

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA

**Papel de los receptores TLR4 y de la
microbiota intestinal en los procesos
inflamatorios y neuroinflamatorios
causados por el consumo crónico de
alcohol, y posibles terapias con
curcuminoides.**

Doctorado en biotecnología



Tesis doctoral

Presentada por:

Carlos Manuel Cuesta Diaz

Dirigida por:

Dra. CONSUELO GUERRI SIRERA,

Dra. MARÍA PASCUAL MORA

Dr. JUAN R. UREÑA PERALTA

MARZO 2022



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

CONSUELO GUERRI SIRERA, Dra. en Bioquímica por la Universidad de Valencia, MARÍA PASCUAL MORA, Dra. en Farmacia por la Universidad de Navarra, y JUAN R. UREÑA PERALTA, Dr en Medicina por la Universidad de Valencia

HACEN CONSTAR

El trabajo de investigación “Papel de los receptores TLR4 y de la microbiota intestinal en los procesos inflamatorios y neuroinflamatorios causados por el consumo crónico de alcohol, y posibles terapias con curcuminoides”, que presenta Carlos Manuel Cuesta Diaz en el Centro de Investigación Príncipe Felipe para la obtención del Doctorado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia sido realizado bajo nuestra dirección, reúne las condiciones para ser defendido por su autor.

Valencia, 24, marzo, 2022

Fdo: Dra. Consuelo Guerri Sirera

Fdo: Dra. Marial Pascual Mora

Fdo: Dr. Juan R. Ureña Peralta

A la familia. Incluyendo a mis amigos cercanos, la familia que escoges.

Agradecimientos

Se suponía que esta sería la parte fácil de escribir, pero parece que todo en la tesis está enfocado a consumir tiempo en exceso. Aunque al menos este apartado nadie me lo puede corregir. Vamos a intentar hacerlo por orden, que aún me dejaré a gente por el camino porque soy un desastre.

Si empezamos por Oviedo, porque no puedo hablar de Valencia sin hablar antes de Oviedo, el agradecimiento imprescindible es a mi familia, porque no puedo hablar de mi sin hablar antes de mi familia. Por supuesto mis **padres**, que me han apoyado de todas las formas posibles, que ya solo les faltaba ponerse a escribir los apartados en los que me bloqueaba (incluso los propios agradecimientos). A mi hermano **Alejandro** (como si tuviera más de uno), uno de los pocos que podía hablar conmigo más de media hora sin preguntarme cuando entregaba la tesis. A mi **abuela** y a mi **tío**, que no podían hablar más de media hora sin preguntarme cuando entregaba la tesis, una pregunta a la que mi abuela le añadía siempre “*Porque tienes que entregarla, no puedes ya dejarla a medias*”. Y a **Coco**, porque es familia. Nunca has sabido lo que es una tesis, no vas a poder leer esto, pero siempre me has animado, y te quiero por eso.

A los amigos de Asturias, empezando por **Luis** y el grupo de informáticos, donde la mitad no son informáticos. Sobre todo, Luis, que siempre que voy a Asturias tiene tiempo para verme. Y además es informático de verdad. **Marcos** y **Lucia**, con sus propias vivencias y caos de tesis. A ver cuando entrega Marcos la suya y podéis pasar al caos de planificar una boda. **Coya**, que cada año se encuentra haciendo algo distinto, pero también consigue venir a verme a Oviedo, porque sabe la pereza que me da acercarme a Gijón. Aunque me traiciona y me lleva a restaurantes veganos para reírse. A **Borja**, al que veo menos desde que cogió la manía de tener un hijo, pero siempre he podido hablar con él de cualquier cosa.

Al cajón de sastre que son el grupo de **Foz**, donde la mayoría no son irónicamente de Foz. No es que pudierais ayudarme con la tesis (salvo **Torce** que me escribió la *chicken tesis*), pero saber que da igual donde vaya y lo que haga, solo tengo que encender el portátil para hablar con **Nico** o **Colombo** o **Drizt**, hace años que ha sido un seguro emocional en mi vida. Y por supuesto a **Fran**, mi mejor amigo, mi gemelo mental, la persona que más mensajes aleatorios ha recibido de mí. Nunca hagas una tesis Fran.

Saltemos a Valencia, pero mantengamos un orden. Primero la familia valenciana. A **Ángel**, porque Valencia no sería lo mismo sin ti. Durante años, has sido la mayor constante en esta ciudad, y la deuda que tengo contigo no creo que la pague nunca. A **Guille**, o **Wyllas** según

tenga yo el momento, es increíble como una persona tan callada puede hacer que su ausencia sea un vacío tan grande, una cerveza sin ti pierde encanto. A **Salva**, no solo por las veces que me ha echado un cable emocional, sin que ninguno de los dos lo dijera, pero con los dos sabiéndolo, sino también por poder discutir sin que se dañe la amistad. O al menos no durante mucho tiempo. **Natalia** también, a pesar de que me odie, ha sido otro apoyo emocional constante. Si **Consuelo**, claro que estas en estos putos agradecimientos, eres mi mejor amiga y a pesar lo mucho que me divierte atormentarte (y a ti estresarme), sabes que te quiero mucho de manera no sexual. Pero no intentes presentarme a más chicas de 43 años.

A toda la gente que conocí en Valencia y no se fueron por el camino. A **Alex** que ha sido compañero de piso y luego vecino. A los que conocí de la mano de Ángel como **Mario** y **Juan**. A los que conocí, pero se fueron. A **Guillermo Bances**, que saca excusas para volver a Valencia de forma aleatoria. A **Erik** y **Javi**, que encuentran excusas para no venir a Valencia, pero me siguen haciendo casito por las redes sociales. A **Eme, Emeterio**, que acabamos un confinamiento atrapados juntos y un reencuentro en una boda (la suya, porque lo que es la mía...). A **Gema**, que nunca habría pensado que terminaríamos llevándonos bien. A las amigas de **Natalia** que han permitido que nuestro grupo campo de nabos cumpla las cuotas de diversidad de género. A **Marcos**, que se lo tomaría muy a lo personal que no estuviera citado aquí, como compañero del barco de la diversión que es hacer una tesis.

Finalmente, pero sin duda los que más peso han tenido, al CIPF en general y al I-05 en particular. **Chelo**, su gran importancia no solo como directora de tesis si no también como persona. Demasiadas historias he oído sobre directores tiránicos o indiferentes, mientras que Chelo siempre ha estado ahí, para cualquier cosa que necesitarás, siempre. Un baúl inmenso de conocimientos y recursos que estaba abierto para ayudar. Ha sido un honor y un privilegio ser la última tesis que una persona como ella ha dirigido. **María**, si bien al principio mi relación con ella era poca, y en ocasiones me da pánico las correcciones o comentarios que va a hacer, al final es otra de esas personas que, para mi sorpresa, te terminan cayendo bien y les tienes cariño. Mi tercer director, **Juan**, es absurdo ponerle aquí en agradecimientos. Tendría que hacer una nueva tesis entera solo de agradecimientos para él. Ha sido un jefe y un profesor, claro, en algunos momentos. En otros fue un amigo, un hermano mayor y un faro en la oscuridad. Le agradezco tanto por su incomparable ayuda constante, como por no darme con una silla en la cabeza las muchas veces que le he visto pensándolo seriamente. Y una de las cosas que espero de la vida es que su camino no se aparte del mío sin que se crucen de nuevo. Tenemos también a **Paco**, que ha sido compañero de tesis. Y de trabajo. Y del máster, y de piso, y de cervezas, y de discotecas... prácticamente solo le ha faltado ser pareja sentimental, pero habríamos sido una pareja horrible, siendo sinceros. No suelo expresarlo (porque además te crecerías) pero tengo en

cuenta y respeto también el historial de favores que te debo. Lástima que nunca consiguiera que pasas del LoL al Dota. A **Susana**, con su estilo rudo y directo, que llegó al grupo de las últimas y se siente como si hubiera estado en el laboratorio desde el primer día que llegue. Otro ejemplo de lo que es el mundo, que con la enorme cantidad de gente horrible que tiene, al I-05 solo han acabado llegando auténticas joyas. A **Jorge**, una de esas personas con las que lamento no haberme llevado más, pero en su momento me toco ser el Pikachu de otra persona y luego a él le toco volverse internacional. A **Rosa**, aunque nuestras formas de ser eran demasiado opuestas y nunca hemos podido ser realmente amigos, no quita que esta tesis estaría coja sin ella. Además de que se divertía mucho arrojándome guantes rellenos de cacas de ratón (literalmente). A toda **la gente de prácticas** que han pasado por aquí, todos con los ojos llenos de ilusión y ganas de trabajar, pero tres en concreto, **Carlos Requena**, **Álex** e **Irene**. En ocasiones la única diferencia entre un buen día y un mal día en el laboratorio era saber que uno de ellos estaría también, para repartir el trabajo entre los dos, mientras la conversación es una mezcla de ciencia e historietas de bar. El mundo es un pañuelo y no descarto que nos volvamos a ver. A **Majo**, que aunque sea del CIPF, realmente la he acabado conociendo fuera del centro, como otra de las personas atrapadas en el torbellino de las tesis. Y a ti **Carlos Manuel**, también. Por las veces que fuiste el primero que no daba dos duros en acabar una tesis. Que veías las de otros y pensabas “*Imposible que yo pueda hacer algo así*”. Por los folios que mirabas fijamente en blanco porque habías olvidado como se escribe. Porque al final, algo lograste sacar de todo esto.

Al I-44, el laboratorio hermano, que según qué momentos parecíamos el mismo grupo repartidos en dos IPs. **Pablo**, **Sonia**, **Beric** (je je je), **Mara**, incluso **Miguel Ángel**. Pero el nombre que destaca en ese grupo para mi es **Marina**, la otra arquitecta del centro. Me tienes en estima, y si crees que es mutuo estas equivocada, porque yo te tengo en mucha más estima de lo que tú podrías tenerme a mí. Gracias por ayudarme, por chismorrear conmigo, por frikear conmigo, porque gracias a ti he conocido a **Adrián** (una versión alternativa de Marina, pero dando menos miedo enfadado), e incluso por intentar unirme a tus amigos (con funestos resultados). A **Paz** e **Inés**, que hoy en día sigo sin tener claro cómo hemos acabado siendo amigos, pero ha funcionado. A **Laura** Genómica y la gente de su servicio, que me han dejado parasitarles para hacer librerías génicas. A **Alberto** del confocal, aunque nunca he hecho confocal con él, **Araceli**, **Albert** (aún le debo un té), **Pilar**, toda esa gente del centro con la que te cruzas constantemente y llega un momento que comprendes que cuando no estén, la vida será un poco más oscura.

Mucha gente se me queda fuera, y de los que he nombrado he sido más breve de lo que me gustaría, y es que en esto de ponerme expresivo y emotivo soy bastante malo, pero como dije, este apartado no ha pasado por ninguna corrección. Es de corazón.

Resumen

El alcohol es una de las drogas más aceptadas y consumidas a nivel mundial, y su ingesta crónica causa alteraciones en el sistema nervioso central, desde desmielinización hasta muerte neural. Se ha demostrado que gran parte de estos efectos estarían mediados por la activación del sistema inmune innato, principalmente a través del receptor TLR4, que desemboca en un estado inflamatorio. Para ahondar en estos mecanismos, en esta tesis se pretende analizar si el consumo crónico de etanol puede causar modificaciones en los miARNs de la corteza cerebral, regulando la expresión de genes proinflamatorios asociados a la ruta de señalización del TLR4 y si el uso de la curcumina como terapia es capaz de disminuir estos efectos. Además, analizaremos si el consumo de alcohol a largo plazo es capaz de alterar la microbiota intestinal, y la implicación del TLR4 en estos procesos. Nuestros resultados demuestran que el etanol es capaz de alterar la expresión de diferentes microARNs que regulan la expresión de genes proinflamatorios y asociados a la vía del TLR4. La ausencia del receptor causa un perfil de expresión distinto tanto en los controles como en los animales alcohólicos crónicos.

Puesto que en los últimos años nos hemos interesado en la búsqueda de una posible terapia para paliar la neuroinflamación producida por el etanol, hemos usado el BDMC, un curcuminoide con capacidad antiinflamatoria y antioxidante, para revertir los daños causados por el abuso del alcohol. Para su administración proponemos su conjugación con un polipéptido que elimina los tradicionales problemas asociados al uso de estos compuestos naturales como son su vida media corta y su baja biodisponibilidad, sin que hayamos registrado toxicidad. El uso de este polímero en animales con un consumo crónico de etanol produce una disminución de la inflamación, tanto a nivel proteico como de expresión génica.

Considerando que otra de las regiones del organismo más afectadas por el alcohol es el tracto gastrointestinal, y que la población bacteriana puede ser modificada en determinadas enfermedades o por el uso de sustancias nocivas, produciendo una disbiosis, hemos comparado el efecto del alcohol sobre la población bacteriana y la participación del receptor TLR4 en estos efectos. Mediante análisis de expresión génica, confirmamos que el tejido intestinal ausente del receptor TLR4 es menos susceptible de sufrir cambios debidos al consumo de alcohol. Sin embargo, no hemos encontrado en estos animales la expresión aumentada de genes proinflamatorios característica de los tratamientos alcohólicos. Además, los ratones carentes de este receptor presentan una microbiota intestinal única y diferente a la encontrada en animales de genotipo normal, con sus propios cambios en el equilibrio bacteriano en respuesta a la

ingesta de alcohol. Esta microbiota presenta menor cantidad de especies Gram - y mayor resistencia al desequilibrio ocasionado por el alcohol, que su contraparte en los ratones WT.

En general, los resultados científicos que aparecen en esta tesis resaltan el papel del TLR4 en las alteraciones causadas por el consumo crónico de alcohol. Mostramos como cambios causados por el etanol a niveles tan distintos como la regulación mediante miARNs o la microbiota intestinal dependen en gran medida de la respuesta inicial que causa el alcohol en el TLR4. Dado que es un receptor necesario para el correcto funcionamiento de muchos órganos, planteamos un posible tratamiento mediante la inhibición de esta cascada inflamatoria.

Resum

L'alcohol és una de les drogues més acceptades i consumides a nivell mundial, i la seva ingesta crònica causa alteracions al sistema nerviós central, des de desmielinització fins a mort neural. S'ha demostrat que gran part d'aquests efectes estarien intervinguts per l'activació del sistema immune innat, principalment a través del receptor TLR4, que desemboca en un estat inflamatori. Per aprofundir en aquests mecanismes, en aquesta tesi es pretén analitzar si el consum crònic d'etanol pot causar modificacions als miARNs de l'escorça cerebral, regulant l'expressió de gens proinflamatoris associats a la ruta de senyalització del TLR4 i si l'ús de la curcumina com a teràpia és capaç de disminuir aquests efectes. A més, analitzarem si el consum d'alcohol a llarg termini és capaç d'alterar la microbiota intestinal i la implicació del TLR4 en aquests processos. Els nostres resultats demostren que l'etanol pot alterar l'expressió de diferents microARNs que regulen l'expressió de gens proinflamatoris i associats a la via del TLR4. L'absència del receptor causa un perfil d'expressió diferent tant als controls com als animals alcohòlics crònics.

