degradación, pueden mantenerse como un sistema de almacenamiento temporal dentro de la célula o pueden

transportarse a la membrana plasmática, donde los MVB se fusionarán con ella, liberando las ILV al medio extracelular, recibiendo la terminología de exosomas^{78,79} (Figura 3).

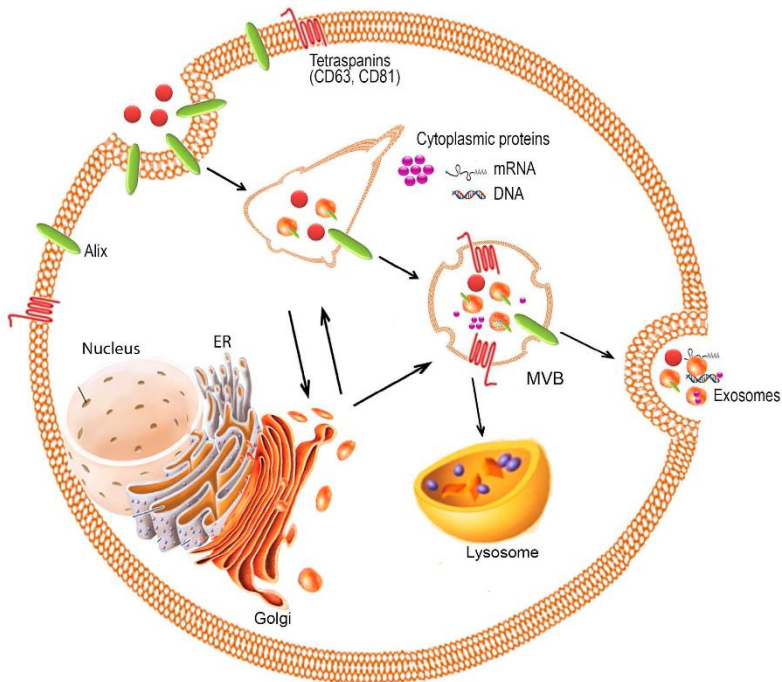


Figura 3: Representación del proceso de biogénesis exosomal. Adaptada de Rashed y colaboradores⁶⁹, con licencia CC BY 4.0.

1.5.2 Estructura y composición exosomal

Los exosomas están formados por una bicapa lipídica que engloba proteínas, diferentes tipos de ácidos nucleicos y lípidos⁶⁹⁻⁷¹. El contenido proteico presente tanto en el interior como embebido en la

Introducción

bicapa depende en gran parte del tipo celular del que proviene el exosoma y generalmente se encuentra enriquecido en determinadas moléculas, como proteínas de fusión (las tetraspaninas CD9 (*Cluster of differentiation 9*), CD63 (*Cluster of differentiation 63*) y CD81 (*Cluster of differentiation 81*), entre otras), enzimas citoplasmáticas (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)), peroxidasas y/o piruvato quinatas), chaperonas (como las proteínas de choque térmico Hsp60, Hsp70 y Hsp90), proteínas de transporte (proteínas Rab, y anexinas) y proteínas involucradas en la formación de MVB (Alix, TSG101 (*Tumor susceptibility gene 101*) o clatrina)^{69-71,79,80}. Algunas de estas proteínas, como las tetraspaninas, Hsp70, Alix o TSG101 son utilizadas frecuentemente como marcadores exosomales para técnicas de inmunodetección en membrana⁷⁹. Además del tipo celular de origen, un factor que influye en gran medida en el contenido de los exosomas es el estado fisiológico de dicha célula de origen⁷⁹. Por ejemplo, los exosomas derivados de células presentadoras de antígenos se encuentran enriquecidos en moléculas presentadoras de antígenos, incluidos los complejos mayores de histocompatibilidad I y II, así como moléculas co-estimuladoras⁸¹.

Uno de los componentes principales de los exosomas son los lípidos. Los exosomas se encuentran enriquecidos en colesterol,

diglicéridos, glicerofosfolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos y glicolceramidas (incluidas la esfingomielina y la ceramida)⁸². Aparte de los nombrados, lípidos bioactivos como las prostaglandinas, los leucotrienos y enzimas activos en el metabolismo de los lípidos, como la fosfolipasa C, también se han localizado en exosomas^{82,83}. De esta manera, los exosomas funcionan como transportadores de lípidos bioactivos a las células diana.

Además de proteínas y lípidos, los exosomas transportan en su interior moléculas funcionales de ARN, incluyendo ARNm y ARN no codificante como ARN de cadena larga, ARN de transferencia, ARN asociado a Piwi o microARNs (miARNs)⁸⁴. Estas moléculas, y en especial los miARNs, han demostrado tener un efecto en las células receptoras de los exosomas⁸⁵⁻⁸⁹. La biogénesis, función e importancia de los miARNs presentes en las VEs se detallarán más adelante en el presente trabajo, en el punto 1.6.

1.5.3. Funciones fisiopatológicas de los exosomas

Cuando se descubrieron los exosomas y se acuñó el término como tal, se les asignó el papel de retirar proteínas innecesarias de la célula y se les conoció vulgarmente como las “bolsas de basura celulares”⁹⁰. No obstante, evidencias recientes prueban que los exosomas estarían cumpliendo un rol mucho más importante, más allá

Introducción

de simplemente ser un medio para eliminar “basura celular”^{45,68}. Así, se ha demostrado que estas vesículas pueden estar involucradas tanto en procesos fisiológicos como patológicos, y que esta dualidad deriva de la diversidad inherente a este tipo de vesículas, ya que dependiendo de su contenido y del tipo celular del que provienen, pueden ejercer funciones opuestas⁷⁹. En condiciones normales, los exosomas pueden participar en un gran número de procesos homeostáticos, como la apoptosis, la angiogénesis, la neurogénesis, la regeneración de tejido lesionado, la proliferación celular, la inflamación y la anti-inflamación, entre otras^{71,74,91,92} (Figura 4).

Estado fisiológico

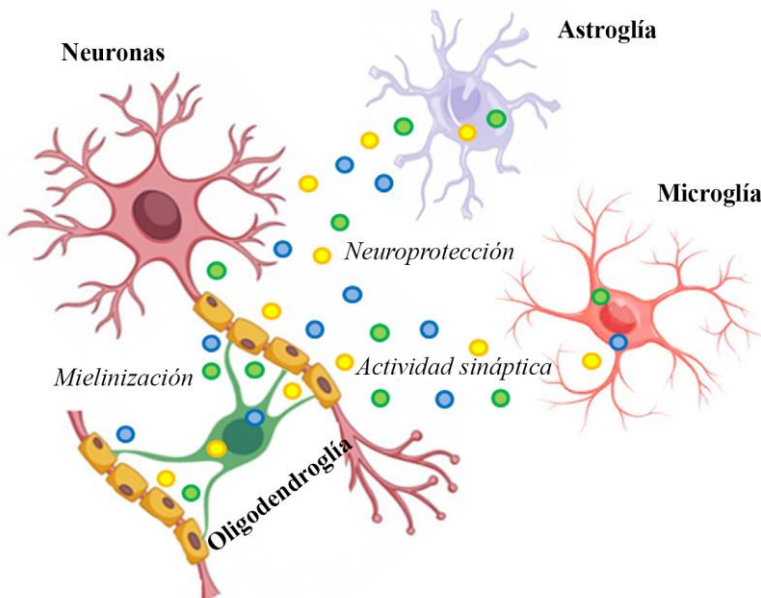


Figura 4: Comunicación intercelular mediante VEs en el SNC en un contexto fisiológico

Uno de los órganos que mayor mantenimiento requiere y cuya homeostasis es muy importante para el correcto funcionamiento del organismo es el SNC. Se ha demostrado que los exosomas secretados por los diferentes tipos celulares del SNC son capaces de llevar a cabo diversas funciones, por ejemplo, se ha descrito que los exosomas secretados por neuronas están involucrados en la eliminación de sinapsis durante el remodelamiento neuronal⁹⁴, o que los exosomas de astrocitos pueden promover el crecimiento de neuritas en neuronas hipocámpales y protegerlas en condiciones hipóxicas⁹⁵, así como los oligodendrocitos pueden secretar exosomas con niveles altos de elementos que componen las vainas de mielina, necesarias para dar soporte trófico a los axones^{76,96}. Además, los exosomas también tienen capacidades inmuno-moduladoras, conteniendo moléculas presentadoras de antígenos y otros elementos relacionados con la inflamación, como el miARN mir-146a-5p, que podría estar relacionado con la pérdida de sinapsis excitatorias en neuronas^{97,98}.

Por otro lado, los exosomas también pueden estar involucrados en la patogénesis de muchas enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas⁹⁹. Los exosomas derivados de astrocitos pueden

Introducción

llevar proteínas mal plegadas y moléculas pro inflamatorias, citoquinas o miARNs aberrantes que podrían ser transportados a neuronas y causar o continuar una respuesta inflamatoria, llevando en última instancia a la muerte neuronal y la degeneración⁹⁹. Resulta interesante remarcar que las VEs son capaces de cruzar la BBB, formando un canal de comunicación mediante el cual la inflamación sistémica puede modular procesos fisiológicos en el SNC¹⁰⁰ (Figura 5). En el contexto de la enfermedad de Parkinson, se ha demostrado que los exosomas proporcionan una plataforma ideal para la oligomerización de la α -sinucleína, que luego es dirigida a las células con mayor eficacia que en su forma libre, promoviendo la transmisión de la enfermedad a éstas¹⁰¹. Un caso similar se ha descrito en pacientes con Alzheimer, donde la presencia de la proteína precursora amiloide, su parte patológica procesada, el péptido β -amiloide, y la proteína Tau han sido detectadas¹⁰². Aunque se ha demostrado que la presencia de estas proteínas en los exosomas tiene una función neuroprotectora, ya que su destino sería la degradación por la microglía¹⁰³. Esto también podría presentar un riesgo real, pues éstos exosomas patogénicos podrían internalizarse por células adyacentes. De hecho, se ha visto una correlación entre liberación de exosomas y mayor número de

agregados utilizando inhibidores de la liberación de exosomas, como GW4869¹⁰⁴.

Estado neuroinflamatorio

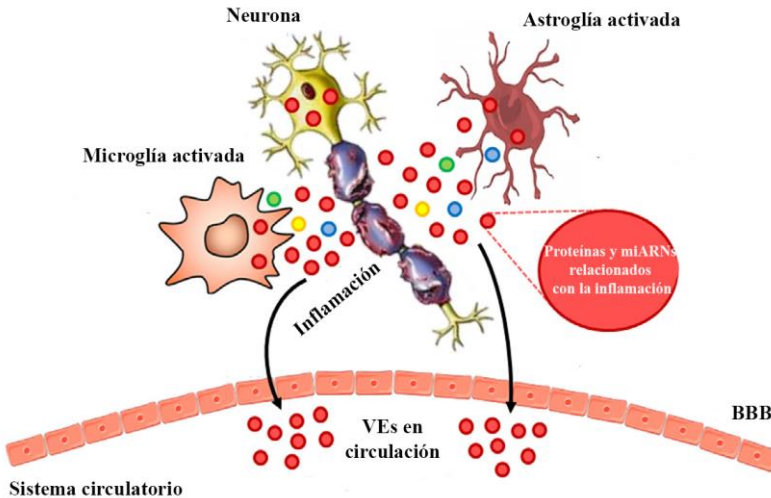


Figura 5: Representación esquemática de la comunicación glia-neuronas en una situación inflamatoria.

1.6. ¿Qué son los miARNs?

Los miARNs son moléculas de ARN no codificantes de cadena corta simple, cuya función principal es la regulación génica mediante complementariedad de secuencia con el gen diana. Aunque se

Introducción

descubrieron a principios de la década de los 90 por Lee y Ambros¹⁰⁵, el término “*microARN*” no fue acuñado hasta el 2001¹⁰⁶.

1.6.1. Biogénesis de los miARNs

La biogénesis de los miARNs empieza en el núcleo, donde la ARN polimerasa II transcribe una cadena primaria de ARN (pri-miARN) que luego es identificada y procesada por el complejo ARNasa III Drosha-DGCR8 para obtener un precursor de miARN (pre-miARN). Este precursor se transporta al citoplasma por la acción conjunta de la proteína Ran-GTP61 y la exportina-5 y después se procesa por la ARNasa III Dicer y la enzima de unión a ARN en respuesta a transactivación (TRBP). Este complejo corta el pre-miARN en una doble cadena de 22 nucleótidos que luego es reconocida por la proteína Dicer para generar dos simples cadenas cortas y complementarias (cadenas -5'p y -3'p), de las cuales una de ellas (la hebra anti-sentido) será seleccionada y transportada por la proteína Argonauta 2 (AGO2) hasta el complejo RISC (*RNA induced silencing complex*)¹⁰⁷. Este complejo RISC/AGO/miARN, será el encargado del reconocimiento y unión con el ARNm diana por complementariedad de secuencia para la inhibición/bloqueo de la transcripción¹⁰⁸ (Figura 6). Recientemente se han descrito mecanismos de procesamiento de los miARNs independientes de algunos pasos del proceso. Por ejemplo, se

ha descrito que mir-451a es independiente de Dicer y es directamente seleccionado por AGO2 para su procesamiento¹⁰⁹. Cabe destacar que estos complejos inhibidores de la transcripción se encuentran en unas regiones llamadas cuerpos P en el interior de las células, que son áreas compuestas por ARNm latentes con un alta actividad de procesamiento^{110,111}.

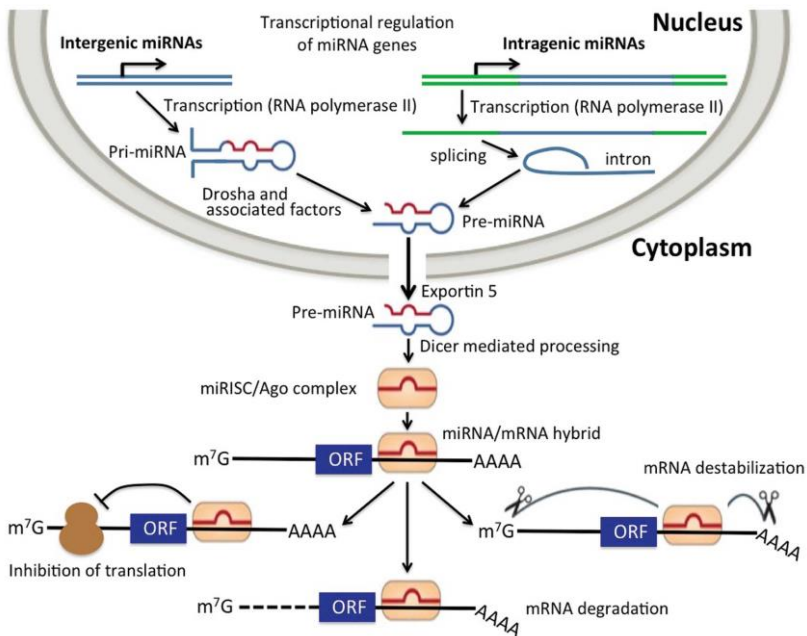


Figura 6: Biogénesis de los miARNs. Extraída de Piva y colaboradores¹¹² con el permiso de Spandidos Publications Ltd.

Introducción

1.6.2. Función de los miARNs

El objetivo de todo el procesamiento previamente descrito es la regulación o silenciamiento de los genes diana por parte de los miARNs¹¹³. Los miARNs pueden llevar a cabo sus funciones de diferentes maneras, ya sea por bloqueo de la transcripción o por rotura y degradación del ARNm al que se ha unido¹¹³. Esta unión, miARN/ARNm, se produce a través de la región semilla del miARN, una región de 2-8 nucleótidos en el extremo 5' que debe ser complementaria a la región UTR (*Untranslated region*) 3' de su ARNm diana. El grado de complementariedad entre ambas determina el mecanismo de regulación génica que se seguirá, mediante bloqueo de la transcripción o por degradación del mensajero diana^{114,115}. Un miARN puede regular varios ARNm, y un ARNm puede ser regulado por diferentes miARNs, lo que confiere una alta complejidad a este tipo de señalización¹¹⁶. La función de los miARNs es esencial para el desarrollo de los diferentes sistemas fisiológicos y el mantenimiento de la homeostasis celular^{114,117-119}.

1.6.3. Papel de los miARNs en la fisiopatología

Cada vez es mayor el grado de importancia que tienen los miARNs en el desarrollo y resolución de un gran número de patologías, ya sean enfermedades infecciosas, metabólicas, neurológicas,

autoinmunes e incluso en cáncer, donde estas moléculas pueden actuar tanto como oncogenes o como genes supresores de tumores^{117,120–122}. Se ha demostrado que polimorfismos genéticos en los miARNs y/o en las secuencias UTR de sus genes dianas, pueden contribuir a una desregulación de la expresión de los miARNs, que se traduce en un efecto importante en dichas enfermedades¹¹⁴. Por ejemplo, un polimorfismo de base única (SNP) en pre-mir146a, se traduce en una menor expresión del miARN maduro, lo que tiene una relación directa con una predisposición genética a padecer carcinoma papilar tiroideo¹²³. También se han realizado estudios que ponen de manifiesto los efectos del consumo de alcohol sobre la expresión de miARNs. Ureña y colaboradores¹²⁴ demostraron que el alcohol es capaz de desregular el *Cluster* miR183C (miR-96/miR-182/miR-183) y el mir-200, modulando las vías de señalización relacionadas con la neuroinflamación causada por el consumo crónico de alcohol.

1.7. Las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) y su papel en la neuroinflamación causada por el etanol

Las membranas asociadas a mitocondrias (MAM) son unas regiones presentes en el retículo endoplasmático (RE) que se

Introducción

encuentran reversiblemente en contacto con mitocondrias, sobre todo en zonas cercanas a canales sensibles al calcio¹²⁵⁻¹²⁷ (Figura 7). Este orgánulo fue aislado por primera vez en 1990 por Jean Vance¹²⁸ en hígado de rata, al cual denominó fracción X y vio que estaba enriquecido en proteínas y enzimas implicadas en la síntesis y transporte de lípidos. De hecho, el estudio de MAM puede realizarse desde un punto de vista estructural (analizando la proximidad de marcadores mitocondriales y del RE) o desde un punto de vista funcional (midiendo alguna de las actividades enzimáticas propias de este orgánulo). El análisis funcional es mucho más informativo debido a la naturaleza dinámica de MAM. Por ejemplo, el análisis de la síntesis de fosfatidilserina (PtdSer) y su transporte a mitocondria para decarboxilarse a fosfatidiletanolamina (PtdEtn), desde el cual volvería a MAM para metilarse y formar fosfatidilcolina (PtdChol), es una de las funciones clásicamente asociadas a MAM¹²⁹. Desde entonces se han realizado un gran número de estudios con el fin de determinar su composición proteica y lipídica, que es rica en esfingomiélin y colesterol, y se asemeja a de las balsas lipídicas¹²⁵. Se han determinado varias proteínas que son consideradas a día de hoy marcadores proteicos de MAM, como pueden ser la mitofusina, el receptor del inositol tri fosfato o las fosfatidil sintasas 1 y 2^{127,130,131}.

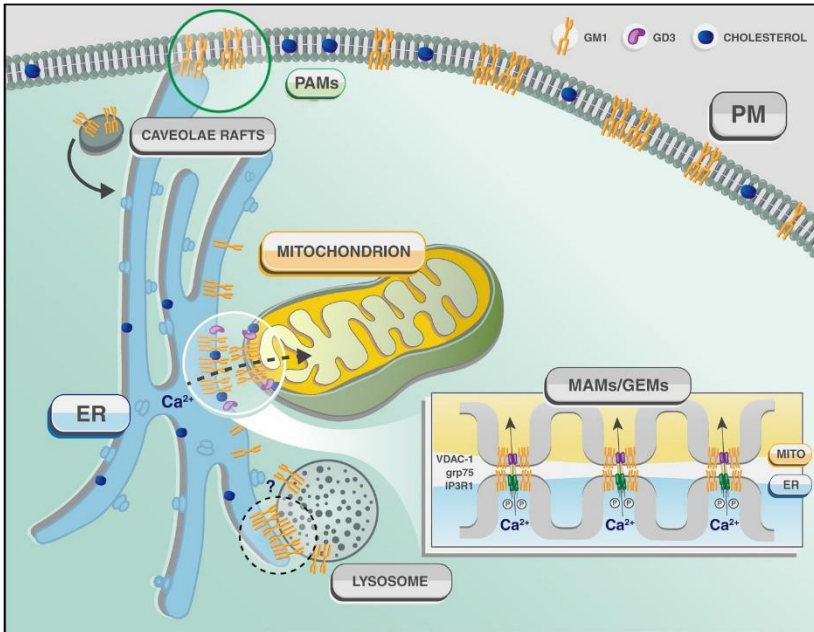


Figura 7: Ilustración de la región de MAM, presente en los sitios de contacto entre RE y mitocondrias. Modificada de Annunziata y colaboradores¹³², con licencia CC BY 4.0.

Debido a estas características, se han descrito diferentes funciones para este orgánulo, como la regulación del metabolismo del calcio, la síntesis y transporte de diferentes especies de lípidos (glicoesfingolípidos y esterificación de colesterol), la participación en procesos de autofagia, apoptosis y remodelación de la estructura celular^{133–135}. Todas estas acciones cumplen un papel importante dentro de la homeostasis celular, y la desregulación de este orgánulo se ha visto ligada en numerosas ocasiones a situaciones patológicas^{136–138}. De

Introducción

hecho, deficiencias energéticas asociadas a disrupciones en MAM y mitocondrias son un componente significativo en la etiología de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson y Esclerosis lateral amiotrófica, entre otras), cardiovasculares, obesidad o diabetes¹³⁹⁻¹⁴². También se ha relacionado en los últimos años con el sistema inmune y la inflamación¹⁴³. Se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno procedentes de mitocondrias dañadas son capaces de actuar como segunda señal para la activación del inflamasoma de NLRP3, y que este utilizaría MAM como plataforma para su ensamblaje, tras ser enviado allí por la proteína de señalización antiviral mitocondrial (en respuesta a virus) o la proteína de interacción con tiorredoxina de unión a NLRP3¹⁴³ (en respuesta a especies reactivas de oxígeno).

2. Objetivos

Objetivos

Puesto que el etanol es capaz de activar la respuesta inmune inflamatoria a través del receptor TLR4 y que las VEs pueden participar en la amplificación de la respuesta inflamatoria, la hipótesis que se propone abordar en este trabajo es *“si el alcohol, a través de la activación del receptor TLR4, es capaz de alterar la composición y liberación de las VEs de las células gliales, y si éstas pueden producir daño neuronal. Además, al liberarse al torrente circulatorio pueden ser utilizadas como posibles biomarcadores de la neuroinflamación causada por el consumo de alcohol durante la adolescencia”*.

Para abordar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Determinar si dosis de etanol, con relevancia fisiológica, (40-50 mM), son capaces de alterar la liberación y el contenido (proteínas y miARNs) de VEs procedentes de cultivos primarios de astrocitos, y si estos cambios son dependientes del receptor TLR4.
- 2) Evaluar si la incubación con VEs procedentes de astrocitos tratados con etanol es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en neuronas control.

- 3) Determinar si el etanol es capaz de promover una mayor liberación de VEs a través de la activación conjunta de MAM y las enzimas esfingomielinasas.
- 4) Analizar en humanos y ratones adolescentes posibles diferencias de género tanto en los perfiles de miARNs presentes en las VEs de plasma como en sus genes diana, diferencias que podrían utilizarse como biomarcadores de la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol.

3. Materiales y métodos

Seguidamente, procedo a detallar la metodología, experimentación y técnicas empleadas durante la realización de este trabajo. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron realizados acorde a las directivas aprobadas por la directiva europea (86/609/ECC) y por el real decreto 1201/2005, junto con la aprobación del comité de ética de experimentación animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

3.1. Muestras humanas

Se obtuvo el suero de 18 pacientes (9 hombres y 9 mujeres) en edad adolescente (18-21 IQR (*Interquartile range*) para las mujeres y 19-22 IQR para los hombres) que fueron a emergencias del Hospital Universitario de Salamanca con síntomas de intoxicación etílica aguda (IEA). Se define IEA según los síntomas clínicos (falta de coordinación motora, marcha inestable, razonamiento alterado, dificultad para el habla, confusión o desorientación), junto con unos niveles de alcohol en sangre (BALs) elevados ($> 1 \text{ g/L}$)⁶⁰. Es importante resaltar, que desconocemos tanto la cantidad de bebidas tomadas como el tiempo transcurrido entre la primera y la última “copa”. Pacientes con otro tipo de patologías, ya fueran crónicas o agudas, o positivos para la toma de

Materiales y métodos

otras sustancias estupefacientes (cocaína y otras), fueron descartados para este estudio.