Com que els darrers anys ens hem interessat en trobar una possible teràpia per pal·liar la neuroinflamació produïda per l'etanol, hem utilitzat el BDMC, un curcuminoide amb capacitat antiinflamatòria i antioxidant, per revertir els danys causats per l'abús de l'alcohol. Per a la seva administració proposem la seva conjugació amb un polipèptid que elimina els problemes tradicionals associats a l'ús d'aquests compostos naturals com són la seva vida mitjana curta i la seva baixa biodisponibilitat, sense que haguem registrat toxicitat. L'ús d'aquest polímer en animals amb un consum crònic d'etanol produeix una disminució de la inflamació, tant a nivell proteic com d'expressió gènica.

Considerant que una altra de les regions de l'organisme més afectades per l'alcohol és el tracte gastrointestinal, i que la població bacteriana pot ser modificada en determinades malalties o per l'ús de substàncies nocives, produint una disbiosi, hem comparat l'efecte de l'alcohol sobre la població bacteriana i la participació del receptor TLR4 en aquests efectes. Mitjançant una anàlisi d'expressió gènica, confirmem que el teixit intestinal absent del receptor TLR4 és menys susceptible de patir canvis deguts al consum d'alcohol. Tot i això, no hem trobat en aquests animals l'expressió augmentada de gens proinflamatoris característica dels tractaments alcohòlics. A més, els ratolins sense aquest receptor presenten una microbiota intestinal única i diferent de la trobada en animals de genotip normal, amb els seus propis canvis en l'equilibri bacterià en resposta a la ingesta d'alcohol. Aquesta microbiota presenta menor quantitat d'espècies Gram - i més resistència al desequilibri ocasionat per l'alcohol, que la contrapart en els ratolins WT.

En general, els resultats científics que apareixen en aquesta tesi ressalten el paper del TLR4 a les alteracions causades pel consum crònic d'alcohol. Mostrem com a canvis causats per l'etanol a nivells tan diferents com la regulació mitjançant miARNs o la microbiota intestinal depenen en gran mesura de la resposta inicial que causa l'alcohol al TLR4. Atès que és un receptor necessari per al funcionament correcte de molts òrgans, plantegem un possible tractament mitjançant la inhibició d'aquesta cascada inflamatòria.

Abstract

Alcohol is one of the most accepted and consumed drugs worldwide, and its chronic consumption causes alterations in the central nervous system, such as demyelination and neural death. It has been shown that these effects would be mediated by the activation of the innate immune system, mainly through the TLR4 receptor, which leads to an inflammatory response. To inquire into these mechanisms, this thesis aims to analyse whether chronic ethanol consumption can cause changes in miRNAs in the cerebral cortex, regulating the expression of proinflammatory genes associated with the TLR4 signalling pathway, and whether the use of curcumin as a therapy it is able to reduce these effects. In addition, we will analyse if long-term alcohol consumption can alter the intestinal microbiota, and the involvement of TLR4 in these processes. Our results show that ethanol can alter the expression of different microRNAs that regulate the expression of proinflammatory genes associated with the TLR4 pathway. The absence of this receptor causes a different expression profile in both controls and chronic alcoholic animals.

Taking into account our interest in seeking a possible therapy to alleviate the neuroinflammation caused by ethanol, we have used BDMC, a curcuminoid with anti-inflammatory and antioxidant activity, to ameliorate the damage caused by alcohol abuse. For its administration, we propose its conjugation with a polypeptide that eliminates the traditional problems associated with the use of these natural compounds, such as their short half-life and low bioavailability, with no toxicity recorded. The use of this polymer in animals with chronic ethanol consumption produces a decrease in inflammation, at both protein level and gene expression.

Considering that another of the regions of the body most affected by alcohol is the gastrointestinal tract, and that bacterial population can be modified in certain diseases or due to harmful substances, producing dysbiosis, we have compared the effect of alcohol on the bacterial population and the participation of the TLR4 receptor in these effects. Using gene expression analysis, we confirm that intestinal tissue without TLR4 receptor show less changes induced by the alcohol consumption. However, we have not found in these animals an increased expression of proinflammatory genes which are observed in alcoholic treatments. In addition, mice lacking this receptor have a unique intestinal microbiota, which is different from the normal genotype animals, with their own changes in bacterial balance in response to alcohol intake. This microbiota has less Gram - species and greater resistance to imbalance caused by alcohol than its counterpart in WT mice.

In general, the results of this thesis highlight the role of TLR4 in the alterations caused by chronic alcohol consumption. We show that ethanol can cause changes at different levels, such as regulation of miRNAs or intestinal microbiota, which largely depend on the TLR4 activation induced by ethanol. Therefore, herein we demonstrate the importance of the TLR4 to the correct activity of several body organs, and we propose a possible treatment by inhibiting its inflammatory cascade.

Publicaciones

Resultados obtenidos en el desarrollo de la presente tesis doctoral han sido publicados en los siguientes artículos, en revistas científicas indexadas:

1. **Cuesta, C. M.** et al. TLR4 Deficiency Affects the Microbiome and Reduces Intestinal Dysfunctions and Inflammation in Chronic Alcohol-Fed Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 22, (2021).
2. **Cuesta, C. M.** et al. A targeted polypeptide-based nanoconjugate as a nanotherapeutic for alcohol-induced neuroinflammation. *Nanomedicine* 34, (2021).
3. Ureña-Peralta, J. R., Alfonso-Loeches, S., **Cuesta-Diaz, C. M.**, García-García, F. & Guerri, C. Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex. *Sci. Rep.* 8, (2018).

Índice

Contenido

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA	1
Agradecimientos	6
Abreviaturas	25
Introducción	28
1 Microbiota	30
1.1 ¿Qué es la microbiota?	30
1.2 Interacción con el hospedador	32
1.3 Eje Microbiota-Intestino-Cerebro	33
1.4 Sistema inmune en el intestino: GALT	37
1.5 Receptores Tipo-Toll (TLRs)	38
1.6 El receptor TLR4	41
1.7 Cuando falla el equilibrio: disbiosis	42
1.8 Etanol y microbiota	44
2 MicroARNs	45
3 Sistema Nervioso Central	49
3.1 El Sistema inmune en el cerebro	49
3.2 Etanol y SNC	51
3.3 El uso de los curcuminoides como terapia	53
3.4 Nanopartículas biodegradables capaces de atravesar la BE y paliar las lesiones cerebrales	55
Hipótesis y objetivos	60
Materiales y métodos	64
1 Síntesis y caracterización del nanoconjugado	66
2 Animales y tratamiento de alcohol	68
3 Tratamientos y recogida de muestras	69
3.1 Tratamiento de ratones WT y TLR4-KO para el estudio de la microbiota intestinal	69
3.2 Tratamiento de ratones WT y TLR4-KO para el perfil de miRNAs corticales	70
3.3 Tratamiento de ratones WT para el estudio de la curcumina	71
4 Análisis de la expresión génica	71
4.1 Extracción y aislamiento del material genético de las muestras	71
4.2 Control de calidad de los ácidos nucleicos	73
4.3 Retrotranscripción	74

4.4	Real-time qPCR.....	75
5	Generación de librerías	78
5.1	Librerías de ARNp y su secuenciación	78
5.2	Librerías del 16S rRNA bacteriano y su secuenciación.....	79
6	Métodos antígeno - anticuerpo	81
6.1	Western blot.....	81
6.2	Análisis de citoquinas	82
7	Análisis metabolómico	83
8	Cultivos.....	83
9	Análisis bioinformático.....	84
9.1	Procesamiento de los datos provenientes de las librerías de 16S rRNA.....	84
9.2	Procesamiento de los datos provenientes de las librerías de ARNp.....	85
10	Análisis estadístico	86
Resultados.....		88
1	Análisis de los miARNs corticales mediante Next-Generation Sequencing (NGS).....	90
2	Análisis de los niveles de expresión de los miARNs corticales.....	94
3	Expresión diferencial de miARNs asociada al consumo de alcohol en la corteza cerebral y el efecto del TLR4	95
4	Citotoxicidad <i>in vitro</i> de BDMC y StCIPr-BDMC-ANG en astrogliá.	100
5	El tratamiento con BDMC y StCIPr-BDMC-ANG atenúa la neuroinflamación debida al etanol	103
6	StCIPr-BDMC-ANG altera los cambios inducidos por el etanol en la expresión de miARNs asociados con la neuroinflamación	106
7	El tratamiento con etanol incrementó la expresión génica vinculada a la respuesta inflamatoria en el intestino	109
8	Análisis del peso corporal y de la ingesta en los distintos grupos experimentales ..	111
9	Impacto del TLR4 y el consumo de etanol en la comunidad microbiana intestinal..	112
10	La presencia del receptor TLR4 es un factor más importante para la microbiota intestinal que la edad o el consumo de etanol	116
11	El tratamiento con alcohol crónico y la deficiencia en la expresión del TLR4 pueden modificar la microbiota intestinal en los ratones	118
12	La microbiota bacteriana intestinal se modifica tanto por el consumo crónico del etanol como por la ausencia del TLR4 en ratones macho adultos.....	124
13	La comunidad bacteriana se modifica de forma distinta en las hembras que en machos por el consumo crónico de etanol y/o por la ausencia del receptor TLR4	128
14	Análisis del efecto del envejecimiento sobre los taxones bacterianos en hembras.	132
15	Papel del TLR4 en las alteraciones inducidas por el etanol en los genes estructurales del intestino	134

16	La abundancia de los taxones bacterianos se correlaciona con la expresión de genes intestinales específicos.....	136
17	Perfil de metabolitos analizado por RMN en cerebros de ratones WT y WTE	137
	Discusión	141
1	La corteza de los ratones TLR4-KO presenta un perfil de miARN único en alcohólicos crónicos	143
2	El nanoconjugado con curcumina reduce la neuroinflamación en alcohólicos crónicos	146
3	La ausencia del receptor TLR4 genera una microbiota diferente con otras adaptaciones tras el consumo de etanol	149
4	La microbiota intestinal cambia con el envejecimiento del hospedador	153
5	La ausencia del receptor TLR4 evita la inflamación intestinal debida al consumo crónico de etanol en machos	154
	Conclusiones	159
	Bibliografía	163

Abreviaturas

ACP	Análisis de Componentes Principales
ADNc	ADN complementario
ANG	Angiopep-2
AP-1	Proteína activadora 1
AQP8	Aquaporina-8
ARNm	ARN mensajero
ARNp	ARN pequeño
ARNr	ARN ribosómico
ASV	Amplicon sequence variant
BAL	Alcohol en sangre
BC	Corteza superior
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
BHE	Barrera Hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
CDH1	Cadherina 1
CFTR	Gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CLR	C-type lectin receptor
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Ct	Umbral de ciclos
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DADA	<i>Divisive Amplicon Denoising Algorithm</i>
DAMP	Patrón molecular asociado al daño
DIC	Diisopropil carbodiimida
DMF	Dimetil anhidro formamida
ECC	Células enteroendocrinas
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
FBS	Suero bovino fetal
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GAU	Unidad de ácido glutámico
GF	Germ-free
HPA	Hipotálamo pituitario adrenal
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa 2
ITLN1	Intelectina 1
KE / KOE	Knock-out con tratamiento alcohólico
KO	Knock-out
LBP	Proteína de unión al LPS
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LRR	Repetición rica en leucina
MAO-B	Monoamino oxidasa-B
miARN	Micro ARN
MUC2	Glicoproteína secretora Mucina-2
NALP3	NAct Leucine-rich repeat Protein 3
ncRNA	ARN no codificante

NF-κB	Factor nuclear kappa B
NGS	Next-Generation Sequencing
NLR	NOD-like receptor
NMDS	Escalamiento multidimensional no métrico
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PD	Piridil ditiol
PFC	Corteza prefrontal
PPIA	Ciclofilina A
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
QC	Quality Control
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RLR	RIG-1-like receptor
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especie reactiva del oxígeno
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SDS	Dodecilsulfato sódico
SII	Sistema Inmune Innato
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema nervioso entérico
SOD	Superóxido dismutasa
StCIPr	Polímero de poliglutamato modificado con propargilo
TBS	Tris buffer salino
TIR	Toll/receptor IL-1
TLR	Toll-Like Receptor
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
WE / WTE	Wild-Type con tratamiento alcoholico
WT	Wild-Type
XPO5	Exportina-5

Introducción

1 Microbiota

1.1 ¿Qué es la microbiota?

El tracto gastrointestinal humano es el hábitat de un abundante número, tanto en diversidad como en abundancia, de microorganismos que cumplen una actividad primordial en la homeostasis del organismo. Este complejo ecosistema de especies, al que llamamos microbiota intestinal, está involucrado en funciones tan diversas como son la inmunidad, la eficiencia energética, la síntesis de moléculas esenciales o incluso el estado emocional (Adak & Khan, 2019; Belkaid & Harrison, 2017; Jandhyala et al., 2015; Kho & Lal, 2018). Sobre todo, en las últimas décadas cada vez más estudios confirman la vinculación entre la microbiota intestinal y las enfermedades gastro- y extra-intestinales, incluyendo alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC), donde se hace patente la comunicación bidireccional del SNC y la microbiota intestinal (Salami, 2021; Tillisch, 2014).

¿Pero quienes la forman? Pues trillones de células (Suau et al., 1999), más que el número de células que forman los tejidos del resto del organismo. La mayoría pertenecen al reino Bacteria, con especies en menor abundancia de los reinos Fungi (como *Saccharomyces* (Kapitan, Niemiec, Steimle, Frick, & Jacobsen, 2019)) y Archaea (como *Methanobrevibacter* (Nkamga, Henrissat, & Drancourt, 2017)), e incluso un viroma intestinal dominado por bacteriófagos que dependen de la microbiota bacteriana para su replicación (Scarpellini et al., 2015). Es un ambiente dominado por las especies anaeróbicas, que conforman más del 90% del total de organismos, presentando también anaeróbicos facultativos y aeróbicos en menor abundancia (Ramakrishna, 2007). Aunque se trata de un ecosistema diverso en especies, esto no quiere decir que todas las especies se encuentren igualmente representadas. Aproximadamente el 90% de todos los microorganismos de la microbiota humana pertenecen a los filos Firmicutes y Bacteroidetes, con el género *Clostridium* representando el 95% de filo Firmicutes y estando presente ya en los hospedadores a los tres meses del nacimiento (Ramakrishna, 2007), y los géneros *Bacteroides* y *Prevotella* siendo los dominantes en el filo Bacteroidetes. En mucha menor abundancia, pero también presentes en la microbiota, nos encontramos con los filos Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia (Eckburg et al., 2005; Rinninella et al., 2019). Debido a esta variedad tan amplia de especies, no es sorprendente que la microbiota humana contenga entre 100 y 150 veces más genes que el propio hospedador (Qin et al., 2010).

La colonización microbiana del tracto gastrointestinal comienza en el mismo instante en que el individuo nace, siendo un ambiente nuevo y estéril donde la comunidad de

microorganismos se desarrollará de forma única (Palmer, Bik, DiGiulio, Relman, & Brown, 2007). Durante los primeros meses la diversidad aumenta rápidamente, alcanzando la microbiota un estado que podríamos considerar estable a la edad de 1-3 años, a partir de este periodo los cambios que desarrolla la microbiota ocurren a ritmos más lentos que durante la niñez (Dominguez-Bello, Blaser, Ley, & Knight, 2011) y es menos susceptible a las modificaciones.

Esta microbiota saludable funciona como otro órgano dentro del cuerpo del hospedador, pero siendo al mismo tiempo un complejo ecosistema propio, donde cientos de especies deben convivir con las células humanas y entre ellas mismas. Las funciones en las que participa este conjunto de microorganismos pueden dividirse en: (1) metabólicas, mejorando la absorción de nutrientes, la extracción de energía durante la digestión y aportando nuevas rutas bioquímicas y metabolitos esenciales para el organismo; (2) protectoras, colaborando en el desarrollo del sistema inmune (SI) tanto innato como adaptativo, y sirviendo de barrera frente a otras especies patogénicas al ocupar su posible nicho; y finalmente (3) estructural regulando a las células intestinales, sus uniones intercelulares y la producción de mucosa (Pascale et al., 2018).

Siguiendo con lo que podríamos definir como una microbiota humana sana, los taxones bacterianos principales y las rutas metabólicas que realizan son similares entre todos los individuos, e incluso se ha teorizado la existencia de un núcleo bacteriano común, un conjunto de especies microbianas que estarían presentes en todos los humanos (Tap et al., 2009). En un estudio realizado por (Qin et al., 2010), usando 124 muestras fecales de individuos europeos se detectaron 18 especies en todos los individuos, 57 en $\geq 90\%$ y 75 en $\geq 50\%$ de los individuos. Sin embargo, en el mismo estudio comprobaron que las 57 especies presentes en $\geq 90\%$ presentaban una variabilidad entre individuos de entre 2,19-12 veces. No existen dos individuos con microbiotas idénticas en las especies que las componen, ni en sus abundancias, siendo tan únicas y representativas como las huellas dactilares. Esto se debe en parte a que se ve condicionada por multitud de factores, el más relevante la dieta (Yadav, Verma, & Chauhan, 2018), pero también el uso de antibióticos o probióticos, la edad, el estrés, el genotipo del hospedador o incluso el proceso del parto, favoreciendo todos ellos un perfil bacteriano específico (Bäckhed et al., 2012; Dominguez-Bello et al., 2011). Estas diferencias pueden encontrarse no solo entre los individuos, sino que el propio tracto gastrointestinal, dentro del mismo hospedador, contiene diferentes especies dependiendo de la región longitudinal o entre el epitelio y la luz intestinal (Dieterich, Schink, & Zopf, 2018). Las concentraciones bacterianas también varían, debido a distintos factores como la absorción de agua, el crecimiento bacteriano o el desprendimiento de bacterias desde la superficie mucosa, con una mayor concentración de organismos en el ciego, al principio del colon ascendente, $\sim 10^{11}$ bacteria/ml, y la menor en el

estómago y la parte superior del intestino delgado, 10^3 - 10^4 bacteria/ml (Sender, Fuchs, & Milo, 2016).

1.2 Interacción con el hospedador

Resulta imposible pensar que el gran número de especies y microorganismos que existen dentro del tracto gastrointestinal no interactúen con su hospedador, desarrollando una relación simbiótica donde complementan el metabolismo del anfitrión, o incluso desarrollan rutas metabólicas nuevas. Su actividad bioquímica está relacionada con toda la nutrición del organismo. La microbiota está involucrada con extracción de energía de los alimentos y su almacenamiento en el organismo (lo que resulta perjudicial en algunos países al ser un factor de obesidad) (Bäckhed et al., 2004). Producen nutrientes que el organismo humano es incapaz de sintetizar por sí mismo, como son la mayoría de las vitaminas hidrosolubles (biotina, piridoxina, riboflavina, tiamina, ácido pantoténico o folato) (Said, 2011) o ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés), como son el acetato, propionato y butirato, este último la principal fuente energética de los colonocitos (figura 1) y con actividad anti-inflamatoria (Holmes et al., 2020). Estos microorganismos están involucrados tanto en el anabolismo, como en el catabolismo de aminoácidos dispensables e indispensables, degradando polisacáridos que los mamíferos no pueden digerir (Hooper, Midwedt, & Gordon, 2002) y estimulando la absorción y retención de distintos componentes, como algunos minerales (Nicholson et al., 2012; Scholz-Ahrens, Schaafsma, Van den Heuvel, & Schrezenmeir, 2001). Muchos de los productos bacterianos son considerados metabolitos similares a las hormonas (Clarke et al., 2014) y a los neurotransmisores, o directamente son la misma molécula, como es el caso de la producción de serotonina, con la capacidad de modular el sistema nervioso entérico (SNE) (De Vadder et al., 2018) y catecolaminas, como la dopamina y la norepinefrina, con actividad pro-absortiva entre otras (Asano et al., 2012).

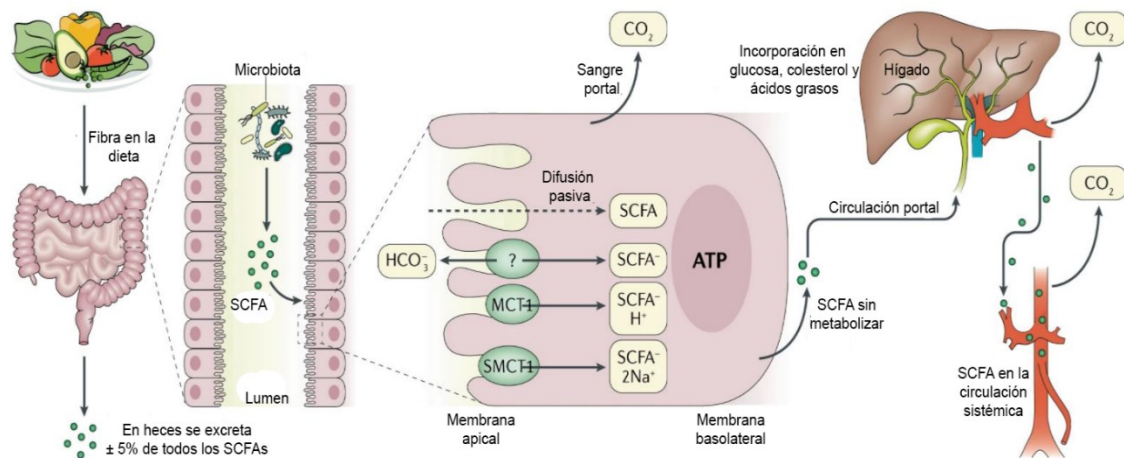


Figura 1. Los SCFAs son absorbidos por los colonocitos y oxidados a CO_2 para producir energía. Los no metabolizados llegan al hígado a través de la circulación portal hepática donde se usan tanto para obtener energía como en biosíntesis. Los SCFAs que no son utilizados en el hígado pasarán finalmente a la circulación sistémica. Imagen modificada de (Dalile, Van Oudenhove, Vervliet, & Verbeke, 2019).

La microbiota intestinal también desempeña un papel crucial en la inmunidad y frente a las infecciones patógenas. Su efecto protector se puede dividir en varios apartados principales: la competición por nutrientes limitados, causando la muerte por inanición de especies infecciosas rivales (Leatham et al., 2009), la producción de bactericidas (Hammami, Fernandez, Lacroix, & Fliss, 2013) u otros metabolitos que afectan negativamente a especies patógenas (Gantois et al., 2006), y la estimulación y desarrollo del sistema inmune (Kamada, Chen, Inohara, & Núñez, 2013; Kamada, Seo, Chen, & Núñez, 2013; Vaishnav, Behrendt, Ismail, Eckmann, & Hooper, 2008), con la inducción de interleucinas como son IL-22, IL-14 o IL-10, y la activación del inflammasoma (H.-Y. Cheng, Ning, Chen, & Ma, 2019). Por ejemplo, (Resta-Lenert & Barrett, 2003) mostraron que la presencia de especies probióticas, como *Streptococcus thermophilus* o *Lactobacillus acidophilus*, eran capaces de limitar el daño causado a las células del epitelio intestinal por una cepa enteroinvasiva de *Escherichia coli*.

1.3 Eje Microbiota-Intestino-Cerebro

Aunque durante miles de años diversos estudiosos habían hipotetizado una relación entre los sistemas digestivo y nervioso, la confirmación del llamado eje intestino-cerebro no surgió hasta 1902, cuando Ivan Pavlov demostró la existencia de una fase cefálica en la

digestión. En dicha fase, el sistema nervioso provocaba secreciones gástricas y pancreáticas a partir de estímulos visuales, auditivos u olfatorios (Pavlov & Thompson, 1902). En las últimas décadas, este eje ha tenido que ampliarse para convertirse en el eje microbiota-intestino-cerebro. La clave definitiva ha sido principalmente los estudios usando animales *germ-free* (GF) o axénicos, animales que no presentan ningún microorganismo viviendo dentro o sobre ellos, al menos que puedan ser detectados por los métodos actuales, siendo por lo demás, idénticos a los demás animales usados en dichos estudios (K. Smith, McCoy, & Macpherson, 2007). No es sorpresa que la mayor parte de estas diferencias sean a nivel del aparato digestivo, desde alteraciones en la arquitectura intestinal, como la acumulación de moco (Gustafsson, Midtvedt, & Strandberg, 1970), una menor movilidad intestinal (Strandberg, Sedvall, Midtvedt, & Gustafsson, 1966) y hasta una disminución tanto en número como actividad de linfocitos intraepiteliales (Imaoka, Matsumoto, Setoyama, Okada, & Umesaki, 1996). Sin embargo, el SNC también se ve perjudicado por esta ausencia de organismos. Por ejemplo, los individuos GF presentan una mayor permeabilidad en la barrera hematoencefálica (BHE), que se recupera al introducirles en el tracto gastrointestinal una microbiota libre de patógenos (Braniste et al., 2014), y una mayor sensibilidad al estrés del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, observándose niveles reducidos de BDNF en hipocampo y corteza cerebral (Nobuyuki Sudo et al., 2004). Se ha comprobado a su vez, que ratones GF de nacimiento presentan un comportamiento y una bioquímica nerviosa más similar a los ratones normales si se les incorpora una microbiota durante su juventud (Bercik et al., 2011).

Un segundo ejemplo de la existencia de este eje es el hecho de que el tratamiento con cepas bacterianas concretas causa alteraciones en el SNC, como es el caso de probióticos como *Bifidobacterium infantis*, que ejerce resultados positivos en trastornos mentales (Desbonnet et al., 2010), o *Campylobacter jejuni* que provoca alteraciones en el sistema nervioso y el comportamiento, reflejado en mayores niveles de ansiedad, sin que hubiera una respuesta del sistema inmune (Lyte, Varcoe, & Bailey, 1998). Aunque desarrollar humanos GF sería una cuestión de dudosa ética, hay registrados casos en los que la administración de antibióticos a pacientes ha desembocado en desórdenes mentales, donde la desaparición de la microbiota por el tratamiento puede haber sido una posible causa (Mehdi, 2010).

Una vez confirmada esta comunicación, ¿cómo se produce? Las principales rutas que permiten este intercambio de información entre el cerebro y la microbiota intestinal se pueden clasificar en (Cryan et al., 2019):

- **El Sistema Nervioso Autónomo (SNA)**, destacando el **nervio vago** y el SNE. El nervio vago en el intestino regula la contracción del músculo liso y la secreción glandular, comunica información sensorial al cerebro y es cómplice en trastornos psiquiátricos (Breit,

Kupferberg, Rogler, & Hasler, 2018). Se considera que algunas especies bacterianas son capaces de interactuar con la señalización vagal a través de los receptores del nervio vago, tanto los mecanorreceptores (modificando la actividad contráctil) como los quimiorreceptores (produciendo sustancias como los SCFAs o colecistoquinina) (Forsythe, Bienenstock, & Kunze, 2014). Esta comunicación ya ha sido demostrada en casos concretos, por ejemplo, *Lactobacillus rhamnosus* es una bacteria probiótica que modula el sistema GABAérgico de forma beneficiosa en individuos con conductas depresivas y ansiosas, usando el nervio vago como principal canal modulador entre ella y el SNC (Bravo et al., 2011). Por otro lado, un estudio desarrollado por otro laboratorio demostró que el trasplante de microbiota fecal era capaz de aliviar la encefalopatía séptica, a través del nervio vago (Li et al., 2018). Además, el SNE es un componente único dentro del SNA, poseyendo microcircuitos con propiedades, tanto sensoriales como motoras, que le capacitan para mediar las respuestas gastrointestinales independientemente del SNC, lo que no impide que los cambios neuronales en uno de los dos sistemas puedan manifestarse en el otro, debido a las interacciones que mantienen (Endres & Schäfer, 2018; Rao & Gershon, 2016) .

- **Las células enteroendocrinas** (ECCs, por sus siglas en inglés) engloban un tipo especializado de células epiteliales con una abundante variedad de quimiorreceptores y la capacidad de liberar un amplio catálogo de moléculas con distintas funciones. Aunque son menos del 1% de toda la población epitelial del tracto digestivo, debido a la enorme superficie del intestino representan el mayor órgano endocrino del cuerpo humano (Sternini, Anselmi, & Rozengurt, 2008). Estas células expresan desde receptores Toll-like hasta receptores acoplados a proteínas G, o incluso receptores del gusto, que responden a los metabolitos producidos por las bacterias intestinales (Y. Yu, Yang, Li, & Cong, 2020). No solo las diferentes ECCs presentan receptores distintos entre sí, sino que también difiere la producción de hormonas que sintetizan a lo largo del intestino, dependiendo de la célula y el receptor estimulado (Roberts et al., 2019), funcionando al mismo tiempo como intermediarias y mensajeras entre el interior del aparato digestivo, y las neuronas aferentes intrínsecas primarias y las neuronas aferentes vagales (Mayer, 2011). Se ha encontrado que las ECCs en peces cebra cambian con dietas ricas en grasa, para reducir la sensibilidad a los nutrientes, pero curiosamente esta adaptación requiere la presencia de una microbiota (L. Ye et al., 2019), y taxones bacterianos específicos que podrían promover dicha adaptación. También se ha demostrado que la microbiota promueve la producción de serotonina en ECCs, a través de la actividad estimuladora de SCFAs, concretamente de acetato y butirato (Reigstad et al., 2015).