En el estudio se incluyeron 18 controles sanos (9 hombres y 9 mujeres) (21,2-26,2 IQR años para los hombres y 21,5-25,7 IQR para las mujeres). Dichos controles no consumieron alcohol durante las 72 horas previas a la extracción de sangre y no presentaron episodios de consumo agudo de alcohol en los 3 meses previos al estudio. Estos sujetos mostraron un perfil hematológico y bioquímico normal en sangre y no presentaron ninguna patología previa, ni crónica ni aguda.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario de Salamanca y se obtuvo consentimiento informado de cada participante. Las muestras de sangre se usaron para determinar los BALs, para la extracción de VEs y el análisis de miARNs libres. Las muestras se procesaron y utilizaron en el estudio después de que los participantes aportaran el consentimiento firmado.

3.2. Modelo experimental

Para este trabajo se usaron ratones de la cepa C57/BL6, tanto WT como ratones transgénicos TLR4-KO (cepa C57/BL6 cedida gentilmente por el Dr. S. Akira, Osaka, Japón). Los ratones se

distribuyeron en 3-4 animales por jaula, separados por género y genotipo. Se mantuvieron con agua y comida *ad libitum* y bajo condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12h/12h).

Para el tratamiento agudo con etanol, se administraron a primera hora, dosis de salino (grupo control) o etanol (3 g/kg) al 25% (v/v) en suero salino mediante inyección intraperitoneal a ratones adolescentes (30 día post-natal) en 2 días consecutivos, con 2 días de separación entre las administraciones de dosis (8 dosis totales separadas a lo largo de 16 días). Llegados a este punto, los animales se separaron en dos grupos, ratones para estudios a corto plazo y ratones para estudios a largo plazo. Los de corto plazo fueron sacrificados 24 horas después de la última administración de etanol y, tras ser anestesiados con pentobarbital sódico, se recogió un volumen de sangre y se diseccionaron tejido cerebral y hepático. Los ratones para estudios a largo plazo se mantuvieron 14 días más sin ninguna administración extra de etanol (período de abstinencia), tiempo tras el cual se procedió igual que con los ratones a corto plazo. Se obtuvo el plasma sanguíneo mediante centrifugación de la sangre extraída. El plasma y el resto de tejidos se congelaron y mantuvieron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.3. Cultivos celulares

3.3.1. Cultivo primario de astrocitos

Para los estudios *in vitro*, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de tipo-I procedentes de ratones WT y TLR4-KO. Para este procedimiento se utilizaron las cortezas cerebrales de ratones recién nacidos (6-8 ratones por cultivo). Se separaron las cortezas en condiciones estériles y se disgregaron con pipeta de vidrio en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Capricorn Scientific*). Tras la disgregación, las células se agitaron a máxima velocidad en un vórtex durante 1 minuto, para eliminar las células neuronales y se pasaron por una malla de 80 μm estéril. Estas células se cultivaron a una confluencia de 850 células/ mm^2 en medio DMEM suplementado al 20% con suero bovino fetal (SBF, *Biowest*), 1% de penicilina/streptomina (100 U/ml) (*Biowest*), 1% de fungizona (2,5 $\mu\text{g/ml}$) (*Merck*), 1% de glutamina (2 mM) (*Gibco*) y 1% de glucosa (1 g/L) (*Merck*). El medio de cultivo se cambió cada 4 días, y a día 7 de cultivo, el SBF se redujo al 10% de concentración y se quitó el suplemento de glucosa. A día 14 de cultivo, los cultivos celulares tenían una confluencia del 90-95% y el SBF se reemplazó por albúmina de suero bovino (BSA, 1 mg/ml) (*Gibco*) 24 horas previo a la administración de etanol (50 mM) (*Sigma-Aldrich*) al cultivo.

La pureza de los cultivos se comprobó mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos contra las proteínas GFAP o proteína ácida fibrilar de la glía (marcadora de células astrogliales), CD11b (marcador de microglía), MAP-2 o proteína asociada a microtúbulos 2 (marcador neuronal) y MBP o proteína básica de mielina (marcador de oligodendroglía). El 96% de las células resultaron positivas para GFAP.

3.3.2. Cultivo primario de neuronas

Para el cultivo primario de neuronas, se utilizaron ratones WT y transgénicos con la proteína roja fluorescente (RFP) conjugada a la actina (ACTB-DsRed), en día 16 de gestación. Se extrajeron dichos embriones de la hembra gestante y se separaron en placas. Las cortezas se extrajeron en condiciones de esterilidad y se disgregaron mecánicamente con la ayuda de una pipeta de vidrio en medio HBSS sin Ca^{+2} ni Mg^{+2} (1 ml/cerebro) (*Sigma-Aldrich*) suplementado con piruvato sódico y HEPES 10 mM (*PAA Laboratories*). Luego se añadieron 2 ml/cerebro del mismo medio HBSS suplementado con Ca^{+2} y Mg^{+2} (*Hyclone*), se dejaron sedimentar y se filtraron en malla de nylon para limpiar impurezas. Las neuronas se cultivaron en medio Neurobasal (*Gibco*) suplementado con glutamato 25 μM , GlutaMAX (*Thermofosher Scientific*) (1:100), B-27R (*Thermofosher Scientific*)

Materiales y métodos

(1:50) y 50 µg/ml de penicilina, estreptomina, en una proporción de 10 ml/cerebro. Para la siembra de las neuronas, se recubrieron las placas de cultivo con poly-D-lisina (12,5 µg/ml) (*Millipore*) como sustrato de adhesión. Los cultivos primarios de neuronas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (37°C), CO₂ (5%) y esterilidad durante 3-4 días hasta su tratamiento.

3.3.3. Línea celular microglial BV2 y tratamientos

La línea celular comercial BV2 se adquirió de *Innoprot S.L* y procede de células microgliales de cerebro de ratón transformadas mediante retrovirus. Las células se descongelaron en baño (37°C) durante pocos minutos y luego se les añadió medio DMEM suplementado con 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomina (100 U/ml), 1% de fungizona (2,5 µg/ml). Las células se sembraron en el mismo medio y se dejaron proliferar hasta lo requerido para cada experimento. Los tratamientos y análisis se realizaron siempre entre pase 3 y pase 10. A las 24 horas previas al tratamiento con etanol (50 mM) se cambió el medio de cultivo a medio libre de SBF con BSA (1%).

En un período de 2 horas previas al tratamiento con etanol, se trataron las células con los inhibidores de esfingomielinasas GW4869^{104,144} (*Sigma-Aldrich*), Desipramina¹⁴⁵ (*Sigma-Aldrich*) en

unas concentraciones de 10 μM , 5 μM , respectivamente. También se utilizó la Ciclosporina A (*Sigma-Aldrich*), como inhibidor de actividad de MAM¹⁴⁶, en una concentración de 2 μM .

Para la cuantificación de las especies de fosfolípidos por cromatografía en capa fina (TLC), más detallada en el punto 3.16, se trataron las células con Serina radioactiva (³H-Serina) (*Perkin-Elmer*), con el fin de ser capaces de localizar el destino metabólico de los diferentes fosfolípidos. Para ello, se les cambió el medio a las células por un medio mínimo esencial (MEM) (*Sigma-Aldrich*) que carece de dicho aminoácido. Tras 2 horas con este medio, se añadieron 2,5 μCi /pocillo de ³H-Serina durante 2-4 horas, período tras el cual las células se recogieron y se congelaron a -20°C hasta la extracción de sus lípidos.

3.4. Aislamiento de VEs

Se utilizaron diferentes protocolos para la purificación y obtención de VEs, dependiendo del tipo de muestra utilizada y del experimento llevado a cabo. Para la realización de este trabajo, se utilizaron dos protocolos de aislamiento de VEs diferentes, uno basado en ultracentrifugación diferencial y otro basado en un kit comercial.

3.4.1. Aislamiento de VEs por ultracentrifugación diferencial

Para la obtención de VEs del sobrenadante de cultivos primarios celulares (astrocitos y BV2), se extrajo dicho sobrenadante 24 horas después del estímulo con etanol y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se desechó el pellet y se obtuvo el sobrenadante, que fue centrifugado una vez más a 2000 x g durante 20 minutos. Se descartó el pellet y el sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga, donde se volvieron a centrifugar las muestras a 10.000 x g durante media hora. Se recuperó el sobrenadante, que se centrifugó en ultracentrífuga a una velocidad de 100.000 x g durante 1 hora. Pasado este tiempo, se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet, que se resuspendió en tampón fosfato salino (PBS) y se volvió a centrifugar con los mismos datos de velocidad y tiempo (100.000 x g, 1 hora). Una vez finalizada la última ultracentrifugación, se resuspendió el pellet final, que corresponde a una fracción enriquecida en VEs, con PBS suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ortavanadato sódico (NaVO₃) al 10% y diotiotreititol (DTT) al 1%) (*Sigma-Aldrich*).

3.4.2. Aislamiento de VEs por kit comercial

Debido a la limitada cantidad de volumen de plasma, se prefirió utilizar para el aislamiento de VEs circulantes un kit comercial específicamente diseñado para ello. Se utilizó el *Total exosome isolation kit* de *Invitrogen*, que consiste en una co-purificación con una digestión proteica previa con proteínasa K. Esta digestión se llevó a cabo para la limpieza de grandes acúmulos proteicos presentes en el plasma sanguíneo que pudiesen interferir en el resultado de los experimentos. Para el aislamiento de las VEs se siguieron las pautas del fabricante.

3.5. Western Blot

El análisis del contenido proteico de las diferentes muestras estudiadas se realizó mediante la técnica de *Western Blot*. Previamente, se cuantificó la concentración proteica de cada muestra biológica mediante BCA (*Pierce BCA Protein Assay kit, Thermofisher Scientific*) con la finalidad de cargar la misma cantidad de proteína de cada una de las muestras.

Se utilizaron geles con diferente porcentaje de acrilamida (entre 10 y 15%) según el peso molecular de las proteínas estudiadas. Se

Materiales y métodos

cargaron concentraciones conocidas e iguales de proteínas en cada pocillo, previamente desnaturalizadas con tampón de carga 6x (100 g/L SDS, 200 mg/L azul bromofenol, 350 mM Tris pH 6,8, 30% glicerol y 30% β -mercaptoetanol) durante 5 minutos a 100°C. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un sistema *Mini Protean* de *Bio-Rad* en tampón de Tris (6 g/L), glicina (2,88 g/l) y SDS (20 g/L).

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas en el gel SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (*Immobilon Transfer Membrane, Millipore*) en tampón de Tris (1,44 g/L de glicina, 20% de metanol) durante 1 hora a 100 V (para proteínas de bajo peso molecular) o bien durante toda la noche a 30 V (para proteínas de alto peso molecular) a una temperatura de 4°C. Tras la transferencia, se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 1) durante toda la noche, a 4°C.

Estas membranas se lavaron entre 3-4 veces con tampón TBS-T al 0,1%, y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (anti-ratón, 1:5000, *Santa Cruz Biotechnology*; anti-conejo, 1:20000, *Santa Cruz Biotechnology*) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron con tampón TBS-T al 0.1% 3-4 veces y luego se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL plus (*Pierce*

ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermofisher Scientific) con películas de *Amersham (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare)*.

La cuantificación de las bandas correspondientes a la expresión de cada una de las proteínas se realizó mediante el software de análisis de imagen *Image J*. La intensidad relativa de cada proteína se cuantificó en relación a la intensidad de la banda de la proteína GAPDH o CD63 (VEs), según el tipo de muestra biológica.

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios utilizados:

Anticuerpo	Hospedador	Dilución	Compañía
Calnexina	Ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
Caspasa-1	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
CD9	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
CD63	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
CD81	Ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
COX-2	Ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
GAPDH	Ratón	1/3000	Millipore

Materiales y métodos

IL-1R	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
NLRP3	Ratón	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
p65-NF- κ B	Conejo	1/500	Santa Cruz Biotechnonology
TLR4	Ratón	1/500	eBioscience

3.6. Aislamiento de ARN de tejido, células y VEs

La obtención de ARN de las diferentes muestras biológicas, se realizó adaptando los protocolos para obtener, en cada caso, los mejores valores respecto a la cantidad y calidad del ARN.

3.6.1. Obtención de ARN de tejido y células

La extracción de ARN a partir de tejidos (corteza cerebral e hígado) o cultivos celulares (astroglía, microglía y neuronas) se inició con la adición de un volumen de Trizol (*Sigma-Aldrich*) y una digestión mecánica, ya fuera con pipeteo intenso (cultivos celulares) o con un sonicador (tejido cerebral e hígado). Posteriormente se siguió el protocolo descrito por Chomczynsky y Sacchi¹⁴⁷ en 1987, basado en inhibición de enzimas ribonucleasas por fenol, lisis por tiocianato de

guanidinio, tiocianato de aminio con glicerol y cloroformo para la generación de las distintas fases de ácidos nucleicos y proteínas. El ARN se precipitó con isopropanol, se limpió con etanol al 70% y se resuspendió con agua libre de endoribonucleasas para su posterior control de calidad mediante *Nanodrop*.

3.6.2. Obtención de ARN de VEs

Para la extracción de ARN de VEs (independientemente de su origen biológico), se utilizó un kit comercial (*Total Exosome RNA and Protein Isolation kit, Invitrogen*) basado en el mismo proceso explicado anteriormente. El ARN de VEs se separó mediante una mezcla de fenol cloroformo ácido, se lavó con etanol sucesivamente en filtros de columna y, por último, se eluyó el ARN con agua libre de ribonucleasas a 95°C.

3.7. Control de calidad del ARN

La calidad del ARN obtenido se midió de dos formas diferentes: mediante *Nanodrop*, utilizando las absorbancias 260/230 nm y 260/280 nm, indicadores de contaminación por sustancias químicas y contaminación proteica, respectivamente; y mediante el uso del bioanalizador 2100 de *Agilent*. Para este último, se utilizaron chips

Materiales y métodos

de *smallRNA* para medir la calidad de ARN de secuencia corta como son los miARNs, y *chis RNA Nano6000* para analizar el ARN total. Con ello se pudo calcular el RIN (valor de calidad del ARN) de cada muestra y, todas aquellas con un valor inferior de 7,5 se excluyeron de los estudios.

3.8. Estudio de la expresión génica

3.8.1. Retrotranscripción de ARN y PCR

Todas las muestras se trataron con *DnaseI* de *Invitrogen* con el fin de eliminar posibles trazas de ADN genómico. Para la retrotranscripción de ARN total, se utilizó el kit comercial *NZY First Strand cDNA Synthesis Flexible Pack* (*Nzytech*). Este kit utiliza 1 μ l de *dNTPs* (0,5 mM), 1 μ l de *Random hexamer mix* (50 ng/ μ l), 1 μ l de transcriptasa (200 U/ μ l) y 1 μ l de *RNAse inhibitor* (40 U/ μ l) en un volumen final de 20 μ l. La muestra de ARN fue de 5 μ l (200 ng/ μ l). La mezcla se incubó a 50°C durante 40 minutos, posteriormente se inactivó la reacción a 98°C durante 5 minutos. En este momento se añadió 1 μ l por muestra de *NZY RNAse H* y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Este proceso sirvió para eliminar restos de ARN unidos al ADNc, permitiendo una mayor sensibilidad en la PCR.

3.8.2. Retrotranscripción de miARNs y PCR

La retrotranscripción de los miARNs se llevó a cabo utilizando el *Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific)*. Este kit se basa en 4 procesos o fases diferentes con varios elementos, enzimas y tiempos de incubación. Primero, se añadió ATP y enzima polimerasa para la adhesión de una cola de polyA al ARN. Para ello se incubaron las muestras con la mezcla de reacción a 37°C durante 45 minutos y luego a 65°C durante 10 minutos para parar la reacción de la polimerasa. Posteriormente, se ligó un adaptador a la cola de polyA. Para ello se incubaron las muestras con Polietilenglicol 8000 al 50%, los adaptadores 25x y la ARN ligasa durante 60 minutos a 16°C. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción con *dNTPs* 25 mM, 20x *Universal RT primer*, 10X *RT enzyme mix*, durante 15 minutos a 42°C, parándose durante 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima. Para finalizar, se procedió a la amplificación de los miARNs, utilizando una mezcla de cebadores 20x para miARNs y un mix 2x de enzima. Esta última fase empezó con un calentamiento de la muestra durante 5 minutos a 95°C para activar la enzima, seguida de 15 ciclos de 3 segundos a 95°C (desnaturalización) y 30 segundos a 60°C (extensión). La reacción se

Materiales y métodos

paró a 99°C durante 10 minutos. El ADNc obtenido se almacenó a una temperatura de -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

3.8.3. Análisis de la expresión génica por RT-qPCR, ARN y miARN

Con el fin de obtener un resultado semicuantitativo de la expresión tanto de genes como de miARNs recurrimos a la técnica de RT-qPCR, que se basa en la cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm o miARNs respecto a un gen o miARN de referencia. Para el estudio de expresión génica se utilizó la ciclofilina y para el estudio de expresión de miARN el mir-451a y el RNAU6.

Para la RT-qPCR de genes se utilizó el kit *FastStart Universal SYBR Green Master* de *Applied Biosystems*; se usó 1 µl de muestra de ADNc, 5 µl de la master mix 2x, 200pM de cada cebador, ya sea en directo o en reverso, y agua libre de ribonucleasas. El listado de cebadores utilizados para este proceso se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Listado de cebadores utilizados para las RT-qPCR.

Nombre	Número de acceso	de Secuencia
Camk2a	NM001286809	F: ATTTCCCATCACCAGAATGG R: ATGGCTCCCTTCAGTTTCCT

Ciclofilina A	NM008907	F: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC R: GATGCCAGGACCTGTATGCT
Foxo3	NM001376967	F: ACAAACGGCTCACTTTGTCC R: CCGTGCCTTCATTCTGAAC
IL-1 β	NM008361	F: ACAGAATATCAACCAACAAG R: GATTCTTTCTTTGAGGCCCA
Mapk14	NM001168508	F: GACCGTTTCAGTCCATCATTC R: AACACATCCAACAGACCAAT
Traf6	NM001303273	F: AACGTCCTTTCCAGAAGTGC R: GAATGTGCAAGGGATTGGAG
Stat3	NM011486	F: TGTTGGAGCAGCATCTTCAG R: GCATGTCTCCTTGGCTCTTG

Para el estudio de la expresión de miARNs, se utilizó el kit *Taqman Advanced miRNA Assays* de *ThermoFisher*. El ADNc obtenido tras la reacción de retrotranscripción detallada anteriormente se incubó con el *TaqMan Fast Advanced Master mix 2x* y los cebadores correspondientes a cada miARN 20x, listados en la Tabla 3.

Materiales y métodos

Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 o 384 pocillos, cargando cada muestra por triplicado, y se captaron utilizando un *LightCycler480* de *Roche*. Para el análisis de los resultados obtenidos mediante estos procedimientos, se utilizó el software *LightCycler 480 SW 1.5*. Se analizó la curva de la temperatura de *melting* para estar seguros de la eficiencia de los cebadores y a la presencia de un único *amplicón*. Para el análisis de expresión génica y de miARNs, los triplicados con una diferencia superior entre ellos de 0,5 ciclos fueron descartados. Para calcular la cuantificación relativa respecto al gen de referencia se utilizó la fórmula *E-Method*¹⁴⁸, en la que se tiene en cuenta, además del ciclo al que se detecta la fluorescencia, la eficiencia de los cebadores utilizados.

Tabla 3: Listado de cebadores de miARNs usados para RT-qPCR.

Nombre	Número de acceso	de Secuencia del cebador (5'-3')
mir-21-5p	MIMAT0000530	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
mir-146a-5p	MIMAT0000158	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
mir-182-5p	MIMAT0000211	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACG
mir-183-5p	MIMAT0000212	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
mir-200b-5p	MIMAT0004545	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA
mir-451a	MIMAT0001632	AAACCGUUACCAUACUGAGUU
RNAU6	NR_004394	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTA AAATTGGAACGATACAGAGAAGATTA GCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACAC GCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTT

3.9. Cuantificación de VEs mediante citometría de flujo

Las VEs recién obtenidas se diluyeron en tampón PBS filtrado utilizando un filtro de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro. Para la detección por citometría de flujo, se tiñeron los VEs con un fluoróforo liposoluble capaz de traspasar su membrana y adherirse al ARN (*SYTO RNA Select Green, Invitrogen*), en oscuridad y en condiciones estériles.

Materiales y métodos

Una vez añadido el marcador, las muestras fueron agitadas mediante vórtex e incubadas 30 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, las muestras se cargaron en el citómetro de flujo *CytoFlex S (Beckman and Coulter)* y se visualizó la fluorescencia mediante el software *CytExpert*. El sistema se lavó con agua y detergente entre la carga de cada muestra para eliminar posibles residuos entre muestras. El citómetro se puso a punto para la detección de VEs utilizando las perlas *Megamix-Plus FSC (BioCytex)*, una mezcla de perlas fluorescentes de los siguientes tamaños: 100 nm, 300 nm, 500 nm y 900 nm (Figura 8). Se analizó la fluorescencia de las perlas utilizando el láser de 488 nm y el filtro de emisión de 525 nm. Para una mejor detección de pequeñas partículas, se utilizaron los láseres de dispersión frontal y lateral a 488 nm y el láser violeta de dispersión lateral a 405 nm. Las perlas fluorescentes se visualizaron mediante el ajuste de la ganancia de fluorescencia y los detectores laterales.

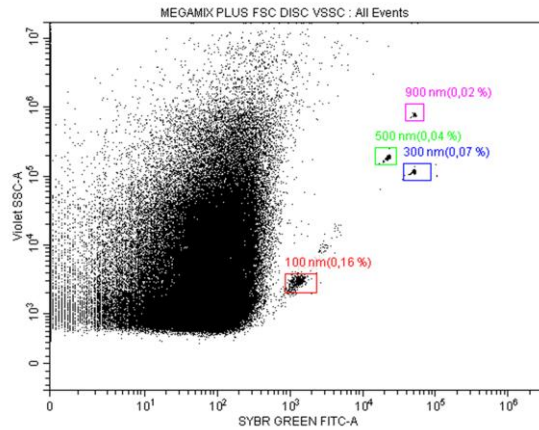


Figura 8: Perfil de tamaños de la mezcla de cuentas fluorescentes utilizada para la detección de VEs por citometría de flujo.

3.10. Detección de VEs mediante Microscopia Electrónica de Transmisión

Las VEs se prepararon para su observación en el microscopio electrónico de transmisión (MET) mediante el siguiente protocolo: se fijaron las VEs con paraformaldehído al 2% y se depositaron 5 μ l sobre rejillas recubiertas de formvar/carbón para MET. Las muestras se dejaron secar al aire durante 20 minutos. En una hoja de *parafilm*, se lavaron las rejillas con PBS, glutaraldehído y agua destilada. Este proceso de lavado con agua se repitió hasta 8 veces, tras el cual se transfirieron las rejillas a una solución de uranil-oxalato (pH 7) durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se transfirieron nuevamente las rejillas

Materiales y métodos

a una solución de metilcelulosa con acetato de uranilo durante 10 minutos a 4°C. Se cogieron las rejillas cuidadosamente con unas pinzas, se eliminó el fluido excesivo por decantación y se dejaron secar al aire durante 5-10 minutos para su posterior observación. Las preparaciones fueron examinadas en un microscopio *FEI Tecnai G2 Spirit (FEI Europe)*, utilizando una cámara digital *Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH)*.

3.11. Estudio de internalización de VEs por neuronas mediante microscopía confocal

Para este estudio se utilizaron cultivos primarios de neuronas (con una pureza del 95%) procedentes de cortezas cerebrales de ratones WT y transgénicos (ACTB-DsRed) de 16 días de edad. Los ratones transgénicos ACTB-DsRed se caracterizan por mostrar fluorescencia roja en sus células debido a la presencia de RFP combinada con la actina. Dichos cultivos se sembraron en pocillos recubiertos con poli-D-Lisina y se mantuvieron con medio Neurobasal suplementado con B-27, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y CO₂ durante 3-4 días. También se utilizaron cultivos primarios de astrocitos (con una pureza de 95%) derivados de ratones WT y TLR4-KO recién nacidos, de los que se obtuvieron las VEs liberadas al medio de cultivo.