- **El (eje HPA)**, la principal estructura anatómica que controla la respuesta al estrés está **eje hipotalámico-pituitario-adrenal** constituida por el núcleo paraventricular del hipotálamo,

el lóbulo anterior de la glándula pituitaria o hipófisis y la glándula adrenal (S. M. Smith & Vale, 2006). Un funcionamiento erróneo en este eje desemboca en diversas enfermedades, y es común en los trastornos gastrointestinales (Chrousos, 2009). Se ha comprobado que la respuesta del eje HPA al estrés está influenciada por la microbiota. Sin embargo, dicha influencia es altamente dependiente de la especie, e incluso de la cepa bacteriana, y puede ser tanto anti-estrés como pro-estrés (N. Sudo, 2016), en un mecanismo que se sospecha relacionado, de nuevo, con los SCFAs.

- **El sistema inmune**, del que hablaremos más ampliamente en el siguiente apartado. Las rutas se han resumido en la figura 2.

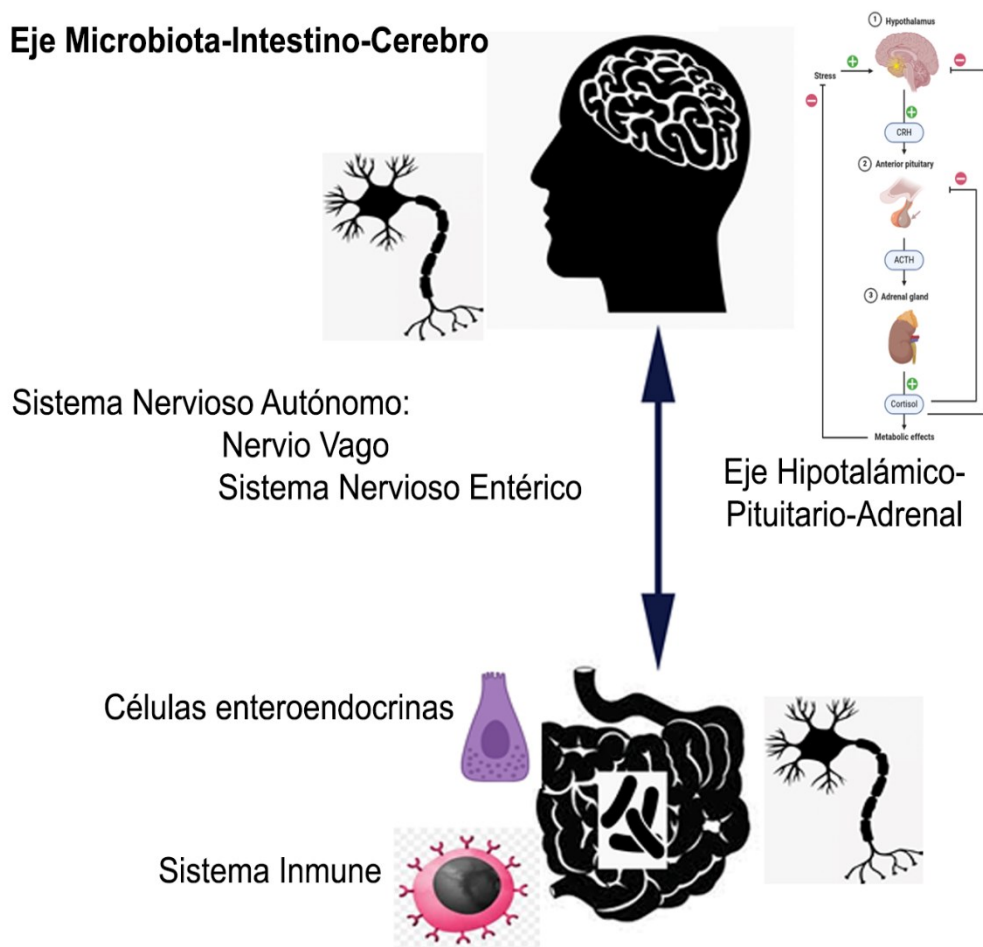


Figura 2: Principales rutas de comunicación en el eje Microbiota-Intestino-Cerebro.

1.4 Sistema inmune en el intestino: GALT

La superficie interna del intestino está formada por una sola capa de células epiteliales, cubiertas por una mucosa permeable para permitir el intercambio de nutrientes. Esta superficie ocupa aproximadamente 250-400 m², la segunda más extensa del organismo tras la piel, y a lo largo de una vida media pasan por ella unas 60 toneladas de alimentos (Thursby & Juge, 2017), haciendo del intestino un tejido vulnerable y expuesto a los patógenos. Por todo esto, el tejido linfoide asociado al intestino, GALT, es único dentro del individuo. El GALT es la mayor masa de tejido linfoide en el organismo (Salminen et al., 1998), produciendo aproximadamente el 60% del total de inmunoglobulinas del cuerpo y conteniendo el 70-80% de todos los linfocitos B maduros (Brandtzaeg et al., 1989). Junto a la lámina propia y el epitelio, la estructura más característica del GALT son las placas de Peyer, folículos linfoides localizados en la mucosa que no solo eliminan los patógenos presentes en el intestino, sino que también median en el equilibrio entre las especies que forman la microbiota (Shi, Li, Duan, & Niu, 2017). ¿Pero cómo existir este equilibrio entre las especies “positivas” y las “negativas”? Podríamos considerar que la diferencia entre una bacteria comensal y una patogénica es el “objetivo” de su interacción con el hospedador y el resultado que esperan obtener. Los microorganismos patogénicos del intestino realizan procesos infecciosos, que normalmente comienzan con su capacidad para adherirse a la superficie en forma de cepillo de las células intestinales, y causar daño en el epitelio (Magalhaes, Tattoli, & Girardin, 2007). Otra característica que los distingue de los comensales habituales es la presencia en su genoma de las llamadas “islas de patogenicidad”, regiones específicas en sus cromosomas que contienen genes de virulencia que no se encuentran en las cepas comensales o están en mucha menor cantidad (Sabaté, Moreno, Pérez, Andreu, & Prats, 2006). Aunque ambos tipos de bacterias interactúan con el tejido intestinal y el sistema inmune, los microorganismos bacterianos son necesarios en la modulación de la homeostasis (Tien et al., 2006) y colaboran con el tejido de la región (Rakoff-Nahoum, Paglino, Eslami-Varzaneh, Edberg, & Medzhitov, 2004), mientras que los patogénicos parasitan al hospedador y perjudican su correcto funcionamiento (Cossart & Sansonetti, 2004). El sistema inmune innato (SII) no tiene métodos específicos para poder distinguir si uno de estos organismos es positivo o negativo para el organismo, basando su respuesta a que, si un cuerpo extraño penetra el epitelio y es reconocido por un componente inmune, se genera automáticamente una respuesta defensiva.

El sistema inmune, tanto innato como adaptativo, debido a su fuerte interacción con los microorganismos del tracto digestivo, es posiblemente la mayor fuente de comunicación entre la microbiota y el SNC. En la década de los 70 se demostró que la producción de anticuerpos en respuesta a la inyección de antígenos causaba un incremento de la actividad del eje HPA y de

los niveles de corticosterona en suero, con efectos inmunosupresores (Besedovsky, Sorkin, Keller, & Muller, 1975). Años más tarde fue confirmada la correlación inversa entre los niveles de corticosterona en sangre y la producción de inmunoglobulinas por células secretoras del bazo (del Rey, Besedovsky, & Sorkin, 1984), lo que se considera uno de los primeros resultados en vincular una regulación directa entre los sistemas inmune y nervioso. Esta comunicación del sistema inmune al cerebro se realiza mediante citoquinas, a través de nervios aferentes o cruzando la BHE (Dantzer, 2018). Alteraciones en el sistema inmune inducidas por la microbiota intestinal serían reflejadas en las citoquinas que usan las células inmunes para comunicarse, que a su vez repercutirían en otras rutas, incluyendo las ya citadas anteriormente, como el eje HPA (Besedovsky et al., 1975; del Rey et al., 1984) o el nervio vago (Bluthé, Michaud, Kelley, & Dantzer, 1996), conllevando a cambios en el SNC e incluso en el comportamiento del individuo (Dantzer, 2001).

1.5 Receptores Tipo-Toll (TLRs)

Dentro del sistema inmune, la principal relación del organismo con la microbiota es a través del SII, el cual representa la primera línea de defensa inespecífica contra los microorganismos presentes en el intestino. Debido a su incapacidad de generar una memoria inmunitaria a nivel del sistema inmune adaptativo, el SII debe recurrir a otros métodos, como son los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), capaces de detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). El reconocimiento de PAMPs por parte de los PRRs activa una serie de respuestas antimicrobianas que posteriormente llevan a su vez al desarrollo de la inmunidad adaptativa con memoria y específica, a través de linfocitos B y T (Kumar, Kawai, & Akira, 2011).

La idea de la existencia de los PRRs se remonta a 1989, cuando Charles Janeway Jr. propuso la existencia de una serie de receptores expresados por las células del SII que tendrían la capacidad de detectar compuestos de origen microbiano que estuvieran conservados en la evolución (Janeway, 1989). El tiempo no solo confirmó su existencia, sino que demostró la inmensa importancia de estos PRRs, que se han encontrado asociados a multitud de compartimentos subcelulares, e incluso secretados extracelularmente. En la actualidad se dividen en cuatro familias (tabla 1): dos familias citoplásmicas, los *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)* y los *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors (RLRs)*, y dos familias unidas a membranas, los *C-type lectin receptors (CLRs)* y los *Toll-like receptors (TLRs)* (Amarante-Mendes et al., 2018). A lo largo de esta tesis nos centraremos en los TLRs y, específicamente, en el TLR4.

Tabla 1: Las familias de PRRs. Tabla extraída y modificada de (Brubaker, Bonham, Zanoni, & Kagan, 2015).

Familia	Miembros	Dominios compartidos	Localización de los receptores
TLR	1–10 en humanos, 1–9 y 11–13 en ratón	LRR, TIR	Superficie celular, compartimentos endosomales
CLR	Dectin-1, Dectin-2, ... etc.	<i>C-type lectin</i>	Superficie celular
NLR	NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC3–5, NLRP1–9 y 11–14, NAIP1, -2, -5, -6	<i>Nucleotide binding</i> , LRR	Citoplasma, asociados a la membrana endosomal, NLRX1 puede encontrarse en la mitocondria
RLR	RIG-I, MDA5, LGP2	DEXD/H helicasa	Citoplasma

Los TLRs fueron los primeros y mejor caracterizados de los PRRs. Su nombre proviene de su similitud con la proteína codificada por el gen *Toll* identificada en *Drosophila* en 1985 (Hashimoto, Hudson, & Anderson, 1988). En 1996 se encontró el primer homólogo en humanos a los TLRs encontrados en mosca, identificado inicialmente como TIL y al que se le conoce en la actualidad como TLR1 (Taguchi, Mitcham, Dower, Sims, & Testa, 1996). Al año siguiente fue localizado el TLR4 y se demostró su capacidad para inducir la actividad del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) (Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway, 1997), vinculándose por primera vez los TLRs con el SII. En la actualidad estos dos TLRs iniciales ya forman parte de una familia con 10 TLRs en humanos (TLR1–TLR10) y 12 en ratones (TLR1–TLR9, TLR11–TLR13). Los ratones presentan los TLRs 11, 12 y 13 que no se encuentran en humanos, aunque carecen del gen para el TLR10, el único que exhibe actividad anti-inflamatoria dentro de la familia (Fore, Indriputri, Mamutse, & Nugraha, 2020). Basándose en su posición en la célula, ya sea en su superficie o en su interior, los TLRs suelen dividirse en dos subfamilias, estando en el exterior celular los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10, y en el interior celular, restringidos al endosoma, los TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 y TLR13 (Kawasaki & Kawai, 2014) (figura 3). Todos los TLRs están compuestos de tres regiones bien definidas: un ectodominio con repeticiones ricas en leucina (LRRs) y estructura en forma de herradura, que realiza el reconocimiento con el PAMP objetivo, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático Toll/receptor IL-1 (TIR), encargado de iniciar la cascada de señalización, reclutando proteínas con el dominio TIR, como MyD88 y TRIF, que desemboca normalmente en la activación de los factores de transcripción NF- κ B y la proteína activadora 1 (AP-1), y que conducen a la respuesta inflamatoria (Kawasaki & Kawai, 2014). Ambos factores de transcripción trabajan cooperativamente (Fujioka et al., 2004) en la expresión de citocinas proinflamatorias (Ji, He, Regev, & Struhl, 2019). MyD88 es un

adaptador central compartido por la mayoría de TLRs y los conecta al resto de la cascada molecular, formando el complejo MyD88-IRAK-4, que empieza una cadena de fosforilación de diversas proteínas hasta llevar a la translocación de NF- κ B y AP-1 al núcleo celular para realizar su actividad. Esta vía es conocida como la vía dependiente de MyD88. TLR3, y TLR4 en ocasiones, utilizan en su lugar a TRIF como adaptador, que lleva también a la translocación final de NF- κ B y AP-1 al núcleo. A esta ruta se la conoce como vía independiente de MyD88 o vía dependiente de TRIF. Aunque esta ruta es más lenta que la anterior, la activación de TRIF induce la respuesta del factor de transcripción IRF3 y la producción de interferones (figura 3) (Kawai & Akira, 2006; C. Zheng, Chen, Chu, Zhu, & Jin, 2020).

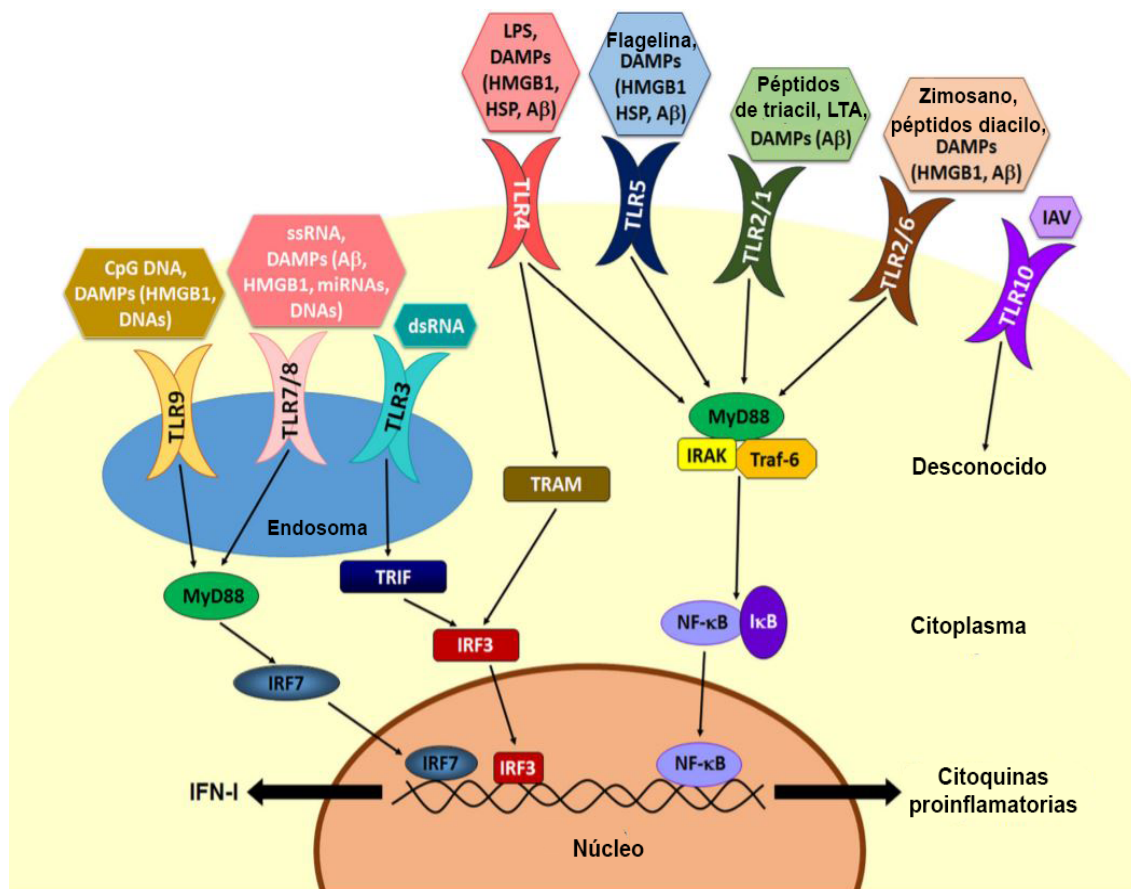


Figura 3: Localización y rutas de señalización de los TLRs en humano. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10 se encuentran en la membrana celular con el receptor en el exterior, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 son citosólicos. Imagen modificada de (María Pascual et al., 2021).

1.6 El receptor TLR4

Dentro de la familia de los TLRs, quizás sea el TLR4 el más estudiado y caracterizado. Como el resto de la familia, reconoce diferentes PAMPs que conllevan a la activación de una cascada molecular hasta generar una respuesta inflamatoria. En el caso del TLR4, su agonista principal es el lipopolisacárido bacteriano o LPS (Vaure & Liu, 2014), aunque también reacciona frente a motivos víricos o incluso productos vegetales como el paclitaxel (Rajput, Volk-Draper, & Ran, 2013), siendo el TLR en humanos con mayor cantidad de agonistas conocidos (Brubaker et al., 2015; L. Yu, Wang, & Chen, 2010). Asimismo, se ha demostrado que patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), compuestos endógenos liberados por las células en condiciones de peligro o daño (Tang, Kang, Coyne, Zeh, & Lotze, 2012), pueden ser reconocidos por el TLR4, como son el ácido hialurónico o la proteína HMGB1 (Ciesielska, Matyjek, & Kwiatkowska, 2020). Su importancia es tal, que no solo se encuentra presente en las características células del sistema inmune, como son los macrófagos y las células dendríticas, sino que el TLR4 ha sido identificado en multitud de tipos celulares no pertenecientes al SII, como son las células endoteliales, miocitos, células tiroideas, endometriales, adipocitos, células β del páncreas (Garay-Malpartida et al., 2011) y epitelio intestinal (Dheer et al., 2016). Tanto su función biológica básica (respuesta inmune y proinflamatoria) como su vía de señalización están muy conservadas dentro de los mamíferos (Rehli, 2002), lo que es un indicador de su relevancia para el organismo.

La estimulación de la célula por el LPS no ocurre por la unión única con el TLR4, sino que requiere la participación de al menos cuatro moléculas: TLR4, MD-2, CD14 y la proteína de unión al LPS (LBP, por sus siglas en inglés) (Miyake, 2007). Más concretamente, el complejo receptor consistiría en el TLR4 y el MD-2, mientras que el LBP cataliza la transferencia del LPS de la membrana externa de las bacterias Gram – hasta el CD14, quien a su vez uniría el lipopolisacárido con el complejo receptor (Miyake, 2007). Una vez el TLR4 es activado por su agonista, sucede una oligomerización y recluta a sus adaptadores mediante interacciones con el dominio TIR. Se conocen cinco proteínas adaptadoras con dominio TIR, que son MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM, y es interesante saber que el TLR4 es el único de la familia TLR capaz de utilizar todas estas proteínas (Lu, Yeh, & Ohashi, 2008) (figura 3).

La situación de este receptor en el intestino es excepcional en comparación con el resto del organismo. A pesar de la elevada densidad de bacterias, y por tanto de LPS, en condiciones normales no hay un estado inflamatorio crónico que sería esperable. El TLR4 expresado por las células del intestino epitelial tiene una respuesta menor al de otros tejidos (Abreu et al., 2002). Esto se debe a que las células del intestino, no solo las epiteliales, desarrollan a lo largo de la

maduración del individuo una tolerancia única a la presencia del LPS. Estudios *in vitro* con células del sistema inmune, como los macrófagos periféricos, mostraron que tras expuestos al LPS, en exposiciones posteriores presentaban una disminución en la liberación de citocinas inflamatorias. Los mecanismos para limitar la respuesta al LPS no son comunes entre las células, sino que los distintos tipos celulares desarrollan estrategias diferentes, ya que los mencionados macrófagos periféricos regulan a la baja el TLR4, mientras que los monocitos regulan a la baja las proteínas IRAK y reducen el reclutamiento de la molécula adaptadora MyD88 (Abreu et al., 2001). Mutaciones en el gen del TLR4 también modifican su respuesta frente al LPS (Arbour et al., 2000). Aun así, esta tolerancia no es inalterable, siendo el TLR4 uno de los principales responsables de la inflamación crónica en el tracto gastrointestinal (Hausmann et al., 2002; J. C. I. Singh et al., 2005).

1.7 Cuando falla el equilibrio: disbiosis

Con un equilibrio tan complejo y tantos factores involucrados, no es de extrañar que esta homeostasis pueda ser rota, un suceso llamado disbiosis, que se caracteriza por la pérdida de microorganismos beneficiosos, la aparición y/o incremento de microorganismos patógenos, y/o la disminución de la biodiversidad microbiana (Carding, Verbeke, Vipond, Corfe, & Owen, 2015), sucesos que no son excluyentes entre sí. En los casos graves se desencadenan alteraciones en la barrera mucosa y un aumento de la permeabilidad del epitelio intestinal (el llamado “leaky gut”), debido principalmente a la ruptura de las uniones estrechas entre las células (Kinashi & Hase, 2021). Estos efectos conllevan a un incremento en la translocación de las bacterias y sus componentes a la circulación sistémica, destacando el LPS, con la subsecuente activación del sistema inmune y el estado inflamatorio, que conduciría a un bucle donde va en aumento el daño al tejido (figura 4) (Schipa & Conte, 2014).

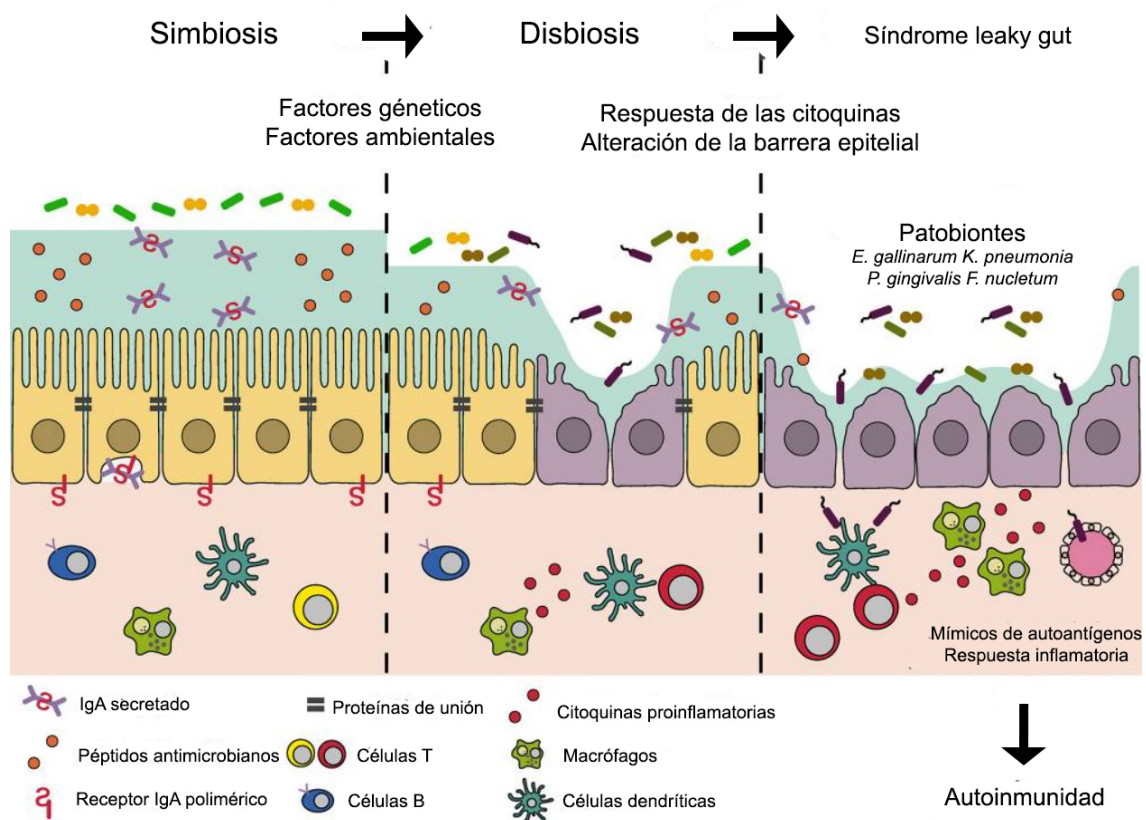


Figura 4: Evolución del estado de disbiosis. Imagen modificada de (Kinashi & Hase, 2021).

Las enfermedades provenientes o en las que la disbiosis es un factor de riesgo no son únicamente del tracto gastrointestinal, como las enfermedades inflamatorias intestinales (Tamboli, Neut, Desreumaux, & Colombel, 2004), o el cáncer colorrectal (Sánchez-Alcoholado et al., 2020). Otros trastornos extra-intestinales se han visto relacionados con la disbiosis, como son el cáncer de pecho y hepático (Zitvogel et al., 2015), la diabetes tipo 1 (Han et al., 2018) y 2 (Gurung et al., 2020), enfermedades cardiovasculares (J. Ma & Li, 2018) y desordenes psiquiátricos (Moos et al., 2016). Es importante tener en cuenta que en estas enfermedades la actividad del sistema inmune y la presencia de la inflamación suelen jugar un papel importante.

Los antibióticos son la principal causa de disbiosis en la microbiota normal en las sociedades modernas (Ramirez et al., 2020). La capacidad del antibiótico para alterar la microbiota intestinal no es común a todos, sino que depende de su espectro de actividad (cuantos más organismos sean capaces de afectar, mayor será su efecto), la farmacocinética, las dosis usadas y el tiempo que sea administrado. Mayores dosis, durante un tiempo más prolongado, tienen mayores impactos en los microorganismos intestinales. También se ha visto una correlación con la absorción del fármaco, en donde antibióticos con peor captación intestinal, y que por tanto permanecen en mayor cantidad a lo largo del tubo intestinal, tienen mayores efectos en la microbiota. Una vez los tratamientos con agentes antimicrobianos

finalizan, la microbiota se recupera con una abundancia de especies bacterianas similar a la previa a la administración de los fármacos (lo que podríamos considerar como su núcleo bacteriano, mencionado anteriormente) pero conservando modificaciones residuales con riesgo patogénico (Crowell, Amir, Tegatz, Barman, & Salzman, 2009). El daño sobre las especies bacterianas tampoco es homogéneo, siendo el filo Firmicutes, un filo Gram +, el más susceptible al tratamiento con antibióticos (Crowell et al., 2009), lo que puede llevar al aumento de poblaciones Gram – y de la presencia de LPS en el futuro. El uso de los antibióticos se ha visto asociado con diarrea, infección por *Clostridium difficile* y, durante la infancia, problemas en el desarrollo de una microbiota sana que desembocaba en enfermedades inflamatorias intestinales (Ramirez et al., 2020).

Siendo la dieta el principal factor que condiciona la microbiota, es también una causa habitual de disbiosis. Es sabido que cambios rápidos en la dieta de los individuos se reflejan en su microbiota, desplazando aquellas especies menos adaptadas asociadas a modificaciones en los macronutrientes ingeridos, por otros organismos que se ven beneficiados en el cambio (David et al., 2014). Dietas ricas en grasas originan una microbiota con elevada presencia de LPS, que alcanza el torrente sanguíneo y provoca endotoxemia metabólica, con riesgo de diabetes y otros desordenes relacionados (Cani et al., 2007). En la llamada “dieta occidental”, una dieta con exceso de grasas y azúcares refinados y baja cantidad de fibra y vitaminas, se ha comprobado que la microbiota originada es en parte responsable de la obesidad en los individuos (Turnbaugh, Bäckhed, Fulton, & Gordon, 2008). Precisamente uno de los elementos más unidos a la dieta del ser humano, el alcohol, es también un reconocido causante de disbiosis, y lo desarrollaremos en el siguiente apartado.

1.8 Etanol y microbiota

El etanol, término que usaremos como sinónimo de alcohol a lo largo de esta tesis, es un compuesto orgánico de fórmula C_2H_6O , en concreto un hidrocarburo alifático que posee un grupo hidroxilo unido. En condiciones ambientales, es un líquido incoloro, volátil e inflamable, considerado una droga recreativa y psicoactiva y el ingrediente que da su nombre a las bebidas alcohólicas. Como curiosidad, hasta el momento no se ha encontrado ningún tejido o función biológica que sea beneficiado por el consumo de etanol, en cualquier cantidad, y la microbiota no es la excepción a esta regla.