Estos cultivos se sembraron en 3 placas Petri de 150 de diámetro por condición (control y tratados con etanol 50 mM, 24 horas), se crecieron durante 14 días y se les añadió el tratamiento 24 horas previo al aislamiento de sus VEs.

Con estos cultivos se realizaron los estudios de internalización. Para ello, se aislaron las VEs de las células astrogiales, siguiendo el protocolo por ultracentrifugación previamente descrito y bajo condiciones de esterilidad. Una vez obtenidas las VEs, se marcaron con fluorescencia, utilizando para ello diferentes fluoróforos. Para las neuronas WT, se incubaron las VEs marcadas con *BODIPY* (fluorescencia roja). Para las neuronas ACTB-DsRed (que tienen fluorescencia roja), se marcaron las VEs con *SYTO Green* (fluorescencia verde).

Las neuronas se cultivaron sobre cristales estériles de 12 mm de diámetro y a día 3 de cultivo se les añadieron 10 μ l de VEs marcadas con su fluoróforo correspondiente (*BODIPY* para neuronas WT y *SYTO Green* para neuronas ACTB-DsRed), y se dejaron toda la noche incubando. Transcurridas 24 horas, las neuronas WT se marcaron con un fluoróforo verde (*Cell Tracker Green, Invitrogen*) durante 30 minutos. Tanto las neuronas WT como las ACTB-DsRed se fijaron con paraformaldehído al 3,7% en PBS (con Ca^{+2} y Mg^{+2}) durante 20

Materiales y métodos

minutos, y luego se permeabilizaron con NP-40 al 0,1% durante 5 minutos. Los núcleos de las neuronas se marcaron con Hoechst 33342 (0,5 µg/mL) (*Molecular Probes*). Los cristales se montaron en medio de montaje FA (*Difco*). La fluorescencia de cada célula se analizó utilizando un microscopio confocal *Leica* (modelo *TCS-SP8-AOBS*) y la cuantificación de ésta se realizó utilizando el software *LAS AF Lite* (*Leica Confocal Software*), expresando los resultados como intensidad de fluorescencia por célula (unidades arbitrarias). Para corroborar que las VEs estaban internalizadas en las neuronas, se utilizó la proyección Z del microscopio confocal, que es una técnica de procesado de imagen que, a partir de un conjunto de fotografías, es capaz de generar una imagen compuesta con una mayor profundidad de campo, donde se pueden observar VEs fluorescentes en el interior celular, y no adheridas a la membrana exterior. A partir de las imágenes también se realizaron análisis de núcleos apoptóticos marcados con Hoechst 33342, medida de viabilidad celular.

3.12. Cuantificación de VEs mediante *Nanosight*

NanoSight NS300 Malvern (NanoSight Ltd) es una herramienta que nos permite medir el rango de tamaños y la concentración de VEs.

Las partículas se rastrearon automáticamente y se determinó su tamaño mediante su movimiento Browniano y su coeficiente de difusión. Tras el aislamiento y obtención de VEs, éstas se resuspendieron en 0,8 ml de tampón PBS filtrado utilizando un filtro de jeringa de 0,22 μm de tamaño. Las condiciones de las medidas de las VEs en el sistema fueron las siguientes: temperatura = $25\pm 0,5^\circ\text{C}$, viscosidad = $0,99\pm 0,01$ cP, cuadros por segundo = 25, tiempo de medida = 30 segundos. El umbral de medida fue similar en todas las muestras.

3.13. Estudio bioinformático de miARNs

El análisis de enriquecimiento funcional de los miARNs se realizó utilizando diferentes herramientas web. Se utilizó DIANA mirPathv2.0(<http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php>), una herramienta bioinformática que permite el análisis de diferentes miARNs con el fin de identificar las rutas *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of the Genes and Genomes*) mayormente afectadas por la acción conjunta de los miARNs analizados. También se utilizó la web *mirnet.ca* (<https://www.mirnet.ca/>), esta plataforma relaciona las dianas más probablemente afectadas por lo miARNs en estudio. La base de datos de la plataforma asocia los resultados obtenidos a partir

Materiales y métodos

de diferentes aproximaciones metodológicas como *microarrays*, *RNAseq* o RT-qPCR, de tal forma que permite identificar aquellos genes con más probabilidades de ser regulados por los miARNs de interés. Por último, se utilizó la herramienta *STRING* (<http://www.string-db.org>) que permite obtener interacciones entre las diferentes dianas obtenidas por las plataformas bioinformáticas anteriores creando redes de interacción proteína-proteína.

3.14. Extracción de lípidos para ensayos de transferencia de fosfolípidos

Las muestras se incubaron con 150 μ l de agua, 500 μ l de cloroformo y 250 μ l de metanol (relación 2:1). Esta mezcla se agitó vigorosamente mediante vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 8.000 x g durante 5 minutos. El resultado obtenido fueron dos fases claramente separadas, de las cuales se obtuvieron 300 μ l de la fase inferior (correspondiente a la del cloroformo) donde se encontraban los lípidos. Posteriormente estas muestras se secaron mediante la aplicación de nitrógeno gas sobre los tubos, quedándose los lípidos adheridos a las paredes de éste. Estas muestras se congelaron a -80°C hasta su uso.

3.15. Aislamiento y purificación de MAM

El protocolo para el aislamiento y obtención de MAM, tanto de células como de corteza cerebral, consistió en una serie de pasos de ultracentrifugación diferencial. Las muestras se homogenizaron mecánicamente en presencia de un tampón compuesto por Manitol (225 mM) (*Sigma-Aldrich*), HEPES (25 mM) (*Invitrogen*) y EGTA (1mM ph 7,4) (*Sigma-Aldrich*) para la conservación de membranas, estructuras lipídicas y de inhibidores de proteasas. El homogenado resultante se centrifugó (3.000 x g, 10 min) para separar restos celulares como núcleos y debris del sobrenadante (S1). Este sobrenadante se centrifugó (8.000 x g, 15 min) para separar la fracción mitocondrial, presente en el pellet (P2) y la fracción de RE, en el sobrenadante (S2). El P2 se incorporó en un gradiente de Percoll (*Santa Cruz Biotechnology*) al 30% y se obtuvieron 2 bandas, una correspondiente a MAM y otra a mitocondrias. Ambas bandas fueron recuperadas, diluidas en PBS y centrifugadas (95.000 x g, 30 min) nuevamente para obtener una mayor pureza.

3.16. Análisis de actividad de MAM por cromatografía en capa fina

Para medir la actividad de MAM, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) que permite cuantificar la radioactividad presente en las diferentes especies de fosfolípidos de interés (PtdSer, PtdEtn y PtdChol). Para ello, se utilizaron células BV2 que fueron tratadas con etanol y ^3H -Serina y, posteriormente, se extrajeron sus lípidos como se describió en el punto 3.14. Luego, se utilizaron unas cámaras de cristal previamente lavadas con metanol y acetona, como soporte para llevar a cabo la cromatografía.

Se prepararon las dos fases móviles necesarias para el proceso en dos cámaras de cristal diferentes. Para la fase móvil 1, se añadieron 84 ml de éter de petróleo, 16 ml de dietiléter y 1 ml de ácido acético. Para la fase móvil 2, se añadieron 60 ml de cloroformo, 50 ml de metanol, 5 ml de agua y 1 ml de ácido acético. Como estructura para la cromatografía se utilizaron láminas de plástico recubiertas de gel de sílice. Las muestras de lípidos adheridos al tubo se resuspendieron en cloroformo y se fueron añadiendo gota a gota sobre las placas de sílice, dejando evaporar el cloroformo antes de añadir el resto. Se añadieron estándares de los fosfolípidos previamente marcados con el fin de tener una referencia. Tras cargar todas las muestras, las placas de sílice se

pusieron dentro de la cámara de cristal con la fase móvil 1, el tiempo necesario para que esta corriera hasta cerca del límite superior de la placa, momento en el cual se sacó de la cámara, se dejó secar al aire y se introdujo dentro de la cámara con la fase móvil 2. Se repitió el proceso y finalmente se introdujo dentro de una tercera cámara en presencia de cristales de yodo, elemento necesario para revelar los lípidos presentes, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se recortaron las marcas correspondientes a cada fosfolípido de cada muestra, se introdujeron en tubos con cóctel de titulación y se cuantificó su radioactividad en un detector de centelleo. La representación gráfica del proceso se muestra en la Figura 9.

Material es y métodos

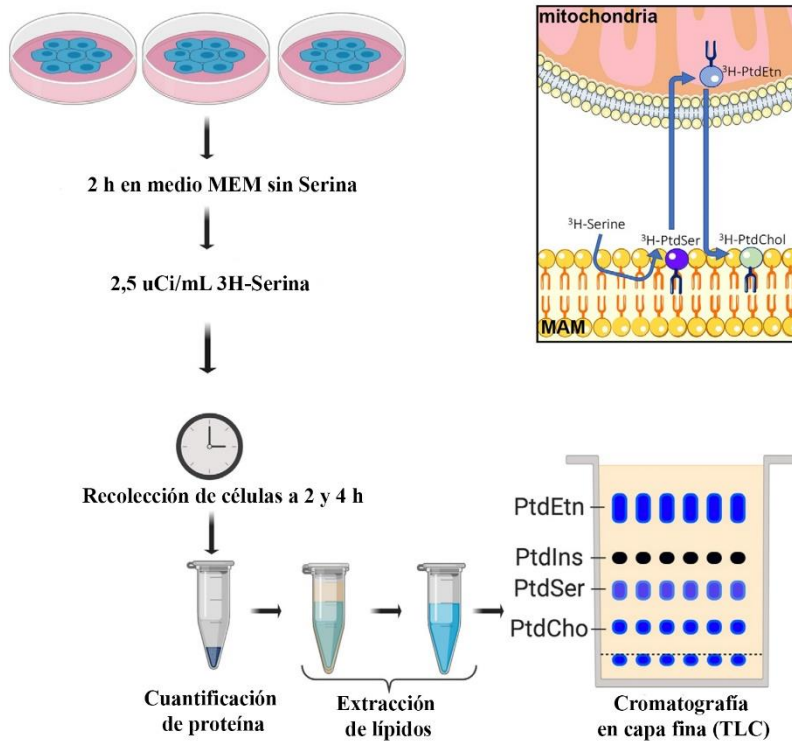


Figura 9: Representación gráfica del protocolo de análisis de síntesis de fosfolípidos en la región de MAM.

4. Resultados

Resultados

4.1. Efecto del etanol en la secreción de VEs en astrocitos y el rol del TLR4 en el proceso

El estudio de los efectos del etanol sobre la secreción de VEs en células astrogliales, se llevó a cabo en cultivos primarios de astrocitos procedentes de la corteza cerebral de ratones recién nacidos, WT y TLR4-KO. Los cultivos se trataron con etanol (50 mM/24 h) una vez que se encontraron confluentes en el día 14 de cultivo. Tras dicho tratamiento, se aislaron las VEs presentes en el medio de cultivo mediante ultracentrifugación diferencial. Utilizando MET, observamos que las partículas obtenidas en todos los grupos tenían las características típicas de tamaño (30-150 nm) y morfología de VEs⁷⁹ (Figura 10).

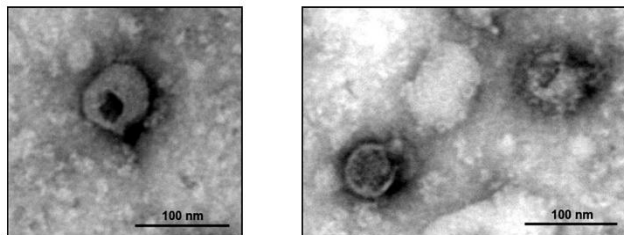
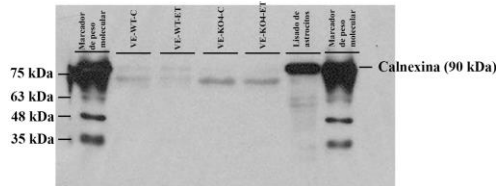


Figura 10: Imágenes de MET de VEs procedentes de medio de cultivo de astrocitos de ratón. Barra de escala: 100 nm.

Las VEs se encuentran enriquecidas en unas proteínas llamadas tetraspaninas, que pueden ser utilizadas como marcadores de proteicos de éstas. De este modo, analizamos la presencia de estas proteínas en las muestras mediante *Western Blot*. Obtuvimos una mayor expresión de las tetraspaninas en muestras de VEs procedentes de astrocitos WT que habían sido tratados con etanol (VE-WT-ET) con respecto a las muestras control (VE-WT-C) (Figura 11B), mientras que no observamos cambios en la expresión de estas proteínas en la VEs procedentes de células TLR4-KO tratadas o no con etanol (VE-KO4-ET y VE-KO4-C, respectivamente) (Figura 11B). Además, también se utilizó la proteína Calnexina, marcador de RE, como marcador negativo de VEs, para descartar la posible contaminación de componentes celulares en las muestras de VEs (Figura 11A).

Resultados

A)



B)

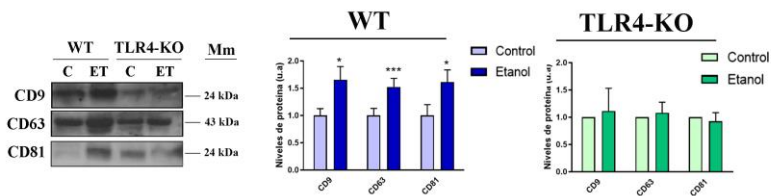


Figura 11: Una dosis fisiológica de etanol (50 mM) es capaz de aumentar la secreción de VEs en cultivos primarios de astrocitos WT, pero no en TLR4-KO (I). A) Inmunoblot del marcador negativo de VEs Calnexina con muestras de VEs aisladas de cultivos primarios de astrocitos, junto con un control positivo de lisado de células astrogliales. B) Detección por Western Blot de los marcadores positivos exosomales CD63, CD9 y CD81. Se muestra un inmunoblot por proteína para cada una de las condiciones de estudio. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, para una n biológica de 6. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y una corrección post-hoc mediante el test de Bonferroni.

A continuación, se analizó el tamaño y la concentración de VEs secretadas en el medio de cultivo de las células astrogliales mediante *Nanosight*. Se observó una fracción mayoritaria de partículas

que se encontraba en el rango de 100-200 nm, que corresponde al rango de tamaño de las VEs. Además, las células WT tratadas con etanol presentaron una mayor secreción de VEs que las células control, mientras que no hubo cambios en la secreción de VEs entre las células TLR4-KO tratadas o no con etanol (Figura 12).

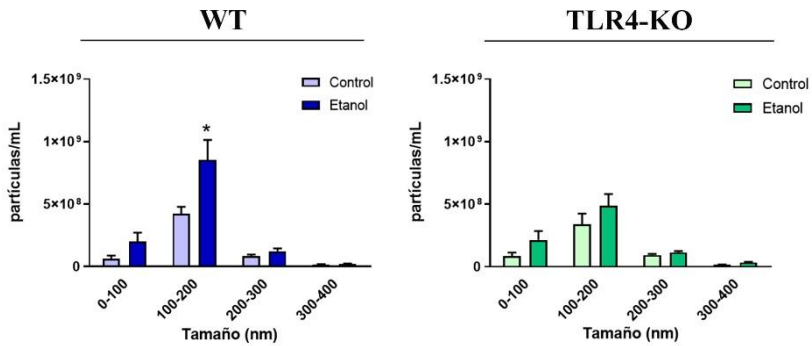


Figura 12: Una dosis fisiológica de etanol (50 mM) es capaz de aumentar la secreción de VEs en cultivos primarios de astrocitos WT, pero no en TLR4-KO (II). Cuantificación de la cantidad y el tamaño relativo de VEs secretadas por astrocitos WT y TLR4-KO tras un tratamiento con etanol, mediante Nanosight. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, para una n biológica de 6. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y una corrección post-hoc mediante el test de Bonferroni.

Resultados

Con el fin de dar una mayor robustez a los resultados obtenidos mediante *Nanosight* y *Western Blot*, se cuantificaron las VEs mediante citometría de flujo. Para ello marcamos el ARN presente dentro de las VEs con un fluoróforo de unión a dominios de ARN que emite fluorescencia verde (*SYTO Green*) (Figura 13).

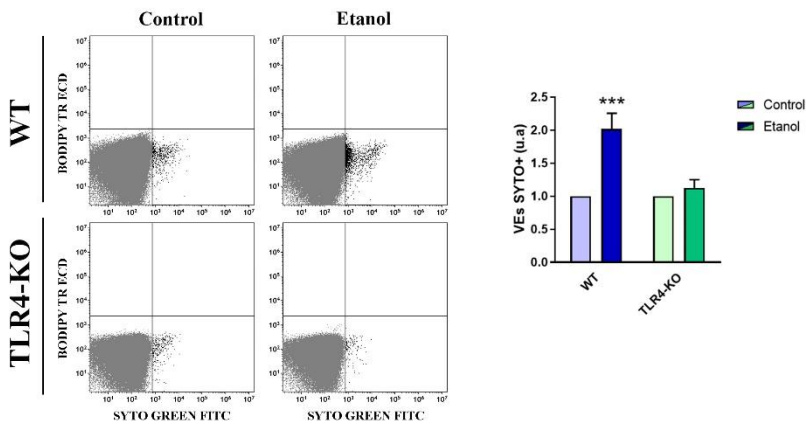


Figura 13: Una dosis fisiológica de etanol (50 mM) es capaz de aumentar la secreción de VEs en cultivos primarios de astrocitos WT, pero no en TLR4-KO (III). Cuantificación de las VEs marcadas con SYTO Green mediante citometría de flujo. Los eventos positivos para SYTO Green se muestran en color negro. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, para una n biológica de 6. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y una corrección post-hoc mediante el test de Bonferroni.

De nuevo se observó, que el etanol aumenta la secreción de VEs en astrocitos de ratones WT, en comparación con los no tratados, mientras que las muestras de VE-KO4-C y VE-KO4-ET no presentaron cambios entre sus grupos.

4.2. Papel del receptor TLR4 en las alteraciones inducidas por el etanol en el contenido proteico de las VEs de astrocitos.

Estudios previos han demostrado que el etanol es capaz de activar una respuesta inflamatoria mediante la activación de la ruta de señalización del TLR4 y del inflamasoma de NLRP3 en células astrogiales^{33,53,149}. Por tanto, quisimos evaluar si el tratamiento con etanol era capaz de alterar el contenido en proteínas inflamatorias de las VEs procedentes de astrocitos WT y TLR4-KO. Mediante *Western Blot* analizamos diferentes proteínas involucradas en la respuesta inmune inflamatoria, como TLR4, IL-1R, la subunidad p65 de NF- κ B, COX-2, NLRP3 y caspasa-1 (tanto en su forma activa como en su forma inactiva). Observamos un incremento significativo en la cantidad relativa de estas proteínas en el grupo de VE-WT-ET con respecto al grupo VE-WT-C. No se observaron cambios entre los grupos de VEs procedentes de astrocitos TLR4-KO (Figura 14).

Resultados

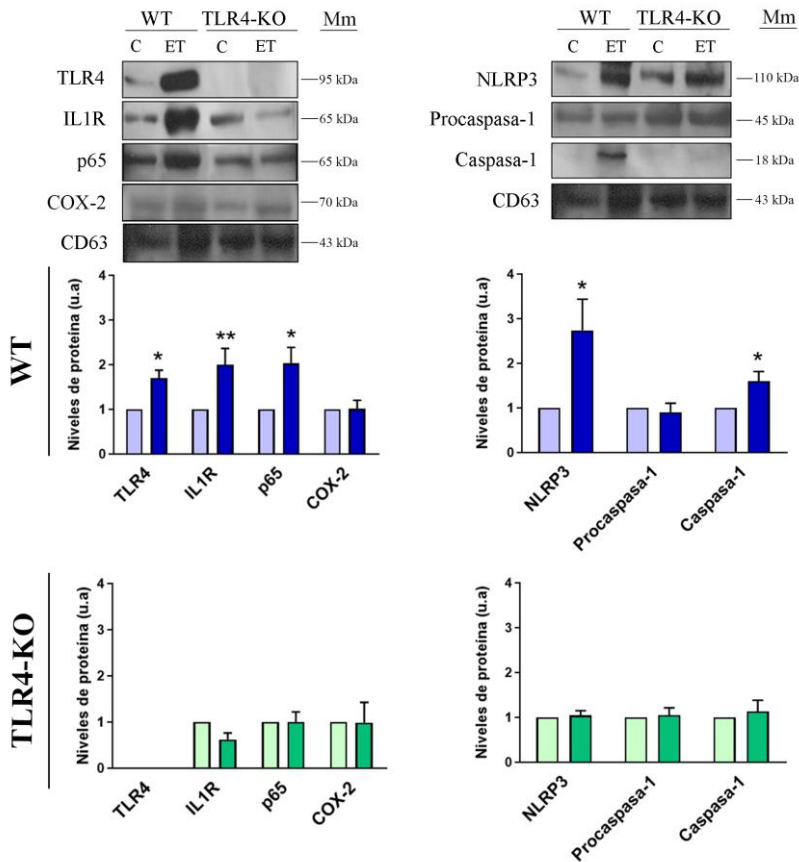


Figura 14: Análisis del contenido proteico de VEs de astrocitos WT y TLR4-KO tras la administración de una dosis fisiológica de etanol (50 mM). Detección por Western Blot de una serie de proteínas relacionadas con el inflammasoma de NLRP3 y su señalización (TLR4, IL-1R, COX-2, p65, NLRP3, y las formas inactiva y activa de la Caspasa-1). CD63 fue utilizado como normalizador. Se muestra un inmunoblot por proteína para cada una de las condiciones de estudio. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, para una n biológica de 6. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y una corrección post-hoc mediante el test de Bonferroni.

4.3. Estudio del efecto del etanol en el perfil de miARNs presentes en las VEs derivadas de astrocitos y papel del receptor TLR4

Durante los últimos años ha habido un gran interés y avance en la regulación de la expresión génica de los miARNs y su implicación en numerosas patologías. De hecho, trabajos previos del laboratorio han demostrado que la administración de etanol en modelos *in vivo* produce la alteración de patrones de expresión de miARNs en la corteza cerebral de ratones crónicos¹²⁴. Teniendo en cuenta estos datos, evaluamos la expresión de diferentes miARNs (mir-146a-5p, mir-182-5p y mir-200b-5p) relacionados con la neuroinflamación en VEs procedentes de astrocitos WT y TLR4-KO, tratados con o sin etanol. Previamente al análisis de expresión, comprobamos la cantidad del miARN obtenido de las VEs mediante el bioanalizador 2100 de *Agilent*. Utilizamos esta metodología ya que la medida por *Nanodrop* no resulta lo suficientemente sensible para este tipo de muestras. La Figura 15 muestra los perfiles de tamaño de los ARNs presentes en las diferentes muestras. Los miARNs tienen una longitud entre 22-25nt, y como se observa en la Figura 15, las muestras presentan una elevación de la señal de fluorescencia entorno a ese tamaño.

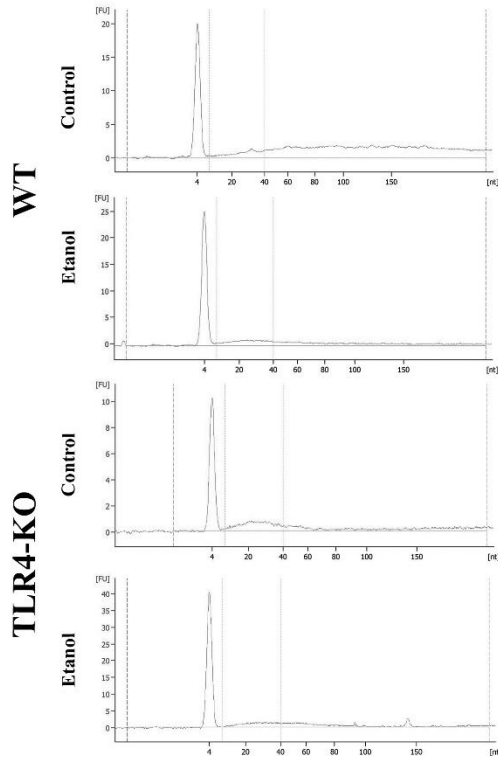
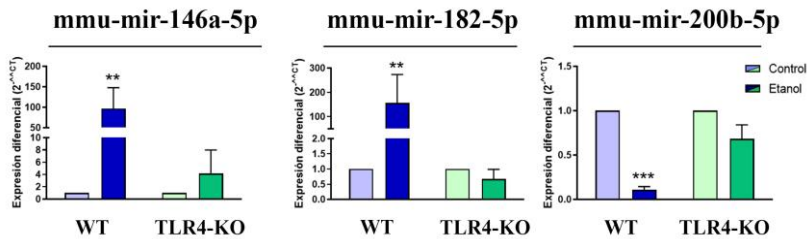


Figura 15: Análisis de las poblaciones de ARN aislados de VEs de todas las condiciones de estudio mediante el bioanalizador 2100 de Agilent. El eje x muestra la longitud de nucleótidos de la población de ARN, mientras que el eje Y muestra la intensidad de fluorescencia.