El consumo de etanol como responsable de disbiosis y del sobrecrecimiento de las bacterias intestinales tanto en humanos como en roedores es un hecho demostrado por multitud de estudios (Bull-Otterson et al., 2013; Engen, Green, Voigt, Forsyth, & Keshavarzian, 2015;

Mutlu et al., 2012; Yan et al., 2011). Además, la disbiosis ocasionada por el consumo crónico de alcohol se prolonga en el tiempo, presentando la misma disbiosis en la microbiota asociada a la mucosa, tanto en los alcohólicos activos como en aquellos que llevan un periodo extenso de sobriedad (Mutlu et al., 2012). También tiene la capacidad de causar por sí mismo un aumento de la permeabilidad intestinal, el “leaky gut” mencionado anteriormente (Bishehsari et al., 2017). De hecho, el aumento de la translocación bacteriana es uno de los primeros efectos negativos ocasionados, incluso anterior a cambios significativos en la microbiota (Yan et al., 2011).

En el caso del consumo de alcohol, a la disbiosis asociada se le añaden los efectos tóxicos del etanol, como el malfuncionamiento de la barrera intestinal (Bull-Otterson et al., 2013) o las alteraciones en el sistema inmune (Yan et al., 2011), multiplicándose el daño. Los efectos tóxicos del etanol se ven aumentados por la alteración negativa de la actividad de la microbiota. Este efecto se puede observar en las lesiones hepáticas inducidas por el alcohol, correlacionadas también con la actividad del sistema inmune y la concentración de endotoxinas en el plasma, y en las que el tratamiento con antibióticos reduce el deterioro (Adachi, Moore, Bradford, Gao, & Thurman, 1995; Enomoto et al., 1999). El “leaky gut” y la endotoxemia mediados por el etanol son responsables de otros trastornos más graves como la esteatohepatitis alcohólica, cuando estos no son tratados (Keshavarzian et al., 2009). Antes de terminar, comentar sin embargo que, aunque la microbiota es parte del problema en el daño por el consumo de etanol, no puede menospreciarse su utilidad como parte de la solución. Se ha demostrado que los cambios en la microbiota asociados con el abuso debido al alcohol, como en la enfermedad hepática alcohólica, pueden ser prevenidos en ratones tras la administración del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (Bull-Otterson et al., 2013).

2 MicroARNs

MicroARNs (miARNs) es el término usado para referirse a moléculas de ARN de pequeño tamaño, ~22 nucleótidos, que tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante su interacción con el ARN mensajero (ARNm) (Bartel, 2018). Esta regulación suele ser mediante una represión de la traducción del ARNm, mayoritariamente impidiendo que comience, aunque en algunos casos puede reprimirla después de ser iniciada; o por degradación controlada del ARNm. El mecanismo de acción consiste, en la mayoría de los casos, en una desadenilación del ARNm debida a la unión del miARN desencadenando la degradación del mensajero de 5'-a-3' (Huntzinger & Izaurralde, 2011). Estos mecanismos de degradación son más frecuentes que los de represión de la traslación (Huntzinger & Izaurralde, 2011). Aunque

ocurre con menos frecuencia, se ha comprobado que los miARNs, en situaciones concretas, pueden tener efectos en el aumento de la expresión génica en sus ARNm objetivos, e incluso en los mismos miARN-ARNm la actividad puede ser positiva o negativa dependiendo de las condiciones (Orang, Safaralizadeh, & Kazemzadeh-Bavili, 2014).

La primera vez que se registra la existencia y funcionamiento de los miARNs fue en 1993, por Lee y colaboradores, cuando observaron que el gen *lin-4* en *C. elegans* no codificaba una proteína, sino un transcripto con secuencias complementarias al ARNm del gen *lin-14*, y sugirieron que era capaz de regularlo mediante una interacción ARN-ARN antisentido (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Posteriormente, en el mismo organismo, se encontró que el gen *let-7* codificaba un ARN de 21 nucleótidos que era complementario a elementos de los genes *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* y *daf-12*, estipulando que *let-7* podría regularlos temporalmente (Reinhart et al., 2000).

La mayoría de los miARNs se sintetizan a partir de hebras de ARN más largo, bicatenarias, que se escinden secuencialmente en fragmentos más cortos por enzimas ribonucleasa III (ARNasa) especializadas, con ayuda de proteínas de unión al ARN bicatenario específicas (figura 6). La ARN polimerasa II produce estas largas secuencias iniciales llamadas pri-miARNs. *Drosha*, la ARNasa III de los mamíferos, interacciona con DGCR8, su proteína de unión al ARN, para formar un complejo que escinde esta primera secuencia en varios pre-miARNs (que un solo pri-miARN de lugar a varios pre-miARNs permitiendo la expresión de distintos miARNs de forma simultánea que actuarán de forma coordinada en un solo proceso). Un receptor y transportador nuclear, la exportina-5 (XPO5), reconoce los extremos y exporta los pre-miARNs del núcleo al citosol, a través de nucleoporos. En el citosol una segunda ARNasa III, *Dicer-1*, corta el pre-miARN para formar un mi-ARN-miARN dúplex de ~22 nucleótidos. De la misma forma que *Drosha* se une a *DGCR8*, *Dicer-1* tiene dos proteínas de unión al ARN que participan en la especificidad y la zona de corte del enzima. Como dato, existe otra enzima llamada *Dicer-2* que se encarga de generar los ARNip. Una de las dos hebras del dúplex de miARN tendrá la función de guiar a las proteínas AGO, formando el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) hasta el ARNm objetivo, que debe ser complementario con una región del miARN de 6-8 nucleótidos conocida como la “región semilla”, mientras que la otra será degradada (Ameres & Zamore, 2013) (figura 5). Debido al pequeño tamaño de la región semilla, un ARNm puede ser modulado por múltiples miARNs (Ni & Leng, 2015; S. Wu et al., 2010), y el mismo miARN puede actuar sobre cientos de ARNm (Ni & Leng, 2015).

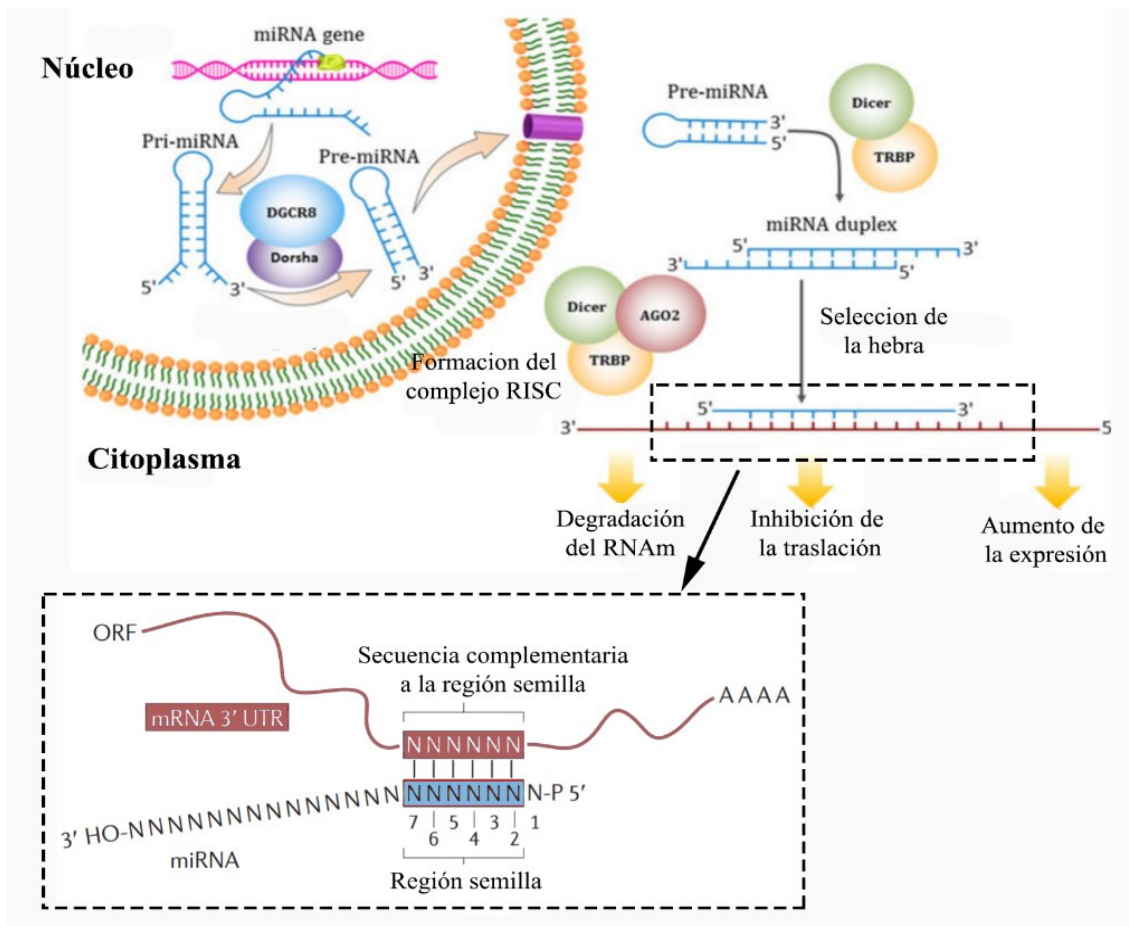


Figura 5: Estructura y biogénesis de los miARNs. Imagen extraída y modificada de (Moein et al., 2019) y (Huntzinger & Izaurralde, 2011).

Siendo tan relevantes en la regulación de la expresión génica, y, por tanto, en la regulación del organismo, no es sorprendente el hallazgo de su interacción con la microbiota intestinal en el sistema digestivo y el mantenimiento de la homeostasis (Belcheva, 2017) (figura 6). En pruebas con organismos GF, ratones GF colonizados con microbiota libre de patógenos mostraban un perfil de expresión de miARNs muy distinto al que tenían antes de la colonización por los microorganismos (Dalmaso et al., 2011), tanto en el íleon como en el colon. En otro estudio similar, ratones GF mostraban diferente expresión de miARNs que sus contrapartes control, en las mismas condiciones, exceptuando la presencia de microbiota (N. Singh et al., 2011). Esta regulación génica a nivel de miARNs por parte de la microbiota no es solo a nivel del tejido intestinal, sino incluso a nivel celular individual. Algunos miARNs de células madre del epitelio intestinal responden de forma muy específica a las especies bacterianas cercanas, controlando su proliferación (Peck et al., 2017).

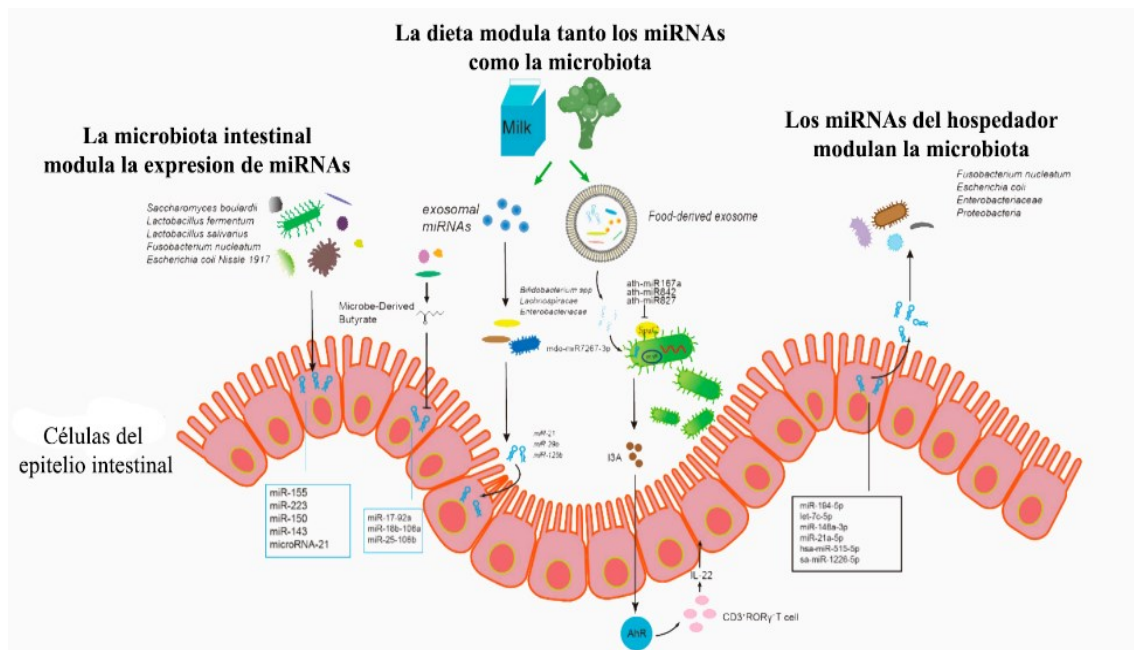


Figura 6: Resumen de las interacciones entre la microbiota y los miARNs del hospedador. Algunos miARNs pueden ser liberados e interactuar con las bacterias de forma directa. Las bacterias pueden modificar la expresión de los miARNs celulares. Imagen modificada de (Bi, Zhang, Chen, & Diao, 2020).

Múltiples enfermedades del aparato digestivo donde la microbiota juega un papel relevante, como son las enfermedades inflamatorias intestinales, también presentan alteraciones clave en los miARNs, que pasan a tener una actividad perniciosa (Moein et al., 2019). (Yuan, Burns, Subramanian, & Blekhman, 2018) teorizaron que, en el caso del cáncer colorrectal, los miARNs podrían estar vinculados con el aumento de taxones bacterianos patogénicos, debido a un incremento en la producción de glicanos. De la misma manera, se ha planteado que la capacidad para aliviar enfermedades por parte de especies probióticas sea en gran medida por su impacto en los miARNs (Rodríguez-Nogales et al., 2017).

Además, los miARNs son capaces de modificar la microbiota (figura 6). Esto se logra no solo por cambios en el tejido debidos a los miARNs, las células del hospedador son capaces de liberar miARNs al interior del tubo digestivo que pueden penetrar en las bacterias y regular su expresión génica y crecimiento (S. Liu et al., 2016).

El consumo de alcohol es otro factor que modifica la expresión de miARNs en el organismo (Miranda, 2014). Aunque estas modificaciones pueden ocurrir por diversos mecanismos, el más general es una inhibición en la metilación génica (Marutha Ravindran & Ticku, 2005; Ponomarev, Wang, Zhang, Adron Harris, & Dayne Mayfield, 2012; Sakharkar, Zhang, Tang, Shi, & Pandey, 2012). El primer estudio donde se vincula directamente el efecto del etanol sobre miARNs fue en 2007, cuando se comprobó que el etanol tenía efectos teratogénicos al modificar la expresión de diversos miARNs (Sathyan, Golden, & Miranda, 2007). Numerosos

estudios surgieron después relacionando el etanol con alteraciones perjudiciales en miARNs que se reflejan en un daño al organismo. Se ha encontrado esta relación en inflamación y daño hepático (Bala et al., 2012; Dolganiuc et al., 2009), e incluso en regeneración ósea (Sampson et al., 2011). La mayoría de los estudios se han centrado en la relación de las alteraciones del etanol en el SNC y cambios en el patrón de los miARNs (Miranda, 2014). Dichas alteraciones no son solo teratogénicas como fue el primero realizado, sino que las modificaciones de miARNs por el etanol estarían relacionadas prácticamente con todos los tipos de daños que causa en el SNC (Guo, Chen, Carreon, & Qiang, 2012; Lewohl et al., 2011; van Steenwyk, Janeczek, & Lewohl, 2013).

3 Sistema Nervioso Central

El SNC es la parte del sistema nervioso que consiste en el encéfalo y la médula espinal. En este trabajo nos centraremos en el encéfalo, concretamente en el cerebro, que forma el encéfalo junto al cerebelo y el tronco cefálico. A su vez, tanto el SNC como el cerebro se pueden dividir en materia gris y materia blanca. La materia gris consistiría en las neuronas (la elevada concentración de cuerpos neuronales es la razón del color) y sus prolongaciones sin mielina, y la materia blanca serían los axones y los oligodendrocitos. En el cerebro, la materia gris se encuentra en la zona más superficial, formando la corteza, y en áreas internas del cerebro, como el hipotálamo. De hecho, la razón de las circunvoluciones cerebrales es aumentar la superficie en la que pueden disponerse las neuronas (Mercadante & Tadi, 2021).

Con 100 billones de neuronas y más veces esa misma cantidad en células gliales, economizando todo el espacio disponible, el cerebro humano no es solo único dentro de todos los seres vivos, sino que es lo que nos hace a nosotros únicos dentro de todos los seres vivos (Herculano-Houzel, 2009).

3.1 El Sistema inmune en el cerebro

Aunque el SNC se encuentra protegido tanto por las células mieloides, propias del tejido, como por células externas que en ciertas condiciones pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Las principales células mieloides en el SNC están representadas por la microglía (Peruzzotti-Jametti, Willis, Hamel, Krzak, & Pluchino, 2021). La microglía son los macrófagos característicos del SNC, adaptados a su tejido de residencia, de forma similar a las células de Kupffer en el hígado (Bonnardel et al., 2019). La microglía se genera inicialmente en

el saco vitelino por hematopoyesis, de donde se moverán al cerebro en el momento en el que se establece la circulación embrionaria, y no alcanzarán la madurez completa hasta después del nacimiento. Una vez en el SNC, son capaces de mantener la población renovándose por sí mismos, sin requerir de los monocitos sanguíneos (Brioschi, Zhou, & Colonna, 2020; Bruttger et al., 2015), dependiendo principalmente de dos citoquinas: CSF1, producida tanto por la microglía como por neuronas, e IL-34, producida únicamente por las neuronas (Brioschi et al., 2020). En situaciones normales, la microglía se reemplaza a una media del 28% de su población al año, con una vida media por célula de más de 4 años (Réu et al., 2017). Las condiciones y el entorno del SNC son imprescindibles para la microglía.

Aunque no son propiamente parte del SI y su reacción a los estímulos es diferente a la microglía, es necesario comentar que los astrocitos también contribuyen a la respuesta del SII (Butchi, Du, & Peterson, 2010). Los astrocitos expresan diferentes TLRs, entre ellos el TLR4, y la activación del TLR4 en estas células induce una cascada molecular mediada por NF- κ B, MAPK y Jak1/Stat1 que desemboca en la generación de un ambiente proinflamatorio (Gorina, Font-Nieves, Márquez-Kisinousky, Santalucia, & Planas, 2011).

En la periferia del SNC, como las meninges, la mayoría de las células del SI son linfocitos, B y T, con una minoría de monocitos y macrófagos (Peruzzotti-Jametti et al., 2021). Este SI periférico al encéfalo tiene la capacidad de colaborar con el SNC cuando se requiere su ayuda y existe una comunicación entre ellos (Rustenhoven et al., 2021). Sin embargo, estas células del SI externas al SNC que son reclutadas al cerebro, como los monocitos, cuando la causa del reclutamiento cesa dichas células desaparecen de la zona, sin contribuir a la población de la microglía residente (Rustenhoven et al., 2021). La única excepción es que nos encontremos también con una disminución importante de la microglía, condición en la que los monocitos son capaces de diferenciarse en macrófagos con rasgos comunes a la microglía (Guilliams & Scott, 2017).

A pesar de que su función es proteger la homeostasis, existe la situación de que las células mieloides que patrullan el exterior del SNC hayan sido implicadas en procesos inmunopatológicos (Goldmann et al., 2016). Por ejemplo, la esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune del SNC que es iniciada por linfocitos T autoinmunes (Lodygin et al., 2013). En estas situaciones anómalas, las células inmunes son capaces también de atravesar la barrera hematoencefálica, un proceso que se ve aumentado cuanto mayor es la permeabilidad del endotelio y que los propios trastornos tienden a incrementar (Larochelle, Alvarez, & Prat, 2011).

La actividad descontrolada del SI causa importantes daños en el SNC. Dicha actividad tiene relación con multitud de enfermedades, desde la esclerosis múltiple (Lodygin et al., 2013)

y el Alzheimer (Perlmutter, Scott, Barrón, & Chui, 1992) hasta la narcolepsia (Fontana et al., 2010). En muchas ocasiones, parte del daño se debe a una respuesta inflamatoria exacerbada a la que contribuye la activación del TLR4, un receptor fuertemente expresado por la microglía (Hines, Choi, Hines, Phillips, & MacVicar, 2013). (Yao et al., 2013) vieron que el TLR4 es uno de los principales responsables de la inflamación inducida por hipoxia, iniciando la ruta del NF- κ B en la microglía, y que su inhibición tendría efectos neuroprotectores en situación de hipoxia. En la enfermedad de Huntington, la deficiencia de este TLR, junto a los TLRs 2 y 3, aumentaba la esperanza de vida de los ratones con la enfermedad (Griffioen, Mattson, & Okun, 2018), mientras que solo la ausencia de TLR4 ya prolongaba la vida de ratones modelo para la esclerosis lateral amiotrófica (J. Y. Lee, Lee, Phipps, Noakes, & Woodruff, 2015). En otras enfermedades como el Alzheimer, su papel como contribuidor del daño o protector parece depender del contexto del individuo (Fiebich, Batista, Saliba, Yousif, & de Oliveira, 2018). Además, las células del SI no serían las únicas responsables del daño, sino que la activación del TLR4 en los astrocitos también puede estar vinculada a ciertos trastornos o contribuir de forma negativa (Shen et al., 2016).

3.2 Etanol y SNC

Teniendo en cuenta que el alcohol es una droga inespecífica con un consumo ampliamente extendido entre la población, el estudio de sus efectos en el cerebro es un tema de gran importancia e interés tanto a nivel sanitario, como social y económico. La molécula de alcohol solo es capaz de interactuar con otras biomoléculas mediante puentes de hidrogeno y débiles interacciones hidrofóbicas, lo que limita su potencia como droga, careciendo además de dianas directas (Yamakura, Lewohl, & Harris, 2001), pero se compensa por las elevadas cantidades en las que es ingerido (Abrahamo, Salinas, & Lovinger, 2017). Sus efectos en el cerebro dependen tanto de la concentración alcanzada en sangre, como de la tolerancia del individuo, que se “entrena” en los bebedores habituales, llegando casos excepcionales registrados a concentraciones en sangre de 300 mM (8 veces la cantidad que podría matar a un individuo que nunca hubiera bebido) (Johnson, Noll, & Rodney, 1982). En esta tesis nos centraremos en el consumo crónico de alcohol, en el cual los individuos beben una cantidad moderada de alcohol, pero con gran frecuencia.

Uno de los problemas del alcohol es precisamente su facilidad para alcanzar el cerebro. La BHE, que protege el cerebro de sustancias extrañas, es ineficaz frente a la molécula del etanol, pequeña y lipofílica, que puede atravesarla sin impedimentos mediante difusión pasiva. No es algo único de esta molécula, sino que otras drogas de propiedades similares son también

capaces de atravesar esta membrana por el mismo método, como son la nicotina o la heroína. Además, el consumo crónico de alcohol deteriora la BHE aumentando su permeabilidad y la translocación de sustancias (Haorah, Knipe, Gorantla, Zheng, & Persidsky, 2007; H. Yu et al., 2017).

En los consumidores crónicos se desarrollan alteraciones que llevan tanto a un aumento de la tolerancia como de la dependencia, requiriendo mayores cantidades para obtener los mismos efectos y con graves dificultades en situaciones de abstinencia (Heilig, Egli, Crabbe, & Becker, 2010). Es interesante que, sobre todo en los crónicos, la ingesta de alcohol conduce a cambios específicos en regiones del cerebro y en circuitos neuronales, lo que podríamos llamar neuroadaptaciones, que participan en la evolución de una ingesta moderada a una excesiva y vuelven al individuo, a nivel del SNC, más propenso al consumo incontrolado (Ron & Barak, 2016). Las regiones del SNC más afectadas por el consumo crónico, y que además correlacionan con la dependencia al alcohol, se pueden dividir en cuatro circuitos: el de recompensa, formado por el núcleo accumbens, su análogo el pálido ventral y el hipotálamo; el motivacional, regido principalmente por la corteza orbitofrontal; la memoria y el aprendizaje, formados por la amígdala y el hipocampo; y finalmente el control cognitivo, regido por la corteza prefrontal y la cíngula (Vilpoux, Warnault, Pierrefiche, Daoust, & Naassila, 2009).

El etanol puede mediar cambios epigenéticos. Similar a lo que hemos comentado en el apartado de los miARNs, el etanol es capaz de modificar la acetilación de las histonas, la metilación del ADN y la expresión de los miARNs (Ron & Barak, 2016).

Otro de los efectos del etanol es la respuesta inflamatoria, un efecto que es especialmente perjudicial en el SNC. La neuroinflamación mediada por el etanol es un proceso muy estudiado y se considera uno de los principales responsables de su capacidad neurotóxica. El etanol causa la activación de distintos receptores del SII en células gliales, que desemboca en un ambiente inflamatorio y daño neuronal (Guerra & Pascual, 2019). Es destacable que en la activación de la microglía mediada por el etanol el papel principal corresponde al TLR4 (Fernandez-Lizarbe, Pascual, & Guerra, 2009). El metabolismo posterior de las moléculas de alcohol genera además especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y acetaldehído (Deitrich, Zimatkin, & Pronko, 2006; McClain, Hill, Song, Deaciuc, & Barve, 2002), todos ellos proinflamatorios y nocivos para el cerebro.

Finalmente, el etanol modifica las células y sus funciones mediante alteraciones en sus membranas plasmáticas, por ejemplo, aumentando la ratio de colesterol frente a fosfolípidos, lo que supone un cambio en las propiedades físicas de la membrana celular (Chin, Parsons, & Goldstein, 1978). Un resultado importante de estas alteraciones es la modificación de las balsas lipídicas de la membrana celular, microdominios enriquecidos en colesterol y esfingomielina,

donde ocurre el reclutamiento de complejos del SI asociados a membrana como los TLRs (Szabo, Dolganiuc, Dai, & Pruett, 2007). De hecho, (Pascual-Lucas, Fernandez-Lizarbe, Montesinos, & Guerri, 2014) mostraron que uno de los responsables de la neuroinflamación debida al etanol era el reclutamiento anómalo causado por el alcohol de receptores TLR4 en balsas lipídicas, provocando su activación. En la figura 7 se puede las rutas mediante las que el etanol causa un proceso inflamatorio que puede llevar a neurodegeneración.

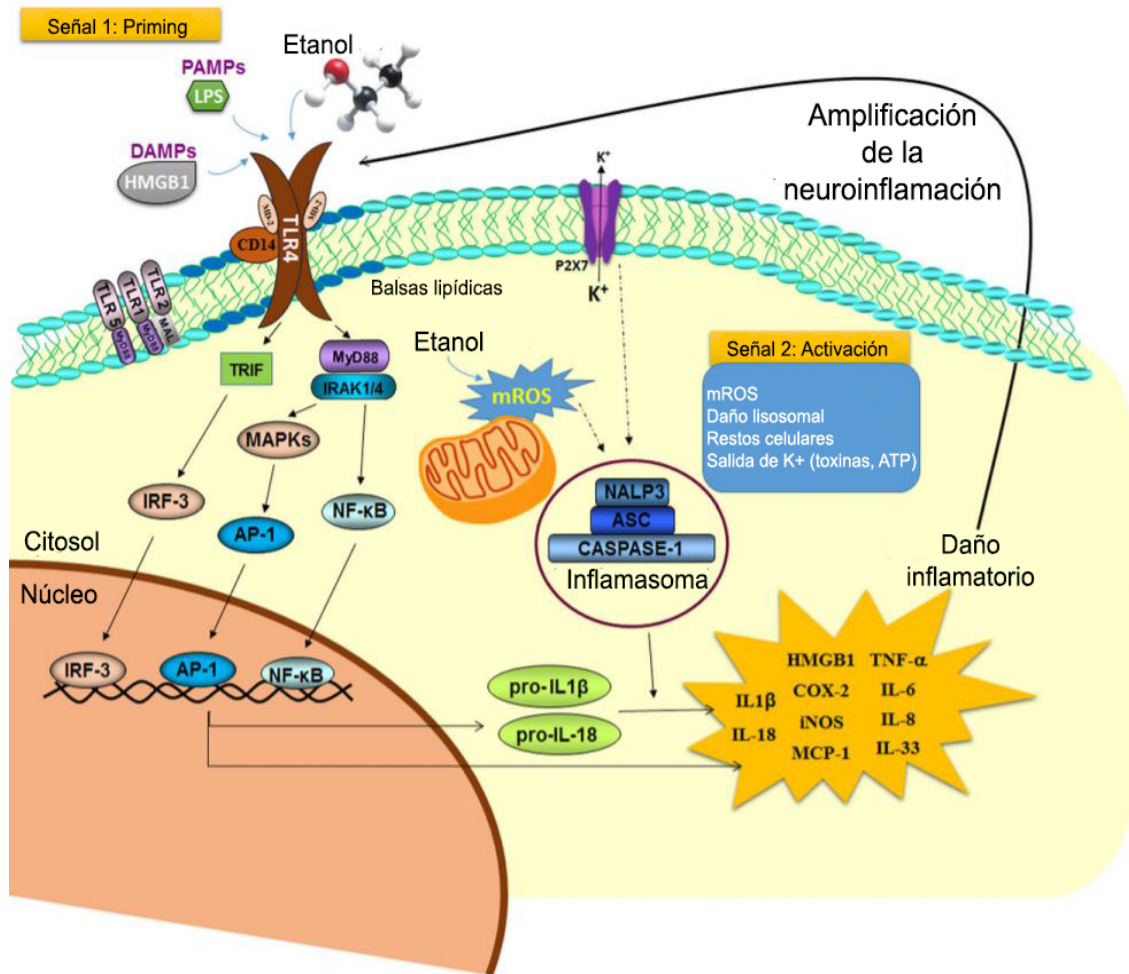


Figura 7: la activación del TLR4 por el etanol desemboca en una cascada celular que causa neuroinflamación. Imagen modificada de (Montesinos, Alfonso-Loeches, & Guerri, 2016)

3.3 El uso de los curcuminoides como terapia

Los curcuminoides son diarilheptanoide lineales, es decir son fenoles naturales cuyo nombre viene de la curcumina, su principal representante y de la que muchos de ellos son derivados de este compuesto (figura 8). La curcumina proviene de la raíz de la planta cúrcuma

(*Curcuma longa*), y aunque la planta ya era usada hace más de 2.000 años en la India, inicialmente su uso era como colorante para la ropa. Posteriormente empezó a usarse en la gastronomía, siendo una de las especias que le da su color característico al curry, y de la que se estudiaron sus efectos positivos dentro del organismo (Basnet & Skalko-Basnet, 2011).