Los resultados obtenidos mediante el estudio de expresión demostraron un incremento significativo en los niveles de mir-146a-5p y mir-182-5p, mientras que los niveles de mir-200b-5p disminuyeron significativamente en VE-WT-ET, cuando se compararon con sus

respectivos grupos control. Estos cambios no se observaron entre los miARNs procedentes de las VEs de astrocitos TLR4-KO tratados con o sin etanol (Figura 16).



*Figura 16: Expresión diferencial de miARNs inflamatorios en VEs procedentes de astrocitos WT y TLR4-KO tratados con etanol a 50 mM. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, para una n biológica de 6. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y una corrección post-hoc mediante el test de Bonferroni.*

4.4. Análisis bioinformático de los miARNs presentes en VEs de astrocitos tratados con etanol

Tras confirmar que el tratamiento con etanol alteraba los niveles de algunos miARNs presentes en las VEs de astrocitos, realizamos un análisis funcional sobre éstos (mir-146a-5p, mir-182-5p y mir-200b-5p), con el fin de establecer sus principales funciones biológicas y las rutas de señalización donde podrían ejercer dichas funciones. El análisis bioinformático se separó en diferentes fases. La

Resultados

primera fase consistió en la determinación de las dianas preferentes de cada miARN utilizando la herramienta web mirnet (www.mirnet.ca) (Figura 17). El listado de ARNm diana obtenidos para los 3 miARNs se encuentra detallado en la Tabla 4.

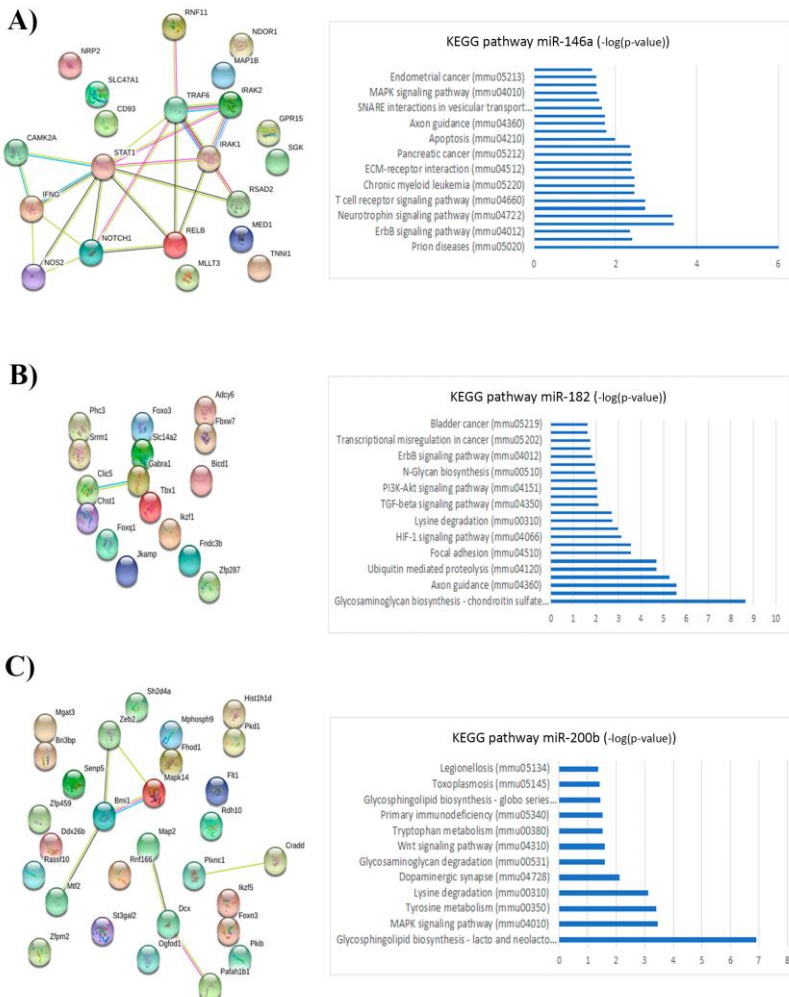


Figura 17: Análisis funcional (I) de mir-146a-5p, mir-182-5p y mir-200b-5p. En la imagen se muestran las interacciones proteína-proteína para los genes predichos para cada miARN y las principales rutas KEGG moduladas por la red de interacción proteica previamente nombrada, utilizando la herramienta web *STRING*. Los p valores están representados como $(-\log(p \text{ value}))$.

Posteriormente, con las dianas ya identificadas, se utilizó la herramienta *STRING* (www.string.es) para establecer una red de interacción proteína-proteína entre ellas. Observamos una mayor interacción entre mir-146a-5p y mir-200b-5p que entre éstos con mir-182-5p. También pudimos detectar las rutas de señalización afectadas más significativamente por estos miARNs acorde con un p-valor. Dichas rutas se muestran con más detalle en la Tabla 5. Por último, utilizamos la herramienta *DIANA miRPath v2.0*, que nos permitió identificar las rutas metabólicas que están siendo cooperativamente afectadas por los miARNs estudiados. Algunas de las rutas que resultan afectadas son NF- κ B, TGF- β , MAPK, crecimiento axonal, entre otras (Figura 18). El listado completo con las rutas *KEGG* obtenidas se muestra en la Tabla 6. Estos resultados indicaron que estos miARNs están modulando simultáneamente rutas de señalización inflamatorias.

Resultados

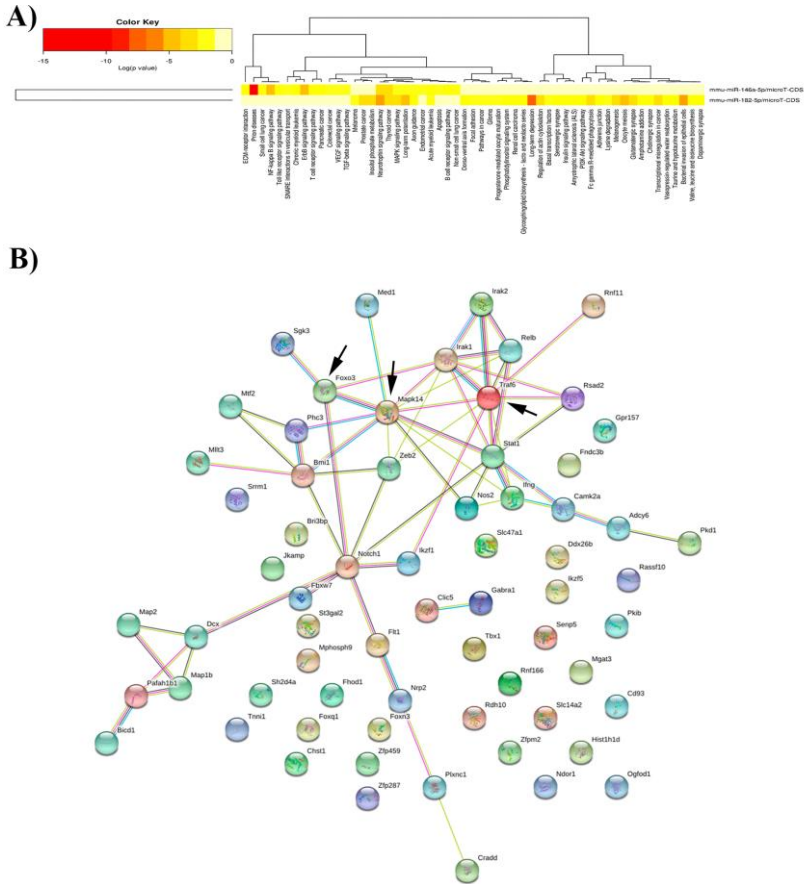


Figura 18: Análisis funcional (II) de mir-146a-5p, mir-182-5p y mir-200b-5p. A) Mapa de calor de las principales rutas KEGG derivadas de la acción de genes simultáneamente modulados por mir-146a-5p y mir-182-5p. B) Red de interacción proteica de los genes predichos a ser modulados simultáneamente por mir-146a-5p y mir-182-5p. Las flechas indican las proteínas seleccionadas para los estudios posteriores.

4.5. Transmisión de la inflamación causada por el consumo de alcohol a neuronas mediante VEs

Puesto que las VEs cumplen un papel importante en la transmisión de información célula-célula durante la homeostasis y en condiciones patológicas, quisimos estudiar la internalización y transferencia de VEs procedentes de astrocitos tratados o no con etanol a neuronas corticales en cultivo primario. Para realizar este experimento, utilizamos neuronas de ratones WT y ratones transgénicos ACTB-DSRed, cuyas células tienen fluorescencia intrínseca al expresar la RFP. Ambas fueron incubadas con VEs previamente teñidas con *SYTO* o *BODIPY*, dependiendo del marcaje celular fluorescente de la neurona (ACTB-DsRed o WT, respectivamente). Observamos que las neuronas eran capaces de internalizar los VEs independientemente de su origen, y se pudo cuantificar un incremento en la intensidad de fluorescencia de ambos fluoróforos (*SYTO* y *BODIPY*) en neuronas incubadas con VE-WT-ET, en comparación con las neuronas incubadas con VE-WT-C (Figura 19A-B). Estas diferencias no se observaron entre los grupos VE-KO4-C y VE-KO4-ET. La Figura 19C muestra la internalización de las VEs en las neuronas, utilizando para ello la proyección en los ejes xyz en el microscopio confocal.

Resultados

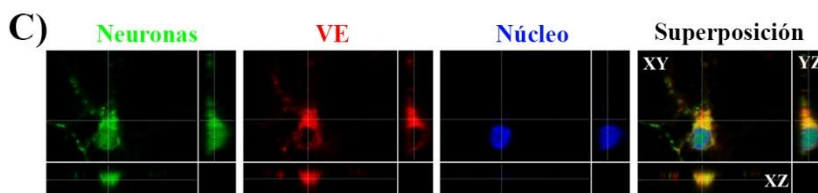
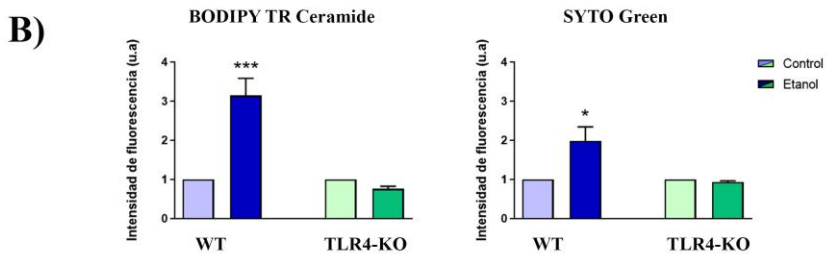
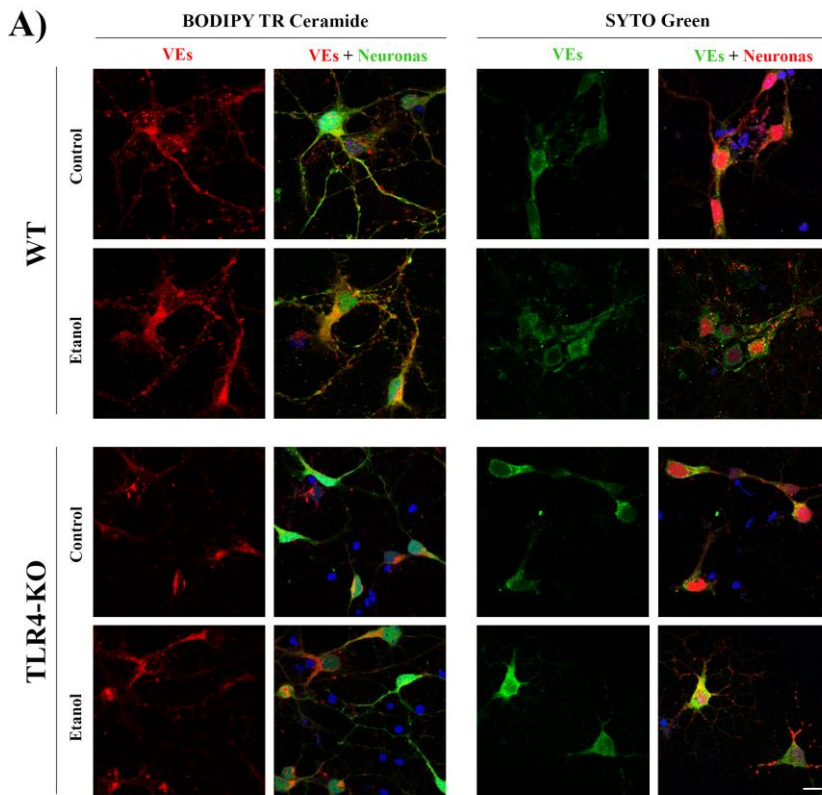


Figura 19: Internalización de las VEs derivadas de astrocitos en cultivos primarios de neuronas. Las neuronas fueron incubadas durante la noche con 9-10 g/L de VEs recién extraídas y marcadas con dos fluoróforos diferentes. **A)** Medida de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo rojo BODIPY y del fluoróforo verde SYTO GREEN en VEs procedentes de astrocitos, siendo internalizadas en cultivos primarios de neuronas marcadas con fluorescencia verde (Cell Tracker Green) o rojo (ratones ACTB-DsRed), respectivamente. Se muestra una microfotografía por cada condición de estudio. Barra de escala, 10 μ m. Las VEs se obtuvieron de cultivos primarios de astrocitos WT o TLR4-KO tras un tratamiento de 24h con etanol a 50 mM. **B)** Los gráficos de barras representan la media \pm SEM de 3 campos diferentes por condición, de 6 cultivos diferentes. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, al ser comparadas con sus respectivos controles al someterlas a un Two-Way ANOVA con una corrección post-hoc mediante el test de Bonferroni. **C)** Imágenes de microscopía confocal mostrando que las VEs han sido internalizadas en el citoplasma, demostrándose al utilizar las proyecciones en los ejes xyz. La fluorescencia verde, roja y azul representan el Cell tracker Green, las VEs marcadas con BODIPY y la tinción nuclear, respectivamente.

Una vez determinado que las VEs podían ser internalizadas por células diana, decidimos investigar la posibilidad de que dicha internalización pudiera alterar los niveles de proteínas relacionados con la inflamación. Analizamos su contenido mediante *Western blot* y qPCR y observamos un incremento de la proteína inflamatoria COX-2, marcador clásico de inflamación, en las neuronas que habían sido incubadas con VE-WT-ET (Figura 20). No observamos cambios

Resultados

significativos en otras proteínas inflamatorias observadas en este estudio, como NF- κ B-p65, NLRP3 o IL-1R, entre otras.

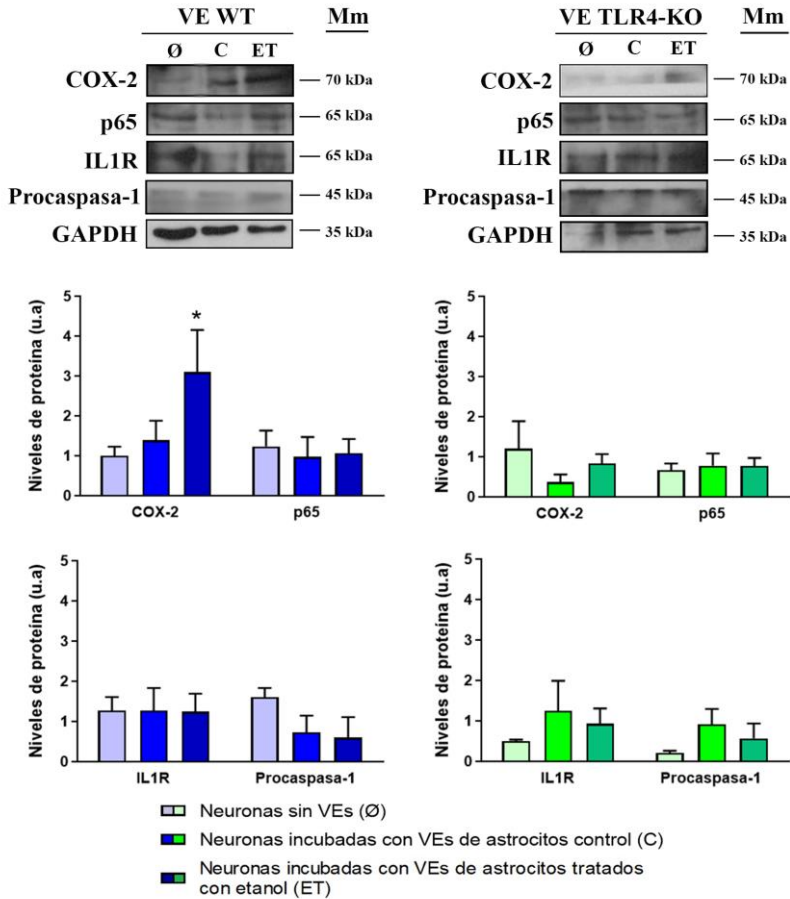


Figura 20: Efectos de la internalización de las VEs procedentes de astrocitos en cultivos primarios de neuronas corticales. Cuantificación por Western Blot de los niveles neuronales de COX-2, p65, IL-1R y procaspasa-1 en presencia de VEs de astrocitos tratados o no, WT o TLR4-KO. También se utilizó como control añadido un grupo de neuronas sin incubación con VEs. Se muestra un inmunoblot representativo por proteína y su peso molecular.

*Las neuronas se incubaron con 9-10 g/L de VEs recién extraídas. Se utilizó la proteína GAPDH como normalizador para la cuantificación. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, para una n biológica de 6. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.*

4.6. Papel de los miARNs de VEs procedentes de astrocitos tratados con etanol en neuronas corticales

Debido a los resultados expuestos en el apartado anterior (4.5), postulamos que la regulación por miARNs podría también estar alterada. Para ello, se midieron los niveles de los 3 miARNs previamente estudiados, mir-146a-5p, mir-182-5p y mir-200b-5p (puesto que presentaban alteraciones estadísticamente significativas en las VEs de astrocitos), mediante RT-qPCR y se detectaron cambios en los niveles de expresión de estos miARNs (Figura 21A). Mir-146a-5p se encontraba significativamente aumentado en neuronas incubadas con VE-WT-ET con respecto a sus controles, tanto neuronas sin VEs como aquellas incubadas con VE-WT-C. Mir-182-5p presentó ligeros aumentos (aunque no estadísticamente significativos) tanto en las neuronas incubadas con VE-WT-ET como aquellas incubadas con VE-WT-C. Mir-200b-5p no pudo ser detectado en ninguna de las muestras de cultivos primarios de neuronas, por lo que se descartó para los

Resultados

siguientes análisis. Las neuronas incubadas con VE-KO4-C y VE-KO4-ET, no presentaron cambios significativos en sus niveles de miARNs. A continuación, se analizaron los genes diana sobre los cuales los miARNs (mir-146a-5p y mir-182-5p) podrían estar modulando su expresión. Se identificaron diferentes genes diana que estaban relacionados con la respuesta inmune inflamatoria, Traf6, Irak1, Notch1, TNF- α , Mapk14 y Foxo3, entre otros. Por tanto, se evaluaron los niveles de expresión de los genes Traf6, Mapk14, Foxo3 (Figura 21B) e IL-1 β (Figura 22A) en neuronas corticales en cultivo primario. Se observaron diferencias significativas en Traf6, Mapk14, Foxo3 e IL-1 β entre las neuronas incubadas con VE-WT-ET, y las neuronas control e incubadas con VE-ET-C, siendo el cambio más notorio el aumento de Traf6 (Figura 21B). No se detectaron cambios significativos entre los grupos de neuronas incubadas con VE-KO4 (Figura 21).

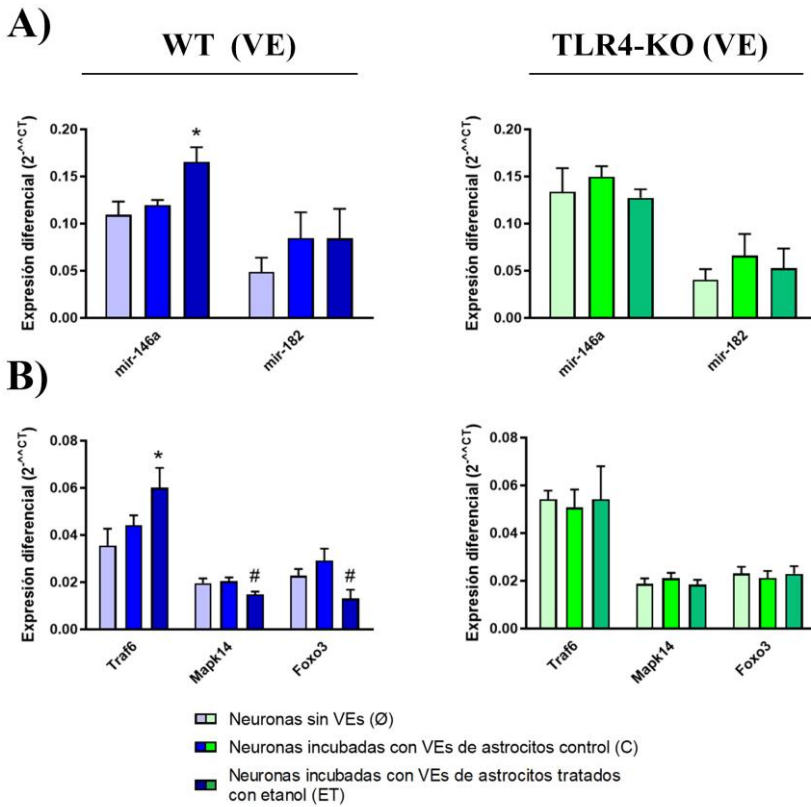


Figura 21: La incubación con VEs procedentes de astrocitos WT tratados con etanol altera los niveles de ciertos miARNs y sus genes diana. A) Resultados de los niveles de expresión de mir-146a-5p y mir-182-5p mediante RT-qPCR en cultivos de neuronas incubadas o no con VEs procedentes de astrocitos WT o TLR4-KO tratados o no con etanol a 50 mM, 24 horas. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias, utilizando el RNAU6 como normalizador para la cuantificación. Los datos representan la media \pm SEM, con una n=4-5 de experimentos independientes. * $p < 0,05$ al comparar con el grupo de neuronas sin incubación con VEs, acorde a One-way ANOVA con Bonferroni de post test. B) Análisis de la expresión génica por RT-qPCR de algunos genes seleccionados del análisis funcional de miARN, Traf6, Mapk14

Resultados

y Foxo3. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias, normalizadas frente a la Ciclofilina A. Los datos representados muestran la media \pm SEM de $n=4-5$. * $p<0,05$ al comparar frente a neuronas sin incubación de VEs, # $p<0,05$, al comparar frente a sus respectivos controles mediante test de la T.

Para finalizar este estudio, se cuantificó la apoptosis neuronal mediante la evaluación por microscopio confocal de los núcleos fragmentados. Se observó que las neuronas incubadas con VE-WT-ET presentaban un mayor porcentaje de núcleos fragmentados ($41.0\pm 3.6\%$) en comparación con las neuronas incubadas con VE-WT-C ($25.4\pm 1.7\%$) y las tratadas con VEs procedentes de astrocitos TLR4-KO ($27.4\pm 2.2\%$ para VE-KO4-ET y $26.5\pm 1.9\%$ para VE-KO4-C) (Figura 22B).

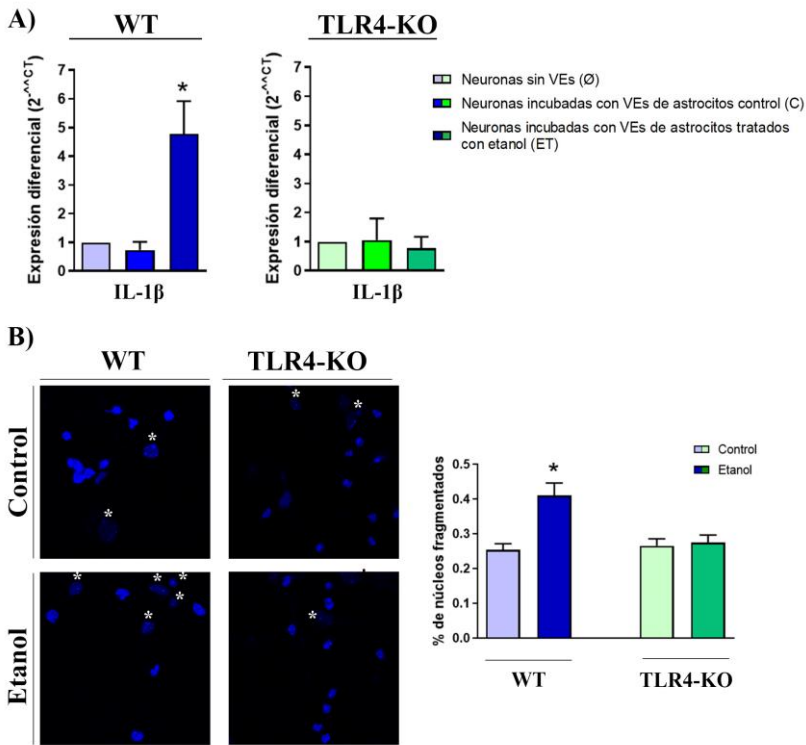


Figura 22: Inducción de marcadores inflamatorios y de apoptosis tras incubación con VEs de astrocitos WT tratados con etanol. **A)** Niveles de expresión del ARNm IL-1 β tras incubar durante 24 horas con VEs procedentes de astrocitos WT o TLR4-KO o no. **B)** Conteo de núcleos fragmentados por microscopía confocal, marcador de apoptosis. Se han señalado ejemplos de núcleos fragmentados con asteriscos blancos. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una n=4-5. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un one-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

4.7. El etanol es capaz de activar MAM en tejido cerebral y células microgliales

En los resultados expuestos en el apartado 4.1, observamos un incremento en la liberación de VEs en las células de astrogliá tratadas con etanol, sin embargo, desconocemos el mecanismo implicado en este incremento en la liberación. Recientemente se ha demostrado la implicación de una familia de enzimas, las esfingomielinasas, en el proceso de biogénesis y liberación exosomal^{144,150,151}. Estas enzimas también se han vinculado con una región del RE en contacto con mitocondrias, MAM, donde existe una alta actividad esfingomielinasa^{137,152,153}. Además, Pascual y colaboradores¹⁵⁴ en 2003 demostraron que el etanol aumentaba el contenido de ceramida en astrocitos mediante la activación de las enzimas esfingomielinasas. Teniendo en cuenta estos datos, postulamos que las esfingomielinasas, en conjunción con MAM, podrían ser responsables del incremento en la liberación de VEs en los astrocitos tratados con etanol.

En primer lugar, quisimos demostrar los efectos del etanol sobre MAM, para ello se analizó la actividad de transferencia de fosfolípidos, medida como incorporación de ³H-Serina en PtdSer, PtdEtn y PtdChol en un modelo *in vitro* (fracciones de MAM aisladas de tejido cerebral de ratón) y en un modelo en células BV2 en cultivo.

Por un lado, se extrajo la fracción de tejido cerebral correspondiente a MAM mediante ultracentrifugación diferencial con gradiente, y directamente sobre esta fracción se añadieron diferentes concentraciones de etanol (10, 50 y 100 mM) y ^3H -Serina. Transcurrido el tiempo de reacción, se midió la señal radioactiva de las diferentes especies de fosfolípidos, como marcador de actividad de MAM. Se observaron diferencias significativas en los niveles de las diferentes especies de fosfolípidos tras la administración de etanol en comparación con su control (Figura 24). La concentración de PtdSer aumentó de forma gradual según aumentaba la concentración de etanol administrado, alcanzando el pico con la concentración de etanol 100 mM. Para la PtdEtn, se observaron niveles similares a concentraciones de 50 y 100 mM, y no observamos diferencias significativas en los niveles de PtdChol, aunque si se puede observar un aumento al tratar con etanol 50 mM con respecto al control (Figura 24). Estos resultados sugieren que el etanol es capaz de activar MAM.

Resultados

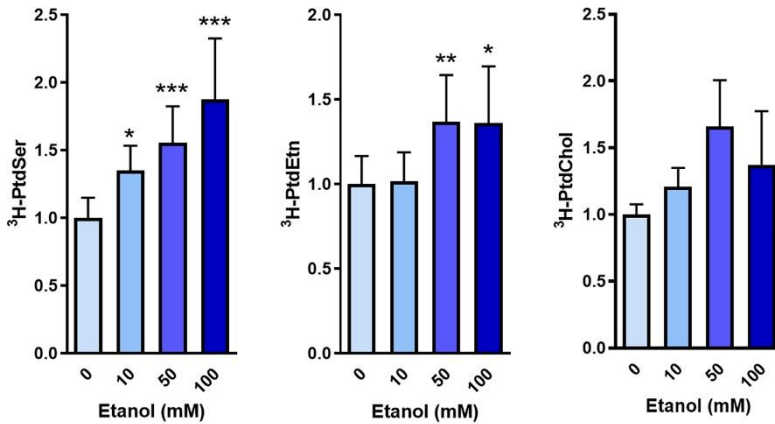


Figura 23: Efectos del etanol sobre la actividad de MAM en tejido aislado de cerebro. Se añadieron concentraciones crecientes de etanol a una fracción de MAM aislada de cerebro de ratón y se evaluaron los niveles de 3 especies de fosfolípidos (fosfatidil-Serina, fosfatidil-Etanolamina y fosfatidil-Colina) como marcadores de actividad del orgánulo. La radioactividad emitida por cada especie de fosfolípido fue obtenida mediante TLC y cuantificado por un contador de centelleo. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=3$. * $p<0,05$ al ser comparados frente al control según un One-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

Por otro lado, se analizó la actividad de MAM en la línea celular BV2. Dichas células se incubaron con ^3H -Serina y etanol, siendo el etanol añadido al mismo tiempo o 24 horas antes que la ^3H -Serina. Posteriormente, se analizaron las diferentes especies de fosfolípidos estudiadas previamente y que son marcador de la actividad

de MAM, y observamos que aquellas células que habían sido tratadas con etanol, tanto a 50 mM como a 100 mM, al mismo tiempo que la ^3H -Serina o 24 horas antes, presentaban unos mayores niveles de estas especies que el grupo control, lo que se traduciría en una mayor actividad de MAM (Figura 25).

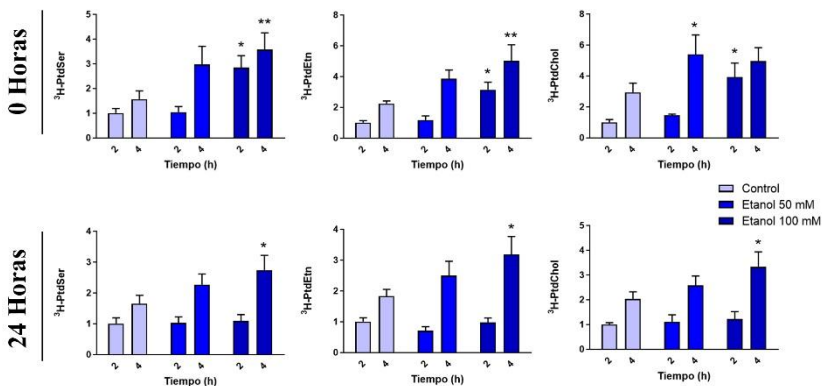


Figura 24: Estudio in vivo de la modulación del etanol sobre la actividad de MAM en células BV2. Análisis del transporte de fosfolípidos mediado por MAM, como medidor de su actividad, tras una estimulación a 0h y tras 24h después de haber introducido la ^3H -Serina en cultivos de células BV2. La radioactividad emitida por cada especie de fosfolípido se obtuvo mediante TLC y se cuantificó utilizando un detector de centelleo. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=3$. * $p<0,05$ al ser comparados frente al control según un One-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

4.8. La inhibición de las esfingomielinasas y MAM revierte el aumento de secreción de VEs por etanol

En el apartado anterior presentamos a las enzimas esfingomielinasas y MAM como posibles responsables del incremento de la secreción de VEs causado por el etanol y, pudimos observar que en efecto, estos componentes se activan en respuesta al etanol. Por tanto, para profundizar en el papel de la actividad esfingomielinasa y MAM en la liberación de las VEs en las células gliales, decidimos utilizar inhibidores de estos componentes junto con un tratamiento con etanol y analizar la secreción de VEs. Estos estudios se llevaron a cabo con una línea comercial celular de microglía, BV2. Estas células se preincubaron con Desipramina (5 μM) (inhibidor de la esfingomielinasa ácida), GW4869 (10 μM) (inhibidor de la esfingomielinasa neutra) o Ciclosporina A (2 μM) (inhibidor de actividad de MAM) durante 2 horas previas al tratamiento con etanol. Transcurridas las 24 horas de tratamiento con etanol más los inhibidores, se aislaron las VEs presentes en el medio de cultivo y se cuantificaron mediante *Nanosight*. Como se muestra en la Figura 23A, la distribución del tamaño de las partículas fue similar a la obtenida en el apartado 4.1 en células astrogliales. Respecto a los diferentes tratamientos, pudimos observar un aumento significativo en la secreción de VEs en las células

tratadas con etanol con respecto al control, mientras que el pretratamiento con Desipramina, GW4869 o Ciclosporina A en las células tratadas con etanol revirtió la liberación de VEs a valores similares a los del grupo control (Figura 23B).

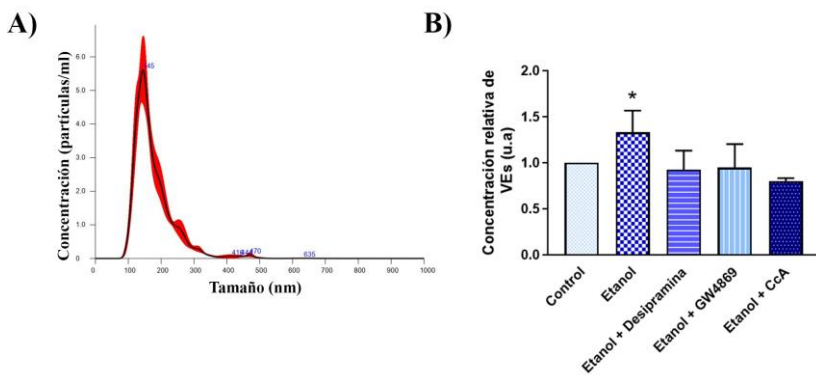


Figura 25: Papel de las enzimas esfingomielinsas y MAM en la liberación de VEs inducida por el etanol. **A)** Ejemplo de la medida de la distribución de tamaños y la concentración de partículas en muestras de VEs aislados de medio de cultivo de células microgliales BV2. **B)** Representación gráfica de la comparativa en liberación de VEs entre los diferentes tratamientos. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, relativizada frente al grupo control, con una $n=6$. * $p<0,05$ al ser comparados frente al control según un One-way ANOVA y usando Bonferroni como corrección post-hoc.

4.9. Diferencias de género en el perfil de miARNs de VEs de plasma de adolescentes humanos

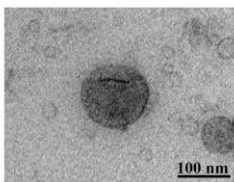
Anteriormente se ha descrito la relevancia de los miARNs en la señalización y comunicación celular, así como su presencia en VEs, y la capacidad del etanol para alterar los patrones de expresión de diferentes miARNs tanto a nivel celular como en el propio cargo de las VEs. Por todo ello, nuestro siguiente objetivo fue analizar si una intoxicación etílica aguda (IEA) podía alterar los perfiles de determinados miARNs en las VEs circulantes en plasma de adolescentes de ambos sexos. Esto nos podría aportar, por un lado, un posible indicador del daño neural asociado al consumo de alcohol, así como también, información importante sobre las diferencias de género en estos efectos.

Para evaluar si el etanol causaba alteraciones en los patrones de miARNs de chicos y chicas adolescentes con IEA, se analizaron muestras de plasma de pacientes ingresados en el Hospital de Salamanca con dicho diagnóstico. Los individuos estaban comprendidos entre los 18-21 años en el caso de las mujeres y entre los 19-22 años en el caso de los hombres. Los BALs de estos individuos fueron de 2,1 g/L (1,80-2,50 IQR) para las mujeres y 2,4 g/l (2,28-2,73 IQR) para los hombres. Los individuos control tenían una media de 22

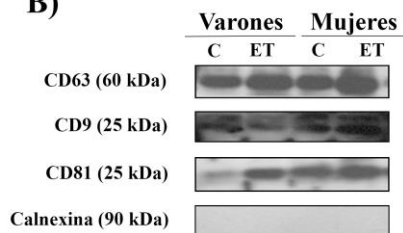
años para los hombres (21,2-26,2 IQR) y 23 para las mujeres (21,5-25,7 IQR).

Para el estudio se seleccionaron miARNs relacionados con la respuesta inmune inflamatoria¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ (mir-146a-5p, mir-21-5p, mir-182-5p y mir-183-5p). Se extrajeron los VEs presentes en el plasma de los pacientes utilizando el kit *Total Exosome Isolation (from plasma)* (Invitrogen) y se validaron las muestras de VEs mediante la expresión proteica de las tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81) y Calnexina por *Western Blot* y mediante sus características de morfología y tamaño por MET. La Figura 26B muestra que las VEs expresaban las proteínas CD63, CD9 y CD81, mientras carecían de marcaje para Calnexina, demostrando que no había contaminación de membranas celulares. Mediante MET se pudo observar que las VEs presentan las características típicas en cuanto al tamaño (30-150 nm) y morfología⁷⁹ (Figura 26A).

A)



B)



Resultados

Figura 26: Caracterización de las VEs obtenidas del plasma de pacientes adolescentes. A) Imagen de MET donde se muestra una partícula con las características morfológicas de las VEs. Barra de escala: 100 nm. Immunoblots correspondientes a 3 marcadores positivos de VEs (CD63, CD9 y CD81) y a un marcador negativo (Calnexina), mostrando su peso molecular, para cada condición de estudio.

Los niveles de expresión de los miARNs, mir-146a-5p, mir-21-5p, mir-182-5p y mir-183-5p, demostraron que la IEA causaba un descenso significativo en los niveles de mir-146a-5p y mir-21-5p en mujeres adolescentes cuando se les comparaba con individuos sanos, mientras que los hombres presentaban un aumento no significativo en ambos miARNs en comparación con sus controles (Figura 27A-B). También se observó un aumento significativo de mir-182-5p en hombres con IEA, mientras que éste disminuía en mujeres (Figura 27C). Respecto al mir-183-5p, se detectó un aumento no significativo de sus niveles de expresión en respuesta al etanol en mujeres, pero no en hombres (Figura 27D). Los resultados del Two-way ANOVA mostraron una interacción significativa entre las variables género y tratamiento para el mir-146a-5p ($[F(1,20) = 5,79, p < 0,05]$), el mir-21-5p [$F(1,17) = 6,36, p < 0,05]$ y el mir-182-5p [$F(1,24) = 6,28, p < 0,05]$], pero no para el mir-183-5p [$F(1,20) = 0,58, p > 0,05]$.

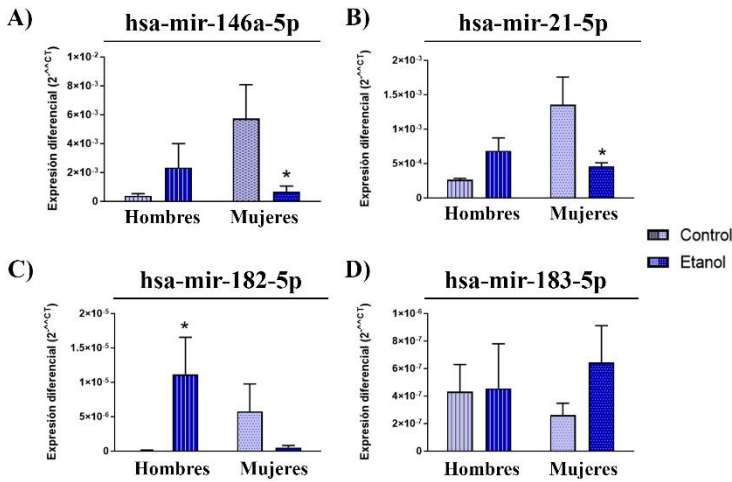


Figura 27: Efecto del etanol sobre el contenido de miARNs presente en las VEs del plasma de pacientes adolescentes. Resultados de los niveles de expresión de: A) mir-146a-5p, B) mir-21-5p, C) mir-182-5p y D) mir-183-5p mediante RT-qPCR presentes en las VEs aisladas del plasma de pacientes control o con IEA. Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto al miARN mir-451a. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una n=6. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

Puesto que los miARNs pueden encontrarse en circulación tanto dentro de exosomas como asociados a otros complejos proteicos¹⁵⁹, comparamos la expresión de miARNs encapsulados en VEs y libres en plasma (entiéndase por libres todos aquellos miARNs no asociados a VEs, independientemente de que formen complejos con otros elementos) (Figura 28A-D). Mir-182-5p mostró no estar presente

Resultados

en forma libre, y concentrarse en VEs, especialmente en aquellas muestras procedentes de hombres con IEA, donde se observó un incremento muy significativo (Figura 28C). Por otra parte, en las mujeres con IEA se obtuvo una disminución no significativa de los niveles de dicho miARN en VEs de plasma (Figura 28C). El análisis por Two-Way ANOVA mostró una interacción significativa entre tipo de muestra (plasma o VEs) y tratamiento en hombres [$F(1,12) = 8,12$, $p < 0,05$], pero no en mujeres [$F(1,20) = 1,61$, $p > 0,05$]. El resto de miARNs estudiados (mir-146a-5p, mir-21-5p y mir-183-5p) no mostraron cambios estadísticamente significativos entre las muestras de plasma y las muestras de VEs.

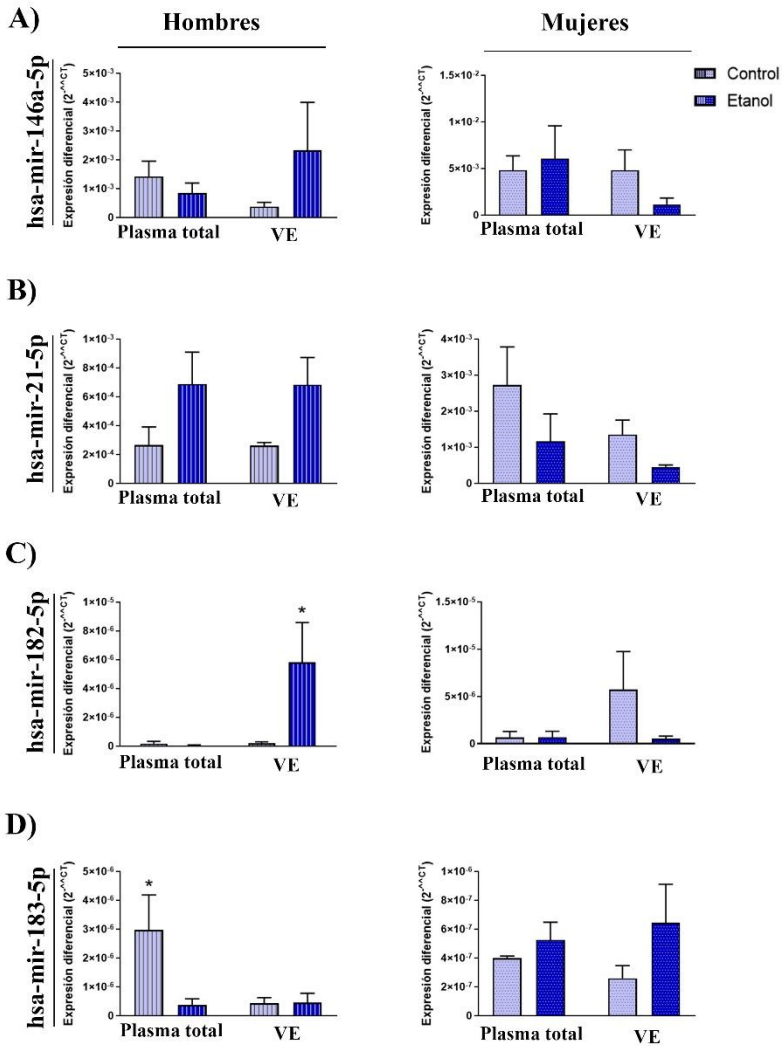


Figura 28: Comparativa de la presencia de los miARNs entre la forma libre en plasma y asociado a VEs plasmáticas. Resultados de los niveles de expresión de A) mir-146a-5p, B) mir-21-5p, C) mir-182-5p y D) mir-183-5p mediante RT-qPCR presentes en las VEs aisladas del plasma y en forma libre de pacientes control o con IEA. Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto al miARN mir-451a. Los datos

Resultados

representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=6$. * $p<0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

4.10. Diferencias de género en el perfil de miARNs de VEs de plasma de ratones adolescentes

Con el fin de investigar el posible papel del TLR4 en los resultados mostrados en el apartado anterior, se utilizó un modelo experimental de administración aguda intermitente de etanol en ratones adolescentes WT y TLR4-KO, mimetizando el patrón de consumo de alcohol que siguen los humanos adolescentes. De la misma manera que se realizó en experimentos anteriores, se analizaron las características de las VEs, extraídos utilizando el kit *Total Exosome Isolation (from plasma)* (Invitrogen), mediante MET y *Western Blot* (tetraspaninas CD63, CD9 y CD81 como marcadores positivos y Calnexina como marcador negativo), con el fin de confirmar la presencia de VEs en las muestras. Las imágenes de MET muestran partículas dentro del rango de tamaño de los exosomas (30-150 nm) y con una morfología característica de éstos (Figura 29A). Las muestras resultaron positivas para las tetraspaninas y negativas para la Calnexina (Figura 29B).

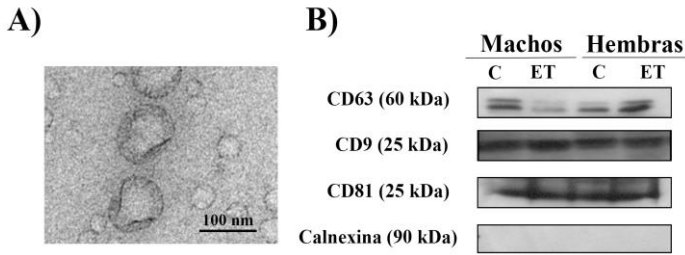


Figura 29: Caracterización de las VEs obtenidas del plasma de ratones adolescentes. A) Imagen de MET donde se muestran diferentes estructuras con características morfológicas similares a las VEs. Barra de escala: 100 nm. B) Immunoblots correspondientes a 3 marcadores positivos de VE (CD63, CD9 y CD81) y a un marcador negativo (Calnexina), mostrando su peso molecular, para cada condición de estudio.

Se analizaron los niveles de los mismos miARNs previamente estudiados en las VEs de plasma de adolescentes humanos (mir-146a-5p, mir-21-5p, mir-182-5p y mir-183-5p). El tratamiento con etanol redujo significativamente los niveles de mir-146a-5p y mir-182-5p en los VEs de hembras, mientras que aumentó significativamente los niveles de mir-21-5p en machos (Figura 30A-B). Aunque mir-182-5p presentó un aumento en machos, éste no fue significativo (Figura 30C). De igual modo, se observó que mir-183-5p en ambos géneros aumentó tras el tratamiento con etanol, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo (Figura 30D). El resultado del Two-way ANOVA nos

Resultados

indicó que existía una interacción significativa entre las variables género y tratamiento para el mir-146a-5p [$F(1,23) = 14,46$, $p < 0,05$], el mir-21-5p [$F(1,27) = 3,38$, $p < 0,05$] y el mir-182-5p [$F(1,26) = 13,73$, $p < 0,05$], mientras el mir-183-5p, aunque su interacción no fue estadísticamente significativa [$F(1,26) = 0,0001$, $p > 0,05$], si lo fue el tratamiento [$F(1,26) = 4,288$, $p < 0,05$].

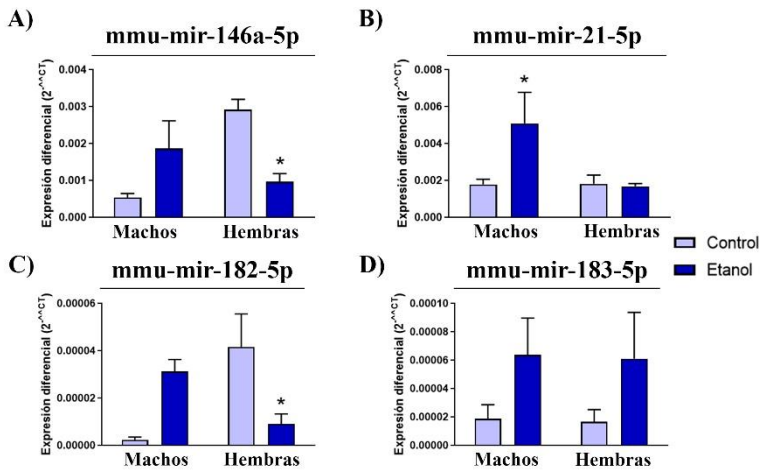


Figura 30: Efectos del etanol en el contenido de VEs circulantes en el plasma de ratones adolescentes. Resultados de los niveles de expresión de A) mir-146a-5p, B) mir-21-5p, C) mir-182-5p y D) mir-183-5p mediante RT-qPCR presentes en las VEs aisladas del plasma de ratones machos y hembras, tratados con etanol o suero fisiológico (control). Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto al miARN mir-451a. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media +/- SEM, con una n=6. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

De igual modo que en las muestras de VEs de humano, se comparó la expresión de los miARNs previamente estudiados entre el plasma y las VEs de ratones adolescentes macho y hembra con y sin tratamiento con etanol (Figura 31). Los resultados mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión del mir-182-5p entre plasma y VEs plasmáticas, observando un incremento significativo en las VEs procedentes de ratones macho tratados con etanol en comparación con su control, mientras que las hembras tratadas con etanol presentaron un descenso significativo de la expresión del mismo miARN (Figura 31C). El Two-way ANOVA mostró una interacción significativa entre las variables tipo de muestra y tratamiento en machos [$F(1,28) = 9,13, p < 0,05$], pero no en hembras [$F(1,31) = 3,11, p > 0,05$].

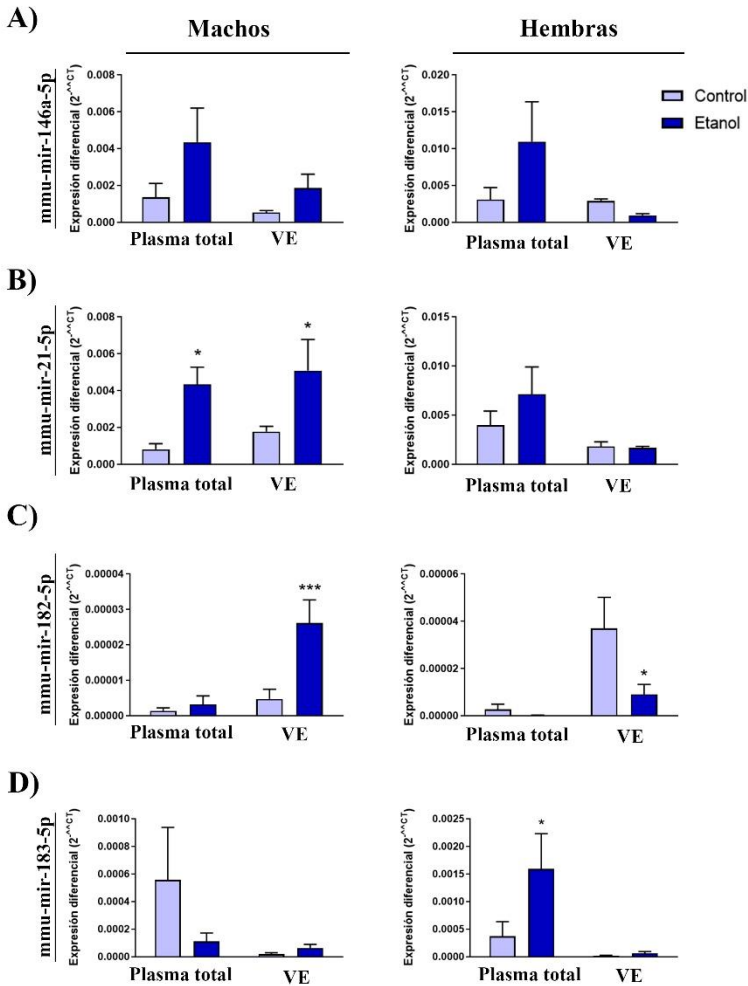


Figura 31: Comparativa de la presencia de los miARNs entre la forma libre en plasma y la encapsulada en VEs plasmáticas de ratones adolescentes. Resultados de los niveles de expresión de **A)** mir-146a-5p, **B)** mir-21-5p, **C)** mir-182-5p y **D)** mir-183-5p mediante RT-qPCR presentes en las VEs aisladas del plasma y en forma libre de ratones WT, machos y hembras, tratados con etanol o suero fisiológico (control). Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto al miARN mir-451a y se representan en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una n=6. *

p < 0,05 al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

Para determinar el papel que ejerce el receptor TLR4 sobre el contenido en miARNs de VEs circulantes en plasma, se utilizaron animales adolescentes TLR4-KO macho y hembra. La Figura 32 muestra que el tratamiento con etanol en los animales TLR4-KO no produjo diferencias significativas en la expresión de los miARNs, en comparación con los animales control, tratados con suero fisiológico. El análisis por Two-Way ANOVA no reveló ninguna interacción significativa entre las variables género, tratamiento o tipo de muestra para mir-146a-5p [F(1,20) = 0,11, *p* > 0,05], mir-21-5p [F(1,20) = 0,01, *p* > 0,05], mir-182-5p [F(1,19) = 0,36, *p* > 0,05] o mir-183-5p [F(1,18) = 1,95, *p* > 0,05].

Resultados

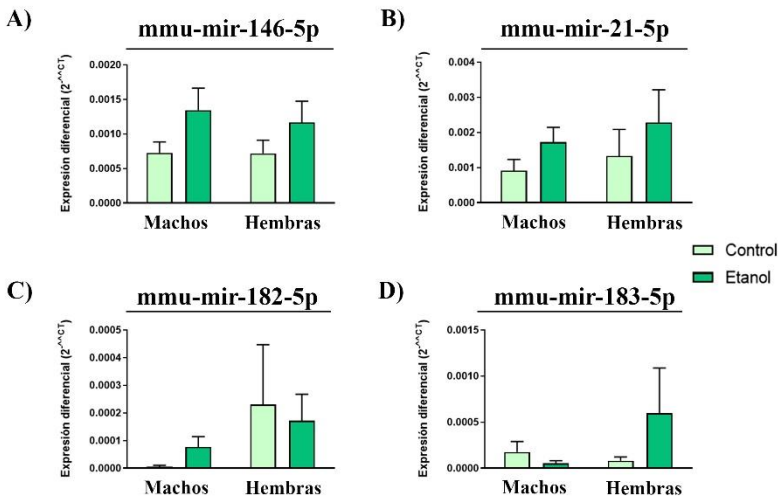


Figura 32: Efectos del etanol en el contenido de VEs circulantes en el plasma de ratones adolescentes TLR4-KO. Resultados de los niveles de expresión de mir-146a-5p, mir-21-5p, mir-182-5p y mir-183-5p mediante RT-qPCR presentes en las VEs aisladas del plasma de ratones machos y hembras, tratados etanol o suero fisiológico (control). Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto al miARN mir-451a. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=6$. * $p<0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

4.11. Efectos de la IEA en los perfiles de miARNs en la corteza cerebral y tejido hepático de ratones adolescentes

A continuación, se evaluó si las diferencias de género observadas en la expresión de miARNs inflamatorios presentes en las

VEs de plasma de ratones WT tratados con etanol, estaban ligadas con una diferente expresión de estas moléculas en la corteza cerebral e hígado de los sujetos a estudio, y si éstas pudieran ser detectadas en la etapa joven adulta. Para ello, medimos los niveles de los mir-146a-5p y mir-21-5p en corteza e hígado de ratones WT tras el tratamiento con etanol (corto plazo) y después de 2 semanas de abstinencia (largo plazo). Escogimos estos miARNs para este estudio debido a su relevancia estadística observada en los resultados de RT-qPCR de los apartados 4.9 y 4.10. Observamos que, aunque el tratamiento con etanol aumentó los niveles de los mir-146a-5p y mir21-5p en ratones macho adultos (largo plazo), en hembras produjo el efecto contrario, disminuyéndolos significativamente (Figura 33A). No observamos diferencias significativas entre las expresiones de los miARNs tanto a nivel de corteza en los ratones a corto plazo, como en el hígado de ratones a corto y largo plazo (Figura 33A-B). El análisis por Two-way ANOVA reveló una interacción significativa entre las variables género y tratamiento con etanol para el mir-146a-5p [$F(1,12) = 21,60$, $p < 0,05$] y para mir-21-5p [$F(1,16) = 9,28$, $p < 0,05$] en las cortezas cerebrales de ratones de largo plazo.

Resultados

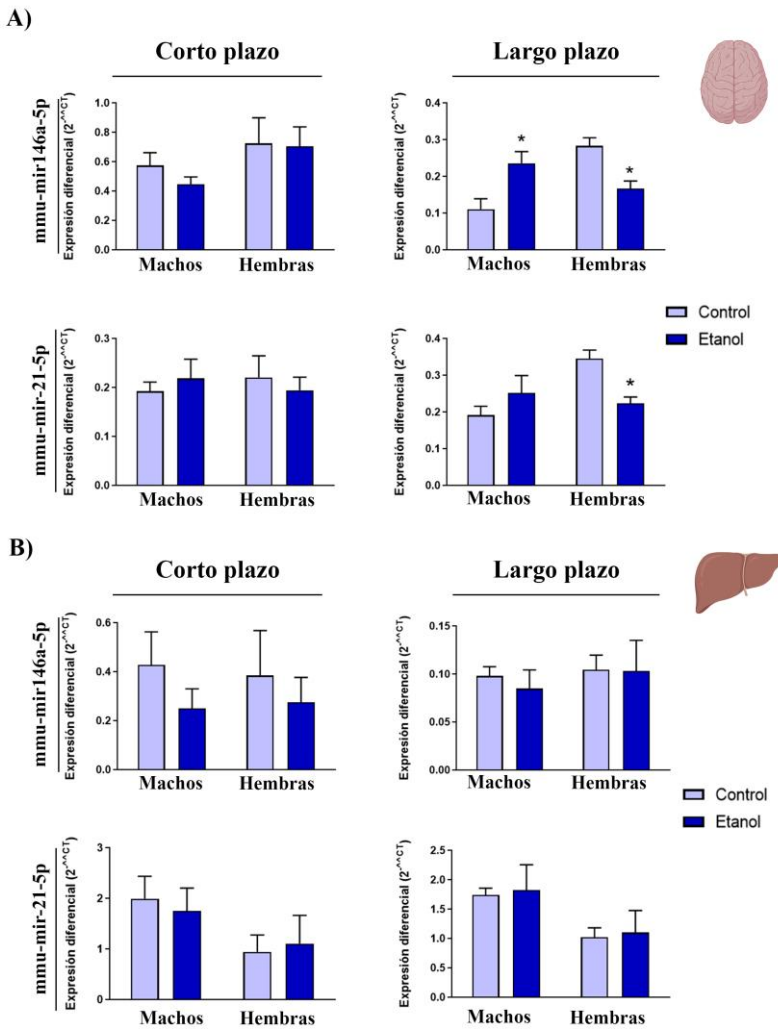


Figura 33: El género como factor importante en la respuesta al tratamiento con etanol a corto y largo plazo. Expresión génica medida por RT-qPCR de los miARNs mir-146a-5p y mir-21-5p en lisados de **A)** cerebros e **B)** hígados de ratones adolescentes tomados justo al finalizar el tratamiento (corto plazo) y 14 días después de recibir la última dosis de etanol (largo plazo), junto con sus respectivos controles (tratados con suero fisiológico). Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto al miARN mir-451a.

Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=6$. * $p<0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como corrección post-hoc.

4.12. Análisis funcional de los miARNs: genes diana y sus niveles en tejido cerebral y hepático tras IEA

Puesto que observamos una interacción estadísticamente significativa entre el género y el tratamiento con etanol, decidimos llevar a cabo un análisis funcional para determinar los posibles genes diana que podrían estar regulados por los miARNs analizados (mir-146a-5p y mir-21-5p) en la corteza cerebral y determinar su posible función en la respuesta inmune neuroinflamatoria inducida por el etanol. Para ello, el análisis bioinformático se dividió en dos pasos. El primero se utilizó para determinar los genes diana que estaban regulados por mir-146a-5p y mir-21-5p mediante la herramienta web mirnet.ca. Una vez identificadas los genes diana, entre los que se encontraban Traf6, Camk2a, Irak1, Irak2 o Stat1, se utilizó la herramienta *STRING*, para determinar la red de interacción proteína-proteína entre esas dianas (Figura 34A). Obtuvimos una serie de vías de señalización inflamatorias estadísticamente significativas acorde a su p-valor, en la que estarían involucradas estas dianas (Figura 34B),

Resultados

como la vía del TLR4 MyD88 dependiente, la vía del TLR7 o la señalización por interleuquinas.

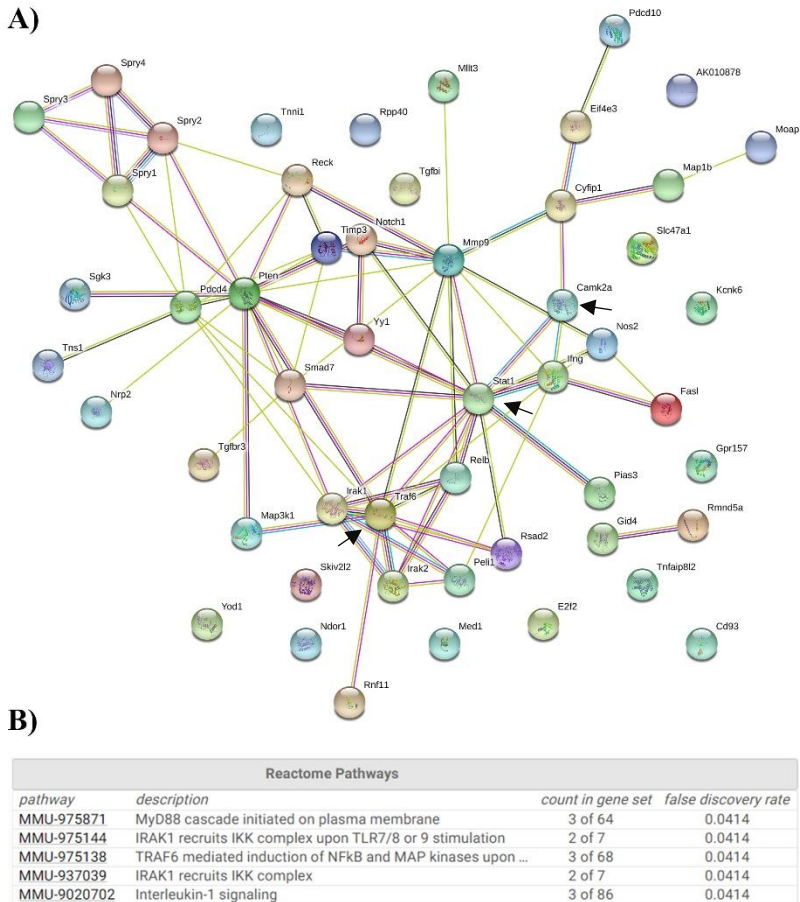


Figura 34: Análisis funcional de las rutas moduladas por mir-146a-5p y mir-21-5p y posibles genes diana involucrados. A) Red de la interacción proteica entre los posibles genes diana modulados simultáneamente por mir-146a-5p y mir-21-5p. B) Rutas de señalización más afectadas por los genes diana obtenidos resultado del análisis.

Posteriormente, se analizaron alguna de las posibles dianas de los miARNs, mir-146a-5p y mir-21-5p, para determinar sus niveles en la corteza cerebral. Se escogió Stat3 como representante de la ruta JAK/STAT, de la cual también forma parte Stat1¹⁶⁰. Además, se analizaron los genes Traf6 y Camk2a, que se encuentran modulados por mir-146a-5p y mir-21-5p^{155,161} y están implicados en la respuesta inmune inflamatoria^{35,162,163}. Los resultados muestran que el tratamiento con etanol disminuyó los niveles de Traf6 y Stat3 en las cortezas cerebrales de ratones machos (largo plazo), mientras que los niveles de estos genes junto con Camk2a aumentaron en las cortezas de los ratones hembra (Figura 35).

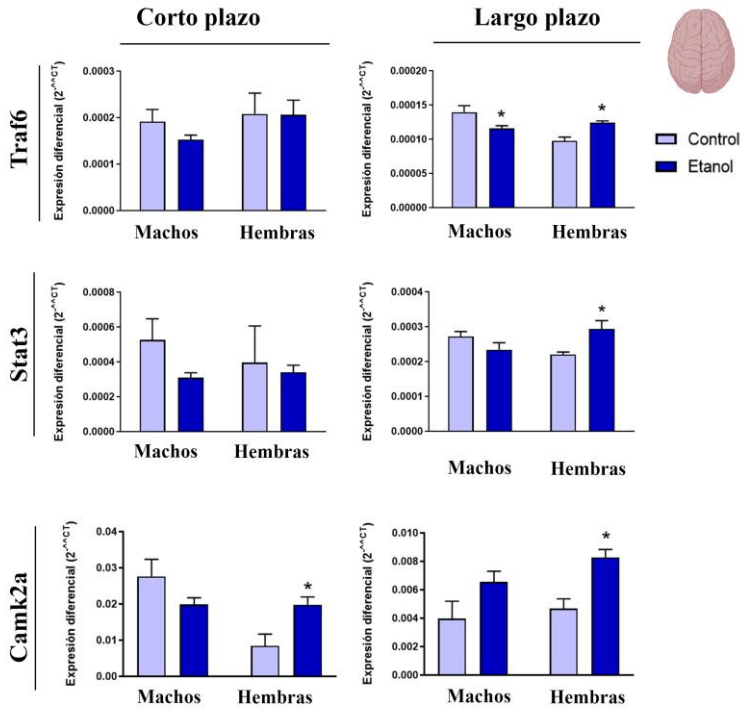


Figura 35: Efecto del etanol a corto y largo plazo en tejido cerebral y hepático de ratones WT adolescentes: papel del género (I). Análisis de la expresión génica de los 3 genes diana seleccionados en tejido cerebral de ratones WT adolescentes, machos y hembras, que recibieron un tratamiento con etanol a corto o largo plazo, junto con sus respectivos controles. Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto a la Ciclofilina A. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=6$. * $p < 0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

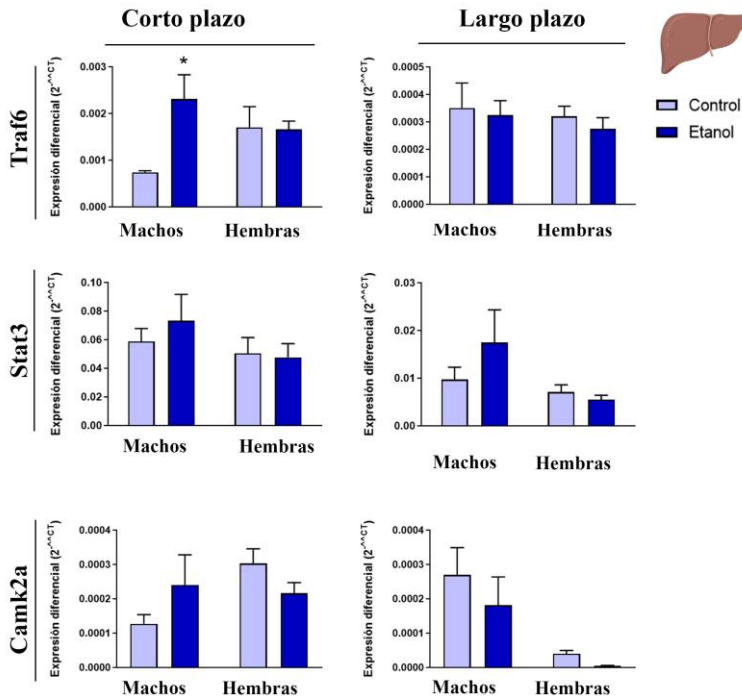


Figura 36: Efecto del etanol a corto y largo plazo en tejido cerebral y hepático de ratones WT adolescentes: papel del género (II). Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR de *Traf6*, *Stat3* y *Camk2a* en tejido hepático de los ratones citados en la Figura 35. Los datos se muestran en unidades arbitrarias, normalizados respecto a la Ciclofilina A. Los datos representados en forma de gráfica de barras corresponden a la media \pm SEM, con una $n=6$. * $p<0,05$ al ser comparados frente a su correspondiente control según un Two-way ANOVA y usando Bonferroni como post-hoc test.

Además, también se observó un aumento de los niveles de *Traf6* en el tejido hepático de los ratones macho (corto plazo) (Figura

Resultados

36). No se encontraron diferencias significativas entre el resto de comparativas. El Two-way ANOVA mostró una interacción significativa entre las variables género y tratamiento con etanol para Traf6 [F(1,16) = 13,83, p < 0,05], Stat3 [F(1,15) = 10,03, p < 0.05] y Camk2a [F(1,20) = 9,12, p < 0,05] en las cortezas cerebrales de ratones adultos (largo plazo) expuestos al etanol en la adolescencia.

5. Discusión

5.1. La administración aguda de etanol causa alteraciones en la secreción y contenido de las VEs gliales, promoviendo la expansión y el mantenimiento de la neuroinflamación, mediante la activación de MAM y TLR4

Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la exposición intermitente aguda al etanol durante la etapa adolescente causa neuroinflamación y daño cerebral, mediante la activación de la proteína TLR4^{53,54,164,165}. En el SNC, esta proteína se encuentra especialmente presente en las células de la glía, que poseen función inmunológica^{33,52}. El etanol es capaz de activar dichos receptores en las células gliales induciendo la activación de una cascada de señalización que finaliza con la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y produciendo daño neural, neurodegeneración y alteraciones cognitivas^{33,53,54,166}. La implicación del TLR4 en los efectos del alcohol se ha demostrado mediante la utilización de animales deficientes en la proteína TLR4. Tanto los estudios *in vitro*, utilizando células gliales, como los estudios *in vivo*, utilizando animales adolescentes, con genotipo TLR4-KO, mostraron que el tratamiento con etanol inducía una respuesta inmune neuroinflamatoria y un daño neural significativamente atenuado^{53,54}.

Estudios científicos recientes han puesto de manifiesto la importante participación de las VEs en la comunicación intercelular, tanto en situaciones fisiológicas como en patológicas, por ejemplo, como mediadores inflamatorios asociados a diversas neuropatologías^{99,167,168}. Aun así, el papel que cumplen las VEs de células gliales en la respuesta neuroinflamatoria inducida por el etanol y su potencial relación con la vía de señalización del TLR4 aún está por determinar. En este proyecto de tesis demostramos por primera vez que el tratamiento con etanol altera la secreción y el contenido de las VEs procedentes de astrocitos de ratones WT, aumentando el contenido relacionado con la inflamación, tanto proteico como de ARNs, mediante la señalización de TLR4 y NLRP3. También mostramos que las VEs secretadas por los astrocitos pueden ser captadas por cultivos primarios de neuronas que, tras la internalización, modifican su estado fisiológico, aumentando los niveles de algunos marcadores de inflamación, como proteínas (COX-2), ARNm (IL-1 β , Traf6, Mapk14 y Foxo3) y miARNs (mir-146a-5p) y promoviendo un ligero aumento de la apoptosis. Estos resultados apoyan la hipótesis que las VEs procedentes de las células gliales estarían ejerciendo un papel importante en la expansión y mantenimiento de la respuesta neuroinflamatoria inducida por la exposición intermitente aguda al

Discusión

etanol. Cabe destacar que ninguno de los cambios observados en estas VEs procedentes de astrocitos WT fue observado en las procedentes de astrocitos TLR4-KO, lo que pone de manifiesto el papel del TLR4 en dicho proceso.

Diversos estudios han demostrado que las células son capaces de incrementar su secreción de VEs tras la aparición de diferentes estímulos. Por ejemplo, se ha observado que el LPS es capaz de aumentar la secreción y de alterar el contenido de VEs de macrófagos^{74,169}. También se ha observado que el etanol es capaz de aumentar la secreción de VEs en monocitos humanos y células THP-1 de manera dependiente de tiempo y concentración¹⁷⁰. De forma similar, un reciente estudio ha demostrado que el etanol a dosis altas (100-200 mM) es capaz de promover una mayor liberación de VEs conteniendo complejos let7b/HMGB1 en la línea celular microglial BV2¹⁷¹. En este estudio, utilizando cultivos primarios de astrocitos, demostramos que el etanol no solo aumenta el número de VEs secretadas, sino que también altera el contenido proteico de éstos, volviéndolo más inflamatorio, con proteínas como TLR4, IL-1R, NF- κ B-p65, NLRP3 y caspasa-1. Estas proteínas son reguladores clave de la respuesta inmune innata, reconocidos PRRs, PAMPs y DAMPs. TLR4 e IL-1R inician la respuesta inmune mediante la activación de NF- κ B,

promoviendo la inducción de citoquinas y quimioquinas, mientras que NLRP3 y caspasa-1 son componentes principales del inflamasoma, que facilita el procesamiento de pro-IL-1 β a su forma activa IL-1 β ^{23,41}. Estos hallazgos apoyan resultados previos de nuestro laboratorio, que demostraron que el etanol es capaz de activar TLR4, IL-1R y la señalización por NLRP3 en cultivos de astrocitos¹⁴⁹.

En ese mismo estudio, Alfonso-Loeches y colaboradores¹⁴⁹ describieron la movilización del inflamasoma hacia mitocondrias. Años más tarde, Missiroli y colaboradores¹⁴³ describieron que el inflamasoma de NLRP3, al activarse, realmente se desplaza hacia unas regiones de contacto o “*contact sites*” llamadas MAM, situadas entre el RE en claro contacto con las mitocondrias. Se considera a MAM como una región del RE que forma conexiones reversibles con mitocondrias, y como una región con una gran importancia para la célula como plataforma de actividad enzimática, involucrada en la homeostasis del calcio, en el metabolismo lipídico y autofagia, entre otras^{133–135}. Además, recientemente se ha descrito que las MAM participan en diferentes enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o Esclerosis lateral amiotrófica^{136–138}. Nuestros resultados ponen de manifiesto que el etanol activa a MAM de una

Discusión

manera dosis dependiente, tanto en tejido cerebral como en cultivos de células microgliales.

Postulamos que esta activación de MAM podría estar vinculada con una mayor actividad esfingomielinasa, responsable del incremento de las VEs secretadas al medio de cultivo de las células tratadas con etanol. La capacidad del etanol para activar estas enzimas ya fue descrita en 2003 por Pascual y colaboradores¹⁵⁴, que observaron un incremento en los niveles de ceramida, y una mayor actividad esfingomielinasa, tras un tratamiento con etanol en cultivo primario de astrocitos, pero se desconocen los mecanismos de como el etanol puede interactuar con las MAM. Una posibilidad sería siguiendo un mecanismo parecido por el cual el etanol modifica la fluidez de las balsas lipídicas³³, ya que MAM se podría considerar como tal¹⁷²⁻¹⁷⁴. Se ha demostrado que, utilizando inhibidores de las esfingomielinasas, como es el GW4869, se bloquea la secreción de exosomas mediante la inhabilitación de la entrada de ILV en MVB¹⁵⁰. Además, se ha demostrado que las esfingomielinasas se trasladan a MAM para ejercer su actividad enzimática^{137,152,153}, pero se desconoce el papel de MAM en la liberación de VEs. Nosotros, observamos que, al tratar una línea celular de microglía con etanol e inhibidores de esfingomielinasas y MAM, el incremento en la secreción de VEs causado por el etanol se

revierte, volviendo a valores del control. Estos resultados implican que ambos componentes participan en el proceso y que su modulación por el etanol tiene un efecto directo en la liberación de VEs. Quién es responsable en última instancia de la mayor liberación de VEs, si MAM o las esfingomielinasas, y si el etanol activa MAM debido a sus características similares a las de las balsas lipídicas, son interrogantes que deberán abordarse en futuros experimentos.

La importancia de las VEs en la comunicación intercelular entre astrocitos y neuronas ha sido demostrada en los últimos años. Wang y colaboradores¹⁷⁵ descubrieron que las VEs procedentes de astrocitos eran capaces de dar protección a neuronas tras un evento de isquemia, lo que llevaba a una mejor supervivencia neuronal y a un mayor crecimiento de neuritas. De la misma manera, las VEs procedentes de astrocitos también pueden transportar proteínas mal plegadas o miARNs expresados de forma aberrante que podrían resultar patológicos e iniciar y expandir neuroinflamación y muerte neuronal¹⁷⁶. Diversos estudios han demostrado que existe una estrecha relación entre procesos de apoptosis y la liberación de VEs conteniendo miARNs relacionados con muerte celular^{177,178}. Los resultados aquí expuestos demuestran que las VEs procedentes de astrocitos WT tratados con etanol se encuentran enriquecidas en proteínas y miARNs

Discusión

relacionados con la inflamación, mecanismo que podría estar ayudando a propagar y mantener la respuesta neuroinflamatoria producida por el consumo de alcohol, desembocando en disfunción neuronal y daño cerebral.

Entre los elementos bioactivos presentes en las VEs, merece destacar el papel de los miARNs cuya función puede modificar el fenotipo celular y/o la fisiología de las células diana¹⁷⁹. Aunque la bibliografía acerca de los efectos del etanol sobre el contenido de miARNs en VEs es escasa, estudios clínicos han demostrado que el etanol es capaz de aumentar el contenido de mir-122 en VEs derivadas de hepatocitos de seres humanos¹⁸⁰. También se ha demostrado que los VEs de plasma de pacientes con hepatitis alcohólica, están enriquecidos en los miARNs mir-192 y mir-30a¹⁷⁰. La pérdida neuronal observada en las enfermedades priónicas está asociada con la acumulación de proteínas priónicas, que se ve amplificada por la acción de varios miARNs (mir-29b, mir-128a y mir-146a-5p) presentes en los exosomas liberados por otras neuronas infectadas¹⁸¹. Así mismo, niveles altos de mir-let7b se han detectado en exosomas procedentes de fluido cerebroespinal de pacientes de Alzheimer, que podrían activar la ruta del TLR7 e inducir neuroinflamación¹⁷⁷. Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que un tratamiento

crónico con etanol causa la desregulación de la familia de miARNs 182 (mir-182-5p, mir-183-5p y mir-96-5p) y de la expresión de mir-200a/b en cortezas cerebrales de ratones¹²⁴. Estos miARNs participan en la regulación de la respuesta inmune, estando mir-200b-5p/c, mir-146a-5p y mir-182-5p involucrados en la respuesta de TLR4/NF-κB y la inflamación¹⁸²⁻¹⁸⁴. En el presente estudio, mostramos que las VEs procedentes de astrocitos WT tratados con etanol presentan diferentes niveles de mir-146a-5p, mir-182-5p y mir-200b-5p, respecto a sus respectivos controles. El análisis bioinformático reveló que el mir-146a-5p y el mir-182-5p presentaban algunos genes diana en común, como Irak1, Traf6, Mapk14 y otras Map-quinasas, pertenecientes a la vía de señalización del TLR4^{27,185,186}. También aportamos evidencias de que estos miARNs, presentes en las VEs y transferidos a las neuronas, estarían regulando alguno de estos genes diana en dichas células. De hecho, Traf6 y Mapk14 se encontraron significativamente alterados en los cultivos de neuronas que se incubaron con VEs procedentes de astrocitos WT tratados con etanol, con respecto a sus controles. Cabe destacar que las neuronas incubadas con VEs procedente de astrocitos TLR4-KO (controles o tratados con etanol) no sufrieron ningún tipo de cambio significativo. Estos resultados sugieren que el etanol podría promover cambios en los niveles de los

miARNs presentes en las VEs de astrocitos, y que su transferencia a neuronas podría aumentar la expresión de genes y proteínas relacionadas con la inflamación, lo que podría derivar en daño y muerte neuronal. Además, nuestros resultados demuestran que los cambios observados dependen de la activación de los receptores TLR4, ya que la eliminación de este receptor revierte gran parte de los cambios moleculares asociados con la neuroinflamación.

5.2. Diferencias de género en el perfil de miARNs en VEs circulantes en adolescentes y su posible papel como biomarcadores de daño cerebral

Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que las mujeres adolescentes son más vulnerables que los hombres a los efectos inflamatorios producidos por la IEA, ya que con BALs equivalentes, las mujeres presentan una mayor expresión del gen TLR4 y mayores niveles de citoquinas y quimioquinas en plasma que los hombres⁵⁶. Basándonos en nuestros resultados previos que indican el papel de las VEs en la expansión de la respuesta neuroinflamatoria inducida por el etanol, y teniendo en cuenta la alta estabilidad de las VEs y los miARNs en circulación^{159,187}, nos propusimos analizar si una exposición aguda al etanol podría afectar de forma diferente al perfil

de miARNs presentes en VEs de plasma de adolescentes, y si estas VEs podrían ser utilizadas como posibles biomarcadores de daño cerebral causado por IEA. En el presente proyecto demostramos que, tanto en humanos como en ratones, las mujeres/hembras adolescentes presentan menores niveles de miARNs anti-inflamatorios (mir-146a-5p, mir-21-5p y mir-182-5p) en las VEs de plasma tras el tratamiento de alcohol que los hombres/machos. También mostramos que, en las cortezas cerebrales de las hembras adolescentes de ratón, hay menores niveles de expresión de éstos miARNs y mayores niveles de expresión de sus genes diana (Traf6, Stat3 y Camk2a), en comparación con sus respectivos controles. En contraposición, los machos presentaron una dinámica opuesta, con mayores niveles de los miARNs y menores niveles de sus genes diana. Estos resultados sugieren que los miARNs de las VEs podrían ser buenos candidatos como biomarcadores de la neuroinflamación inducida por el alcohol en la adolescencia.

En la última década, se ha sugerido que los miARNs circulantes en plasma o suero podrían utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades. Sin embargo, su uso como tales se encuentra limitado por sus bajas concentraciones en dichos fluidos y por la dificultad de identificar el origen de dichos miARNs¹⁸⁸. No obstante, los miARNs presentes en las VEs podrían, por una parte

Discusión

concentrarse en éstos y, por otra dar mayor información acerca del origen celular del mismo¹⁸⁹. De hecho, nuestros resultados revelan que uno de los miARNs de estudio, el mir-182-5p, se encontraba exclusivamente en las VEs y no se pudo detectar en forma libre en el plasma. Respecto al resto de miARNs (mir-146a-5p, mir-21-5p y mir-183-5p) se pudieron detectar tanto asociados a VEs como en forma libre.

Diferentes estudios correlacionan la sobreexpresión de ciertos miARNs con una reducción del sistema inmune. De hecho, se ha visto que el mir-146a-5p modula de forma negativa la adhesión de las células T y bloquea la activación de macrófagos M1 mediante la inhibición de la ruta de NF- κ B¹⁹⁰, lo que podría utilizarse como una estrategia terapéutica en algunas enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson, el Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica¹⁹⁰⁻¹⁹². Un estudio reciente ha demostrado que la incubación de mir-182-5p con células tratadas con LPS disminuye la liberación de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-1 β y TNF- α ¹⁵⁷. También se ha analizado la función de mir-21-5p en los procesos inflamatorios que promueven la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por macrófagos¹²¹, y su papel antiinflamatorio mediante su acción sobre genes diana como PTEN, BCL2, IL-12 y STAT3, entre otros^{156,161}.

En nuestro estudio observamos que las mujeres/hembras adolescentes presentaban menores niveles de estos miARNs en circulación. Estos resultados podrían sugerir que las hembras son más vulnerables que los machos a los efectos inflamatorios derivados del consumo de alcohol, puesto que tendrían una menor regulación negativa de rutas inflamatorias. En otros estudios en humanos se ha observado que las mujeres adolescentes presentan mayores niveles de moléculas inflamatorias en el plasma que los hombres^{56,193}, lo que podría estar relacionado con una alteración en los procesos de memoria y funciones ejecutivas¹⁹³. Utilizando nuestro modelo experimental de dosis intermitentes de alcohol durante 14 días en ratones WT y TLR4-KO, observamos resultados similares a los obtenidos en humanos. Las hembras que habían sido tratadas con etanol presentaban unos niveles menores de miARNs en las VEs circulantes (mir-146a-5p y mir-21-5p) con respecto a sus controles, mientras que los machos presentaban mayores niveles de estos miARNs cuando eran expuestos al etanol. Además, es importante resaltar que estas variaciones no se observaron cuando se analizaron las muestras procedentes de los ratones TLR4-KO, sugiriendo la implicación y participación de la respuesta del receptor TLR4 en estos efectos. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado la capacidad del alcohol para activar la vía

Discusión

de señalización del TLR4 en células gliales^{53,149}, dando lugar a una respuesta neuroinflamatoria y daño neuronal en animales adolescentes con dosis elevadas de alcohol, similares a las que se observan en humanos con “*binge drinking*”^{54,56}. Teniendo en cuenta además, los resultados discutidos en el apartado anterior, donde observamos un cambio en el contenido y secreción de las VEs de astrocitos al ser tratados con etanol, y debido a la capacidad de las VEs de atravesar la BBB, se puede considerar a las VEs como unos buenos candidatos a biomarcadores del daño cerebral y de la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol. Un ejemplo del potencial diagnóstico de las VEs se describe en el estudio llevado a cabo por Siegel y colaboradores¹²², donde se pudo diferenciar una desregulación de diversos miARNs asociados a VEs entre pacientes de esclerosis múltiple y controles sanos. También se ha demostrado que las VEs circulantes en plasma de pacientes con Alzheimer llevan una combinación de miARNs que se podría utilizar como una herramienta para un diagnóstico temprano de la enfermedad¹⁹⁴. En el presente estudio se muestra que los cambios observados en los perfiles de miARNs presentes en las VEs de plasma de ratones adolescentes se mantienen en las cortezas cerebrales de estos animales 2 semanas después de la última administración. El tejido hepático presenta

mayores cambios a corto plazo y se estabiliza a las 2 semanas sin nuevas administraciones.

La utilización de herramientas bioinformáticas en este estudio nos sirvió para determinar los genes diana que tenían en común mir-146a-5p y mir-21-5p, y que estaban involucrados en las rutas de señalización de TLR4 e IL-1R. Entre los genes diana obtenidos, seleccionamos Traf6 y Camk2a por estar asociados con la respuesta inflamatoria y la activación del TLR4 e IL-1R^{155,195} y Stat3 como representante del estado de la ruta de JAK/STAT¹⁶⁰. Traf6 es uno de los componentes principales de dichas rutas de señalización, mientras que Camk2a es una quinasa dependiente de calcio, que se encuentra relacionada con la inflamación mediante la activación de p-TAK, p-JNK y el inflamasoma de NLRP3^{163,195}. Se ha observado que Stat3 es esencial para la producción de citoquinas y la reprogramación metabólica tras la activación de la ruta del TLR4 por LPS¹⁹⁶. La expresión de estos miARNs y sus genes diana en las cortezas cerebrales de los ratones tratados con etanol podría actuar como activador de una respuesta inflamatoria en las células gliales, promoviendo la liberación de citoquinas y quimioquinas inflamatorias al medio extracelular y al corriente sanguíneo. Además, el contenido proinflamatorio de las VEs podría propagar y mantener la neuroinflamación a lo largo del tiempo,

Discusión

causando daño cerebral y efectos perjudiciales a largo plazo, así como trastornos cognitivos y comportamentales^{54,55}. De hecho, en un estudio reciente en el que se administró plasma de ratones tratados con LPS a ratones sin tratamiento, se observó que éste era capaz de activar a las células de la glía y de incrementar en el cerebro los niveles de citoquinas proinflamatorias y del miARN proinflamatorio mir-155¹⁹⁷. Al analizar los niveles de estos genes diana (Traf6, Stat3 y Camk2a) en las cortezas cerebrales e hígados de ratones adolescentes (corto plazo) y jóvenes adultos (largo plazo), observamos un paralelismo con lo que ya habíamos visto en los niveles de los miARNs estudiados (mir-146a-5p y mir-21-5p) en plasma. Aunque a corto plazo no se observaban cambios significativos, en los animales adultos (largo plazo), observamos un aumento de estos genes proinflamatorios en las cortezas cerebrales de las hembras, en comparación con su control, mientras que en los machos éstos disminuyen, excepto Camk2a que aumentaba en ambos géneros. Estos resultados apoyan el hecho que el etanol afecta de manera diferente según el género del individuo, y sugieren que las hembras son más vulnerables a la inflamación producida por el tratamiento de alcohol que los machos. Además, estos resultados también ponen de manifiesto que los miARNs presentes en

las VEs podrían ser posibles biomarcadores de la neuroinflamación y del daño cerebral causado por la IEA.

6. Conclusiones

1. Demostramos que la exposición al etanol (50 mM) es capaz de aumentar la secreción de VEs en cultivos primarios de astrocitos corticales WT. Además, la exposición al etanol también produce cambios en el contenido proteico y de miARNs relacionados con la inflamación en estos VEs.
2. Por el contrario, la administración de etanol (50 mM) a cultivos primarios de astrocitos TLR4-KO no afectó, ni en la cantidad de VEs liberadas por las células ni en su contenido proteico y de miARNs, al compararse con células no expuestas al etanol. Estos resultados demuestran el papel del TLR4 en estos procesos.
3. Las VEs aisladas de estos cultivos primarios de astrocitos son capaces de ser internalizadas por neuronas corticales en cultivo primario, induciendo un aumento de moléculas proinflamatorias en las neuronas y promoviendo daño neuronal.
4. Demostramos que dosis de etanol de 50 y 100 mM son capaces de activar MAM, y que dicha activación podría estar involucrada en una mayor actividad esfingomielinasa, que explicaría la mayor liberación de VEs producida en las células astrogiales tratadas con etanol.

Conclusiones

5. La exposición intermitente aguda al etanol produce cambios en los perfiles de expresión de miARNs relacionados con la inflamación en las VEs de plasma de individuos y animales adolescentes, siendo las mujeres/hembras las más vulnerables a los efectos del alcohol.

6. Los cambios observados en las VEs plasmáticas, también se observan a largo plazo en la corteza cerebral de los ratones, presentando las hembras mayores niveles de moléculas proinflamatorias que los machos, tras una exposición intermitente al etanol. Estos resultados sugieren que los miARNs plasmáticos podrían servir como biomarcadores de neuroinflamación

Los resultados aquí expuestos demuestran el importante papel de las VEs en el mantenimiento y propagación de la neuroinflamación causada por el etanol, tanto a nivel cerebral como circulante, y la influencia del género y del TLR4 en la respuesta inmune innata producida.

7. Bibliografía

Bibliografía

1. Gimsa U, Mitchison NA, Brunner-Weinzierl MC. Immune privilege as an intrinsic CNS property: Astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:320519.
2. Polyzoidis S, Koletsis T, Panagiotidou S, Ashkan K, Theoharides TC. Mast cells in meningiomas and brain inflammation. *J Neuroinflammation.* 2015;12:170.
3. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron.* 2017;95(6):1246-1265.
4. Talbot S, Foster SL, Woolf CJ. Neuroimmunity: Physiology and Pathology. *Annu Rev Immunol.* 2016;34(1):421-447.
5. Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011;25(2):181-213.
6. Ben Menachem-Zidon O, Avital A, Ben-Menahem Y, et al. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain Behav Immun.* 2011;25(5):1008-1016.
7. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 2006;9(2):268-275.
8. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):42.
9. Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia.* 2001;36(2):145-155.
10. Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2(12):679-689.
11. Dietrich PY, Walker PR, Saas P. Death receptors on reactive astrocytes: A key role in the fine tuning of brain inflammation? *Neurology.* 2003;60(4):548-554.
12. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435.

13. Patel HC, Boutin H, Allan SM. Interleukin-1 in the brain: Mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;992:39-47.
14. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: Helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):331-338.
15. Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1995;132(2):172-179.
16. Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ, Li R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid β peptide. *Glia.* 2002;40(2):260-269.
17. L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, et al. Targeting Wnt signaling at the neuroimmune interface for dopaminergic neuroprotection/repair in Parkinson's disease. *J Mol Cell Biol.* 2014;6(1):13-26.
18. Sun YY, Zhang Y, Sun XP, et al. Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) expression in reactive astrocytes in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(2):164-176.
19. Nagai M, Re DB, Nagata T, et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci.* 2007;10(5):615-622.
20. Di Giorgio FP, Carrasco MA, Siao MC, Maniatis T, Eggan K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci.* 2007;10(5):608-614.
21. Rogers TJ. The molecular basis for neuroimmune receptor signaling. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(4):722-724.
22. Herwald H, Egesten A. On PAMPs and DAMPs. *J Innate Immun.* 2016;8(5):427-428.
23. Kanneganti TD. The inflammasome: Firing up innate immunity. *Immunol Rev.* 2015;265(1):1-5.
24. Anderson K V., Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic

Bibliografía

- studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. 1985;42(3):779-789.
25. Nie L, Cai S-Y, Shao J-Z, Chen J. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. *Front Immunol*. 2018;9:1523.
 26. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388(6640):394-397.
 27. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*. 2018;59:391-412.
 28. Zheng C, Chen J, Chu F, Zhu J, Jin T. Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2020;12:314.
 29. Yang Y, Zhou H, Yang Y, et al. Lipopolysaccharide (LPS) regulates TLR4 signal transduction in nasopharynx epithelial cell line 5-8F via NFκB and MAPKs signaling pathways. *Mol Immunol*. 2007;44(5):984-992.
 30. Yang QW, Lu FL, Zhou Y, et al. HMBG1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(2):593-605.
 31. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*. 2002;3(7):667-672.
 32. Kim HM, Park BS, Kim JI, et al. Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell*. 2007;130(5):906-917.
 33. Blanco AM, Perez-Arago A, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C. Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J Neurochem*. 2008;106(2):625-639.
 34. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 2010;327(5961):46-50.
 35. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor

- domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2003;171(8):4304-4310.
36. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014;5(9):461.
37. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity.* 2011;34(5):637-650.
38. Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Leza JC, Moro MA, Lizasoain I. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke.* 2008;39(4):1314-1320.
39. Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85(4):143-156.
40. Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J Leukoc Biol.* 2016;100(1):27-45.
41. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol.* 2016;213(6):617-629.
42. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell.* 2016;165(4):792-800.
43. de Torre-Minguela C, del Castillo PM, Pelegrín P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Front Immunol.* 2017;8:43.
44. Próchnicki T, Mangan MS, Latz E. Recent insights into the molecular mechanisms of the NLRP3 inflammasome activation. *F1000Research.* 2016;5:1469.
45. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and depression: Microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Front Cell Neurosci.* 2015;9(12):1-

- 20.
46. Guo H, Callaway JB, Ting JPY. Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015;21(7):677-687.
47. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):128.
48. Wani K, Alharthi H, Alghamdi A, Sabico S, Al-Daghri NM. Role of NLRP3 inflammasome activation in obesity-mediated metabolic disorders. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(2):1-21.
49. Gora IM, Ciechanowska A, Ladyzynski P. NLRP3 Inflammasome at the Interface of Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Type 2 Diabetes. *Cells*. 2021;10(2):314.
50. Saresella M, La Rosa F, Piancone F, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2016;11(1).
51. Snouwaert JN, Nguyen MT, Repenning PW, et al. An NLRP3 Mutation Causes Arthropathy and Osteoporosis in Humanized Mice. *Cell Rep*. 2016;17(11):3077-3088.
52. Blanco AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C. Involvement of TLR4/Type I IL-1 Receptor Signaling in the Induction of Inflammatory Mediators and Cell Death Induced by Ethanol in Cultured Astrocytes. *J Immunol*. 2005;175(10):6893-6899.
53. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical Role of TLR4 Response in the Activation of Microglia Induced by Ethanol. *J Immunol*. 2009;183(7):4733-4744.
54. Montesinos J, Pascual M, Pla A, et al. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun*. 2015;45:233-244.
55. Montesinos J, Pascual M, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Guerri C. Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain Behav Immun*. 2016;53:159-171.

56. Pascual M, Montesinos J, Marcos M, et al. Gender differences in the inflammatory cytokine and chemokine profiles induced by binge ethanol drinking in adolescence. *Addict Biol.* 2017;22(6):1829-1841.
57. Montesinos J, Alfonso-Loeches S, Guerri C. Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(11):2260-2270.
58. ESTUDES. Encuesta sobre uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias en España, 1994-2018. Delegación del gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Política Social. Gobierno de España.
59. WHO. World Health Organization. Global Strategy to Reduce Harmful Use of Alcohol. *WHO*. Published online 2010.
60. Danielsson AK, Wennberg P, Hibell B, Romelsjö A. Alcohol use, heavy episodic drinking and subsequent problems among adolescents in 23 European countries: Does the prevention paradox apply? *Addiction.* 2012;107(1):71-80.
61. Casey BJ, Jones RM, Hare TA. The adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1124:111-126.
62. Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007;86(2):189-199.
63. Yang Y, Raine A. Prefrontal structural and functional brain imaging findings in antisocial, violent, and psychopathic individuals: A meta-analysis. *Psychiatry Res - Neuroimaging.* 2009;174(2):81-88.
64. Casey BJ. Beyond simple models of self-control to circuit-based accounts of adolescent behavior. *Annu Rev Psychol.* 2015;66:295-319.
65. Lebedev MA, Messinger A, Kralik JD, Wise SP. Representation of attended versus remembered locations in prefrontal cortex. *PLoS Biol.* 2004;2(11):e365.
66. Squeglia LM, Pulido C, Wetherill RR, Jacobus J, Brown GG, Tapert SF. Brain response to working memory over three years of adolescence: Influence of initiating heavy drinking. *J Stud*

- Alcohol Drugs*. 2012;73(5):749-760.
67. Hermos JA, Winter MR, Heeren TC, Hingson RW. Early age-of-onset drinking predicts prescription drug misuse among teenagers and young adults: Results from a national survey. *J Addict Med*. 2008;2(1):22-30.
 68. Luarte A, Cisternas P, Caviedes A, et al. Astrocytes at the Hub of the Stress Response: Potential Modulation of Neurogenesis by miRNAs in Astrocyte-Derived Exosomes. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1719050.
 69. Rashed MH, Bayraktar E, Helal GK, et al. Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets. *Int J Mol Sci*. 2017;18:538.
 70. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301-312.
 71. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012;64(3):676-705.
 72. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967-978.
 73. Fröhlich D, Kuo WP, Frühbeis C, et al. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014;369(1652):20130510.
 74. McDonald MK, Tian Y, Qureshi RA, et al. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. *Pain*. 2014;155(8):1527-1539.
 75. Adolf A, Rohrbeck A, Münster-Wandowski A, et al. Release of astroglial vimentin by extracellular vesicles: Modulation of binding and internalization of C3 transferase in astrocytes and neurons. *Glia*. 2019;67(4):703-717.
 76. Lewis S. Glia: Transporting cargo from A to B. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(9):589.
 77. Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular body morphogenesis.

- Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:337-362.
78. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):193-208.
 79. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:1-29.
 80. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol.* 2014;5:442.
 81. Clayton A, Mason MD. Exosomes in Tumour Immunity. *Curr Oncol.* 2009;16(3):46-49.
 82. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841(1):108-120.
 83. Subra C, Grand D, Laulagnier K, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res.* 2010;51(8):2105-2120.
 84. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.
 85. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 2008;10(12):1470-1476.
 86. Pegtel DM, Peferoen L, Amor S. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2014;369(1652):20130516.
 87. Hu G, Yao H, Chaudhuri AD, et al. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated Neuronal dysfunction. *Cell Death Dis.* 2012;3(8):e381-e381.

Bibliografía

88. Morel L, Regan M, Higashimori H, et al. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *J Biol Chem.* 2013;288(10):7105-7116.
89. Gayen M, Bhomia M, Balakathiresan N, Knollmann-Ritschel B. Exosomal microRNAs released by activated astrocytes as potential neuroinflammatory biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2312.
90. Johnstone RM. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem Cell Biol.* 1992;70(3-4):179-190.
91. Rajendran L, Bali J, Barr MM, et al. Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. *J Neurosci.* 2014;34(46):15482-15489.
92. Balusu S, Van Wonterghem E, De Rycke R, et al. Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. *EMBO Mol Med.* 2016;8(10):1162-1183.
93. Pascual M, Ibáñez F, Guerri C. Exosomes as mediators of neuron–glia communication in neuroinflammation. *Neural Regen Res.* 2020;15(5):796-801.
94. Bavisotto CC, Scalia F, Gammazza AM, et al. Extracellular vesicle-mediated cell–cell communication in the nervous system: Focus on neurological diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):434.
95. Guitart K, Loers G, Buck F, Bork U, Schachner M, Kleene R. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia.* 2016;64(6):896-910.
96. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte–neuron communication. *PLoS Biol.* 2013;11(7):e1001604.
97. Antonucci F, Turola E, Riganti L, et al. Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *EMBO J.* 2012;31(5):1231-1240.

98. Paolicelli RC, Bergamini G, Rajendran L. Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience*. 2019;405:148-157.
99. Gupta A, Pulliam L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2014;11:68.
100. de Rivero Vaccari JP, Brand F, Adamczak S, et al. Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *J Neurochem*. 2016;136 Suppl(1):39-48.
101. Lee HJ, Suk JE, Patrick C, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem*. 2010;285(12):9262-9272.
102. Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, et al. Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11172-11177.
103. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y. Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- β by Microglia. *J Biol Chem*. 2012;287(14):10977-10989.
104. Dinkins MB, Dasgupta S, Wang G, Zhu G, Bieberich E. Exosome reduction invivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35(8):1792-1800.
105. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
106. Ruvkun G. Molecular biology: Glimpses of a tiny RNA world. *Science*. 2001;294(5543):797-799.
107. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-524.
108. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136(4):642-655.
109. Yoda M, Cifuentes D, Izumi N, et al. Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of argonaute2-cleaved precursor micrornas. *Cell Rep*. 2013;5(3):715-726.

Bibliografía

110. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol.* 2005;7(6):633-636.
111. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* 2005;7(7):719-723.
112. Piva R, Spandidos DA, Gambari R. From microRNA functions to microRNA therapeutics: Novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment. *Int J Oncol.* 2013;43(4):985-994.
113. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5451-5465.
114. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res.* 2011;157(4):163-179.
115. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-297.
116. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15-20.
117. Li M, Marin-Muller C, Bharadwaj U, Chow KH, Yao Q, Chen C. MicroRNAs: Control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg.* 2009;33(4):667-684.
118. Foshay K, Gallicano G. Small RNAs, Big Potential: The Role of MicroRNAs in Stem Cell Function. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;2(4):264-271.
119. Coolen M, Bally-Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol.* 2009;19(5):461-470.
120. Patel N, Hoang D, Miller N, et al. MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol Neurodegener.* 2008;3(1):10.
121. Slota JA, Booth SA. MicroRNAs in neuroinflammation: Implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. *Non-coding RNA.* 2019;5(2):35.

122. Siegel SR, MacKenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. *Mol Biol Rep.* 2012;39(5):6219-6225.
123. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, De La Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(20):7269-7274.
124. Ureña-Peralta JR, Alfonso-Loeches S, Cuesta-Diaz CM, García-García F, Guerri C. Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex. *Sci Rep.* 2018;8(1):15913.
125. Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiopathological Implications. *Antioxidants Redox Signal.* 2015;22(12):995-1019.
126. Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841(4):595-609.
127. Raturi A, Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(1):213-224.
128. Vance JE. Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria. *J Biol Chem.* 1990;265(13):7248-7256.
129. Montesinos J, Area-Gomez E, Schlame M. *Analysis of Phospholipid Synthesis in Mitochondria.* Vol 155. 1st ed. Elsevier Inc.; 2020.
130. Lewis A, Tsai SY, Su TP. Detection of isolated mitochondria-associated ER membranes using the sigma-1 receptor. *Methods Mol Biol.* 2016;1376:133-140.
131. Area-Gomez E, De Groof AJC, Boldogh I, et al. Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am J Pathol.* 2009;175(5):1810-1816.

Bibliografía

132. Annunziata I, Sano R, D'Azzo A. Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and lysosomal storage diseases. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):1-16.
133. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 2013;495(7441):389-393.
134. Verfaillie T, Rubio N, Garg AD, et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012;19(11):1880-1891.
135. van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843(10):2253-2262.
136. Krols M, van Isterdael G, Asselbergh B, et al. Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2016;131(4):505-523.
137. Pera M, Larrea D, Guardia-Laguarta C, et al. Increased localization of APP -C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *EMBO J.* 2017;36(22):3356-3371.
138. Schon EA, Area-Gomez E. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Mol Cell Neurosci.* 2013;55:26-36.
139. Area-Gomez E, del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* 2012;31(21):4106-4123.
140. Calì T, Ottolini D, Negro A, Brini M. α -synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J Biol Chem.* 2012;287(22):17914-17929.
141. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5523-5528.

142. Bernard-Marissal N, Chrast R, Schneider BL. Endoplasmic reticulum and mitochondria in diseases of motor and sensory neurons: A broken relationship? *Cell Death Dis.* 2018;9(3):333.
143. Missiroli S, Patergnani S, Caroccia N, et al. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):329.
144. Menck K, Sönmezer C, Worst TS, et al. Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane. *J Extracell Vesicles.* 2017;6(1):1378056.
145. Jiang M, Huang S, Duan W, Liu Q, Lei M. Inhibition of acid sphingomyelinase activity ameliorates endothelial dysfunction in db/db mice. *Biosci Rep.* 2019;39(4).
146. Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, et al. Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia.* 2016;59(3):614-623.
147. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-159.
148. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
149. Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:216.
150. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008;319(5867):1244-1247.
151. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micromRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem.* 2013;288(15):10849-10859.
152. Montesinos J, Pera M, Larrea D, et al. The Alzheimer's disease-

- associated C99 fragment of APP regulates cellular cholesterol trafficking. *EMBO J.* 2020;39(20).
153. Mignard V, Dubois N, Lanoé D, et al. Sphingolipids distribution at Mitochondria-Associated Membranes (MAM) upon induction of apoptosis. *J Lipid Res.* 2020;61(7):1025-1037.
 154. Pascual M, Valles SL, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *J Neurochem.* 2003;87(6):1535-1545.
 155. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nat Commun.* 2015;6:7321.
 156. Buscaglia LEB, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer.* 2011;30(6):371-380.
 157. Zhu M, Li Y, Sun K. MicroRNA-182-5p inhibits inflammation in LPS-treated RAW264.7 cells by mediating the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(12):5725-5734.
 158. Li X, Kroin JS, Kc R, et al. Altered spinal MicroRNA-146a and the microRNA-183 cluster contribute to osteoarthritic pain in knee joints. *J Bone Miner Res.* 2013;28(12):2512-2522.
 159. Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of MicroRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):186-192.
 160. Gao P, Niu N, Wei T, et al. The roles of signal transducer and activator of transcription factor 3 in tumor angiogenesis. *Oncotarget.* 2017;8(40):69139-69161.
 161. Sen CK, Roy S. MicroRNA 21 in tissue injury and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2012;96(2):230-233.
 162. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):798-809.
 163. Zhou K, Enkhjargal B, Xie Z, et al. Dihydrolipoic acid inhibits lysosomal rupture and NLRP3 through lysosome-associated membrane Protein-1/ Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II/TAK1 pathways after subarachnoid hemorrhage in

- rat. *Stroke*. 2018;49(1):175-183.
164. Pascual M, Fernández-Lizarbe S, Guerri C. Role of TLR4 in ethanol effects on innate and adaptive immune responses in peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(6):716-727.
165. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage. *J Neurosci*. 2010;30(24):8285-8295.
166. Vallés SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol*. 2004;14(4):365-371.
167. Basso M, Bonetto V. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. *Front Neurosci*. 2016;10:127.
168. Howitt J, Hill AF. Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem*. 2016;291(52):26589-26597.
169. Li ZG, Scott MJ, Brzóška T, et al. Lung epithelial cell-derived IL-25 negatively regulates LPS-induced exosome release from macrophages. *Mil Med Res*. 2018;5(1):1-11.
170. Momen-Heravi F, Saha B, Kodys K, Catalano D, Satishchandran A, Szabo G. Increased number of circulating exosomes and their microRNA cargos are potential novel biomarkers in alcoholic hepatitis. *J Transl Med*. 2015;13(1):1-13.
171. Coleman LG, Maile R, Jones SW, Cairns BA, Crews FT. HMGB1/IL-1 β complexes in plasma microvesicles modulate immune responses to burn injury. *PLoS One*. 2018;13(3):1-23.
172. Area-Gomez E, Schon EA. On the pathogenesis of Alzheimer's Disease: The MAM hypothesis. *FASEB J*. 2017;31(3):864-867.
173. Manganelli V, Matarrese P, Antonioli M, et al. Raft-like lipid microdomains drive autophagy initiation via AMBRA1-ERLIN1 molecular association within MAMs. *Autophagy*. Published online 2020:1-21.
174. Sorice M, Mattei V, Matarrese P, et al. Dynamics of

- mitochondrial raft-like microdomains in cell life and death. *Commun Integr Biol.* 2012;5(2):217-219.
175. Wang S, Cesca F, Loers G, et al. Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. *J Neurosci.* 2011;31(20):7275-7290.
176. Wang G, Dinkins M, He Q, et al. Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and Prostate Apoptosis Response 4 (PAR-4): Potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer Disease (AD). *J Biol Chem.* 2012;287(25):21384-21395.
177. Lehmann SM, Krüger C, Park B, et al. An unconventional role for miRNA: Let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2012;15(6):827-835.
178. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, et al. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ.* 2008;15(11):1723-1733.
179. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015;25(6):364-372.
180. Momen-Heravi F, Bala S, Kodys K, Szabo G. Exosomes derived from alcohol-treated hepatocytes horizontally transfer liver specific miRNA-122 and sensitize monocytes to LPS. *Sci Rep.* 2015;5:1-16.
181. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(21):10937-10949.
182. Wendlandt EB, Graff JW, Gioannini TL, McCaffrey AP, Wilson ME. The role of MicroRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF- κ B activation. *Innate Immun.* 2012;18(6):846-855.
183. Blaya D, Coll M, Rodrigo-Torres D, et al. Integrative microRNA profiling in alcoholic hepatitis reveals a role for

- microRNA-182 in liver injury and inflammation. *Gut*. 2016;65(9):1535-1545.
184. Lee HM, Kim TS, Jo EK. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Rep*. 2016;49(6):311-318.
185. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1999;274(16):10689-10692.
186. Sheedy FJ, Palsson-Mcdermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 2010;11(2):141-147.
187. Sanz-Rubio D, Martin-Burriel I, Gil A, et al. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects article. *Sci Rep*. 2018;8(1).
188. Huang M, Gonzalez RR, Lillard J, Bond VC. Secretion modification region-derived peptide blocks exosome release and mediates cell cycle arrest in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(7):11302-11315.
189. Zhou X, Jiao Z, Ji J, et al. Characterization of mouse serum exosomal small RNA content: The origins and their roles in modulating inflammatory response. *Oncotarget*. 2017;8(26):42712-42727.
190. Cui JG, Li YY, Zhao Y, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Differential regulation of Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF- κ B in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010;285(50):38951-38960.
191. He X, Tang R, Sun Y, et al. MicroR-146 blocks the activation of M1 macrophage by targeting signal transducer and activator of transcription 1 in hepatic schistosomiasis. *EBioMedicine*. 2016;13:339-347.
192. Wu D, Cerutti C, Lopez-Ramirez MA, et al. Brain endothelial miR-146a negatively modulates T-cell adhesion through repressing multiple targets to inhibit NF- κ B activation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(3):412-423.

Bibliografía

193. Orio L, Antón M, Rodríguez-Rojo IC, et al. Young alcohol binge drinkers have elevated blood endotoxin, peripheral inflammation and low cortisol levels: neuropsychological correlations in women. *Addict Biol.* 2018;23(5):1130-1144.
194. Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y, Wang PC. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers. *Biomed Environ Sci.* 2018;31(2):87-96.
195. Sadler AJ, Suliman BA, Yu L, et al. The acetyltransferase HAT1 moderates the NF- κ B response by regulating the transcription factor PLZF. *Nat Commun.* 2015;6:6795.
196. Balic JJ, Albargy H, Luu K, et al. STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 β expression. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-11.
197. Li JJ, Wang B, Kodali MC, et al. In vivo evidence for the contribution of peripheral circulating inflammatory exosomes to neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):8.

8. Anexos

Anexos

Tabla 4. Lista de dianas de mmu-mir-146a-5p, mmu-mir-182-5p y mmu-mir-200b-5p obtenidas mediante la aplicación web mirnet.ca.

Dianas de mmu-miR-146a-5p	Dianas de mmu-miR-182-5p	Dianas de mmu-miR-200b-5p
Relb	Foxq1	Pkib
Tnni1	Ikzf1	Hist1h1d
IRAK1	Slc14a2	Cradd
RNF11	Srrm1	Plxnc1
Ndor1	Jkamp	Rnf166
Rsad2	Clic5	Sh2d4a
Sgk3	Zfp287	Rassf10
Gpr157	Phc3	Ddx26b
Camk2a	Adcy6	Mphosph9
Cd93	Bicd1	Fhod1
Notch1	Fbxw7	Zfp459
Ifng	Fndc3b	Pkd1
Stat1	Chst1	St3gal2
Mllt3	Foxo3	Bmi1
Irak1	Gabra1	Bri3bp
Nos2	Tbx1	Foxn3
Irak2		Dcx

Nrp2	Flt1
Map1b	Mapk14
Med1	Mgat3
Traf6	Ikzf5
Slc47a1	Rdh10
	Mtf2
	Pafah1b1
	Senp5
	Ogfod1
	Zfpm2
	Zeb2

Anexos

Tabla 5. Rutas KEGG derivadas de la red de interacción proteica entre las dianas conjuntas de mmu-mir-146a-5p y mmu-mir-182-5p, por STRING.

ID de la ruta	Descripción de la ruta	count in gene set	false discovery rate
05140	Leishmaniasis	5	8.54e-07
05152	Tuberculosis	6	1.14e-06
05145	Toxoplasmosis	5	4.87e-06
05142	Chagas disease	4	0.000155
04380	Osteoclast differentiation	4	0.000253
05162	Measles	4	0.000334
05169	Epstein-Barr virus infection	4	0.00122
05133	Pertussis	3	0.00134
04064	NF-kappa B signaling pathway	3	0.00241
04620	Toll-like receptor signaling pathway	3	0.00297
04722	Neurotrophin signaling pathway	3	0.00404
04919	Thyroid hormone signaling pathway	3	0.00404
05164	Influenza A	3	0.0105
05168	Herpes simplex infection	3	0.0153
05321	Inflammatory bowel disease (IBD)	2	0.0248
05132	Salmonella infection	2	0.0418

04210	Apoptosis	2	0.0423
05222	Small cell lung cancer	2	0.044
05200	Pathways in cancer	3	0.0455

Tabla 6 Listado de rutas KEGG para *mmu-mir-146a-5p*, *mmu-mir-182-5p* y *mmu-mir-200b-5p*, obtenidas mediante la herramienta DIANA

KEGG pathway <i>mmu-miR-146a</i>	p-value	-LOG(p-value)	Núm. de genes
<i>Prion diseases (mmu05020)</i>	1,05949E-39	38,97490314	1
<i>NF-kappa B signaling pathway (mmu04064)</i>	0,0038	2,420216403	4
<i>ErbB signaling pathway (mmu04012)</i>	0,004302628	2,366266201	5
<i>Thyroid cancer (mmu05216)</i>	0,000364423	3,438393744	2
<i>Neurotrophin signaling pathway (mmu04722)</i>	0,000393469	3,405089258	5
<i>Toll-like receptor signaling pathway (mmu04620)</i>	0,001864658	2,729400811	3
<i>T cell receptor signaling pathway (mmu04660)</i>	0,001864658	2,729400811	5
<i>B cell receptor signaling pathway (mmu04662)</i>	0,00342841	2,464907247	4
<i>Chronic leukemia (mmu05220)</i>	0,00342841	2,464907247	4
<i>Acute leukemia (mmu05221)</i>	0,00342841	2,464907247	3

<i>ECM-receptor interaction (mmu04512)</i>	0,003975528	2,400605183	2
<i>Small cell lung cancer (mmu05222)</i>	0,003975528	2,400605183	4
<i>Pancreatic cancer (mmu05212)</i>	0,003984607	2,399614506	4
<i>Non-small cell lung cancer (mmu05223)</i>	0,004296281	2,366907321	3
<i>Apoptosis (mmu04210)</i>	0,01040746	1,98265525	4
<i>VEGF signaling pathway (mmu04370)</i>	0,01649957	1,782527374	3
<i>Axon guidance (mmu04360)</i>	0,01837902	1,73567765	5
<i>Long-term potentiation (mmu04720)</i>	0,01837902	1,73567765	3
<i>SNARE interactions in vesicular transport (mmu04130)</i>	0,02107917	1,676146494	2
<i>Colorectal cancer (mmu05210)</i>	0,02506985	1,600848265	3
<i>MAPK signaling pathway (mmu04010)</i>	0,02821486	1,5495221	6
<i>TGF-beta signaling pathway (mmu04350)</i>	0,02938917	1,531812679	2
<i>Endometrial cancer (mmu05213)</i>	0,02938917	1,531812679	2
<i>Hepatitis C (mmu05160)</i>	0,03829618	1,416844544	4

KEGG pathway 182	mmu-miR-	p-value	-LOG(p-value)	Núm, de genes
<i>Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate (mmu00532)</i>		2,26E-09	8,645979389	14
<i>MAPK pathway (mmu04010)</i>	<i>signaling</i>	2,56E-06	5,592132738	10
<i>Axon guidance (mmu04360)</i>		2,56E-06	5,592132738	2
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series (mmu00601)</i>		5,23E-06	5,281798103	9
<i>Ubiquitin mediated proteolysis (mmu04120)</i>		2,05E-05	4,6883008	6
<i>Renal carcinoma (mmu05211)</i>	<i>cell</i>	2,05E-05	4,6883008	10
<i>Focal adhesion (mmu04510)</i>		0,000270072	3,568520439	3
<i>Maturity onset diabetes of the young (mmu04950)</i>		0,000270072	3,568520439	7
<i>HIF-1 pathway (mmu04066)</i>	<i>signaling</i>	0,000748126	3,126025078	5
<i>mTOR pathway (mmu04150)</i>	<i>signaling</i>	0,001079945	2,966598362	3
<i>Lysine degradation (mmu00310)</i>		0,001794389	2,746083402	2
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - globo series (mmu00603)</i>		0,00202721	2,69310126	5

Anexos

<i>TGF-beta signaling pathway (mmu04350)</i>	0,007827888	2,106355397	9
<i>Endocytosis (mmu04144)</i>	0,008476379	2,071789633	12
<i>PI3K-Akt signaling pathway (mmu04151)</i>	0,008995716	2,045964264	5
<i>Fc gamma R-mediated phagocytosis (mmu04666)</i>	0,008995716	2,045964264	3
<i>N-Glycan biosynthesis (mmu00510)</i>	0,01087105	1,963728507	6
<i>Neurotrophin signaling pathway (mmu04722)</i>	0,01087105	1,963728507	4
<i>ErbB signaling pathway (mmu04012)</i>	0,01425814	1,845937125	7
<i>Protein processing in endoplasmic reticulum (mmu04141)</i>	0,01718307	1,764899241	8
<i>Transcriptional misregulation in cancer (mmu05202)</i>	0,01772631	1,75138166	7
<i>RNA transport (mmu03013)</i>	0,02267192	1,6445117	3
<i>Bladder cancer (mmu05219)</i>	0,02267192	1,6445117	3

KEGG pathway mmu-miR-200b	p-value	-LOG(p-value)	Núm. de genes
<i>Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series (mmu00601)</i>	1,22E-07	6,91515465	1

MAPK signaling pathway (mmu04010)	3,50E-04	3,456353302	7
Tyrosine metabolism (mmu00350)	4,02E-04	3,395269184	1
Lysine degradation (mmu00310)	7,55E-04	3,122230829	2
Dopaminergic synapse (mmu04728)	7,38E-03	2,131664849	3
Glycosaminoglycan degradation (mmu00531)	2,43E-02	1,614363345	1
Wnt signaling pathway (mmu04310)	0,02455402	1,609877395	4
Tryptophan metabolism (mmu00380)	0,02943236	1,531174913	1
Primary immunodeficiency (mmu05340)	0,0297702	1,526218248	2
Glycosphingolipid biosynthesis - globo series (mmu00603)	0,03468553	1,459851665	1
Toxoplasmosis (mmu05145)	0,03751189	1,425831054	3
Legionellosis (mmu05134)	0,04371437	1,359375776	2