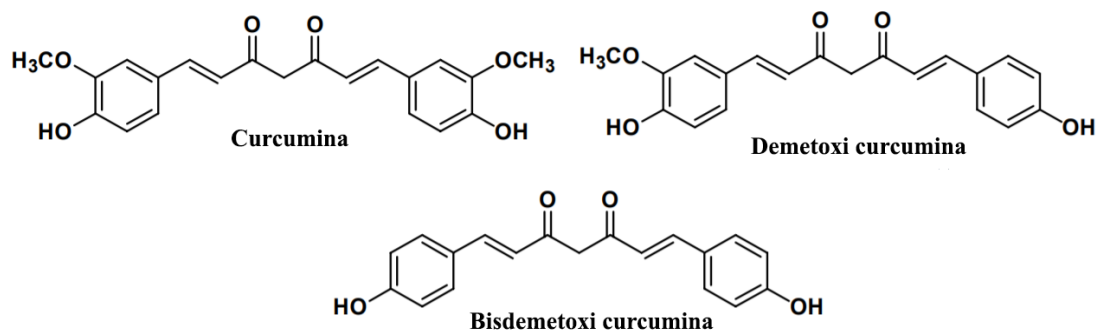


Figura 8: Estructura de los tres principales curcuminoides encontrados en la naturaleza. El curcuminoides conjugado en esta tesis es la bisdemetoxi curcumina. Imagen modificada de (Basnet & Skalko-Basnet, 2011).

Recientemente, ha sido en el campo de la salud donde se ha comprobado su nuevo potencial. En el ser humano, tiene una ventaja adicional para su uso por su baja toxicidad, sin que se presenten síntomas en dosis orales tan elevadas como 12 g/día (Lao et al., 2006). Diversos estudios han comprobado sus beneficios en distintos trastornos, desde cáncer (Wright, Frye, Gorti, Timmermann, & Funk, 2013) hasta su utilidad como antimicrobiano (Reddy, Vatsala, Keshamouni, Padmanaban, & Rangarajan, 2005; Sarkar, De, & Mukhopadhyay, 2016). Sin embargo, el campo donde más ha destacado es su uso para el tratamiento de los trastornos causados por la inflamación (Aggarwal & Harikumar, 2009; Kuptniratsaikul et al., 2014; Mazzolani & Togni, 2013; Panahi, Hosseini, et al., 2016; Trujillo et al., 2013), a lo que se añade su actividad antioxidante (Hewlings & Kalman, 2017; Sahebkar, Serban, Ursoniu, & Banach, 2015).

En relación con su capacidad antioxidante, se ha comprobado un incremento significativo en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés) en suero cuando se suplementan curcuminoides en la dieta durante 6 o más semanas. También, en suero, disminuye los niveles de lípidos peroxidados, incrementa la concentración de glutatión y aumenta la actividad catalasa (Sahebkar et al., 2015). Estas propiedades ya se han probado en tratamientos clínicos de enfermedades como la osteoartritis (Panahi, Alishiri, Parvin, & Sahebkar, 2016).

En cuanto a la inflamación, pruebas *in vitro* han mostrado una disminución en la liberación de citoquinas inflamatorias en multitud de tipos celulares incubados con curcuminoides, desde monocitos y macrófagos (Abe, Hashimoto, & Horie, 1999) hasta células pulmonares (Literat et al., 2001). Esta actividad anti-inflamatoria realizada por los curcuminoides es debida a varios de sus efectos. Una es su capacidad antioxidante comentada anteriormente, ya que son dos alteraciones fisiopatológicas muy vinculadas (Biswas, 2016), pero también a efectos directos como la inhibición de la expresión de COX-2 (Goel, Boland, & Chauhan, 2001) o de la ruta de señalización de TLR4/MyD88/NF- κ B, esta última comprobada en neuroinflamación con activación de la microglía (Zhu et al., 2014).

Sin embargo, desde el punto de vista oral, la efectividad de la curcumina es dudosa. La mayor concentración en alimentos sería un polvo puro de cúrcuma y aun así la curcumina sería únicamente el 3,14% del peso total (Tayyem, Heath, Al-Delaimy, & Rock, 2006). A esto tenemos que añadir que la curcumina, en el organismo, presenta problemas de solubilidad, una pobre absorción y una rápida degradación metabólica (W. H. Lee et al., 2014). Esta degradación se ve aumentada con el incremento del pH y cuanto menor es la concentración de curcumina (Priyadarsini, 2014). Ya en 1978, Wahlstrom y Blennow comprobaron que en una dosis de 1 g/kg de curcumina a ratas, el 75% era excretado con las heces (Wahlström & Blennow, 1978). En humanos la ingestión de 2 g de curcumina pura resulta en niveles, en el suero, prácticamente indetectables. Esto lo que limita es la utilidad terapéutica de los curcuminoides, y al mismo tiempo ha llevado al desarrollo de derivados y métodos para aumentar su biodisponibilidad (Tomren, Måsson, Loftsson, & Tønnesen, 2007), como su administración de forma intravenosa en lugar de oral. Estos métodos suelen dividirse en la combinación con adyuvantes, su unión con nanopartículas (un mecanismo de uso extendido para moléculas hidrofóbicas), unión a liposomas, micelas y complejos fosfolípidos, y el uso de derivados y análogos (método que puede combinarse con los anteriores) (Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2007). En la presente tesis, el curcuminoide usado es la bisdemetoxi curcumina (BDMC), que posee una mayor resistencia a la degradación que la curcumina o la demetoxicurcumina de forma natural (Price & Buescher, 1997).

3.4 Nanopartículas biodegradables capaces de atravesar la BE y paliar las lesiones cerebrales

Las nanopartículas poliméricas son partículas con un tamaño, entre 1 y 1000 nm, elaboradas a partir de materiales poliméricos de diferente naturaleza, y que pueden transportar compuestos activos, tanto dentro de ellas como en su superficie. Su interés como

transportadores de fármacos viene no solo de la capacidad de poder trasladarlos, sino también por su liberación controlada, la protección del fármaco y la mejora de su biodisponibilidad (Zielinska et al., 2020). La razón del uso de polímeros como biomaterial es debido a sus numerosas propiedades favorables, entre las que cabe destacar una gran biocompatibilidad, fácil diseño y preparación (lo que les otorga un gran control de sus propiedades finales) o la variedad de estructuras que pueden adoptar (Bennet & Kim, 2014). Además de su carga, pueden presentar otras moléculas que les ayuden a ir dirigidos frente a células o tejidos concretos (Fortuni et al., 2019).

Las características de la nanopartícula van a delimitar sus posibles funciones, ya que no todas sirven igual como transportadoras, y pequeños cambios en su composición o estructura pueden alterar sus propiedades (Nair, Thulasidasan, Deepa, Anto, & Kumar, 2012). Las principales características que se tienen en cuenta son el tamaño de la nanopartícula (un menor tamaño implica una mayor absorción, pero también menor retención por el tejido) (Yallapu, Jaggi, & Chauhan, 2012), el potencial zeta (indica la repulsión o atracción electrostática entre las partículas, en nuestro caso indica la carga eléctrica en la superficie de la nanopartícula), el índice de polidispersidad (los distintos pesos moleculares de las cadenas que conforman el polímero), la estabilidad física y química, su eficiencia de encapsulación y finalmente su capacidad de carga (S. Wang et al., 2014). En cuanto a la carga que lleven, es importante también como realice su liberación. La mayoría de las veces nos interesa que el fármaco transportado sea liberado en regiones específicas del organismo y de forma controlada. Muchas de las nanopartículas tienen una liberación basada en estímulos ambientales, lo que les da una relativa especificidad, que pueden ser tanto físicos como la presión osmótica hasta químicos, como el pH, o depender de varios estímulos en lugar de uno (R. Cheng et al., 2011). Esta liberación una vez comienza puede ser rápida, sostenida en el tiempo o pulsátil, en ciclos (Zhou et al., 2013).

La unión de curcuminoides con nanopartículas biodegradables basadas en polipéptidos ha supuesto una considerable mejora en su biodisponibilidad, tanto en la administración oral (Y. Gao et al., 2012; X. Xie et al., 2011), como intravenosa (Tsai, Chien, Lin, & Tsai, 2011). La razón de la administración intravenosa frente a la oral es la incorporación directa del compuesto al torrente sanguíneo, evitando la pérdida del conjugado debida a su degradación y expulsión por las heces, pero conllevando una mayor molestia y estrés a los individuos. Una mejoría adicional aportada por estas nanopartículas es su capacidad de añadirles propiedades que los curcuminoides por sí mismos no poseen o mejorar las que tienen interés médico, como un incremento en su captación por las células (Mohanty & Sahoo, 2010) o en su translocación a través del endotelio (T. H. Kim et al., 2011).

En relación con esto, uno de sus mayores logros fue que el compuesto transportado tuviera una penetración incrementada en el cerebro, a pesar de la BHE, y manteniéndola intacta. Aunque algunas moléculas como el etanol puedan hacerlo parecer fácil, atravesar la BHE es una tarea complicada para la mayoría de los compuestos debido a sus propiedades únicas dentro del organismo, como la ausencia de fenestraciones, una fuerte resistencia a moléculas hidrofílicas debido a sus uniones estrechas o un menor número de vesículas endocíticas en comparación a otros endotelios (Theodorakis, Müller, Craster, & Matar, 2017). El movimiento a través de ella se puede hacer por transporte paracelular (casi imposible debido a las uniones estrechas de este endotelio), difusión pasiva, unión a receptores, transcitosis, mecanismos de eflujo y aprovechando células que son capaces de moverse dentro y fuera del cerebro (Theodorakis et al., 2017). Dentro de los receptores en el endotelio de la BHE, los más aprovechados para el transporte de fármacos son el receptor insulínico, el receptor de transferrina y los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP-1 y -2) (Rodríguez-Otormin, Duro-Castano, Conejos-Sánchez, & Vicent, 2019) (figura 9). En el caso específico de los curcuminoides, estas ventajas ya han sido contrastadas. (Tsai et al., 2011) comprobaron que la curcumina unida a una nanopartícula e inyectada de forma intravenosa en los animales presentaba mayores concentraciones en el cerebro que la curcumina libre, y permanecía un mayor tiempo en el órgano, principalmente en el hipocampo y en la corteza cerebral. En el presente trabajo, el polímero polipéptido al que conjugaremos la BDMC utiliza para la traslocación el LRP-1, presentando el conjugado en su superficie angiopoyetina-2, uno de sus principales ligandos, en un método que ya ha sido demostrado que incrementa la translocación al SNC de péptidos neuroprotectores (X. Tian et al., 2020).

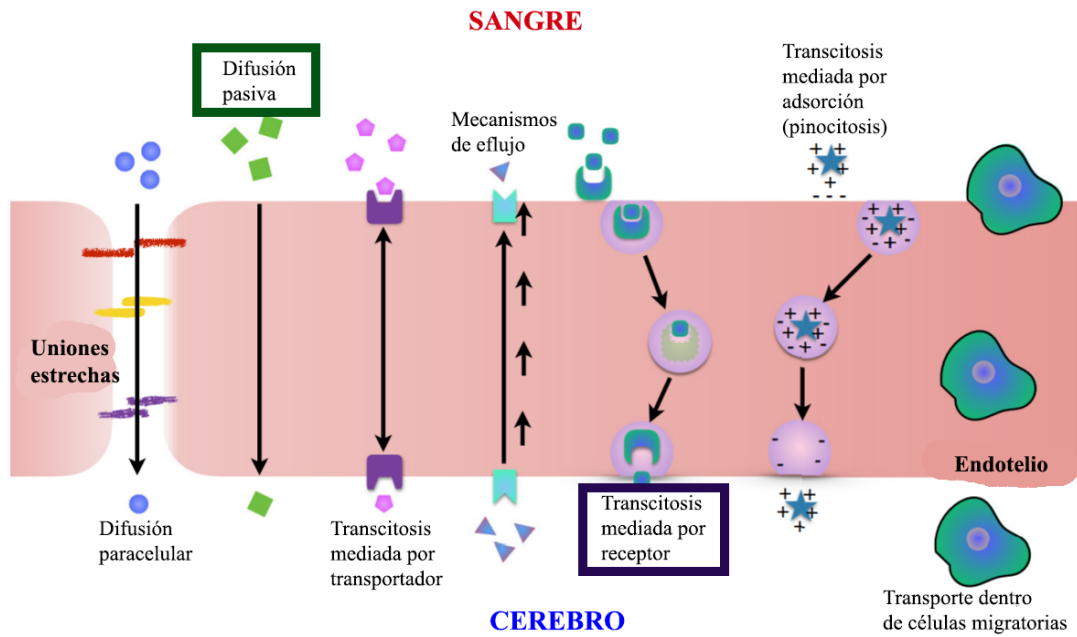


Figura 9: Representación esquemática de los diferentes métodos de transporte a través de la BHE. El etanol entraría principalmente por difusión pasiva (verde), mientras que nuestro nanoconjugado aprovecharía el receptor LRP-1 para entrar (azul). Imagen modificada de (Theodorakis et al., 2017).

Hipótesis y objetivos

Cada vez sabemos más de los procesos por los cuales el etanol es capaz de causar daños en el organismo, pero al mismo tiempo las incógnitas que lo rodean no parecen disminuir en cantidad. Hemos aprendido que el etanol es capaz de atravesar la BHE y provocar múltiples alteraciones en el cerebro, tanto a nivel celular como tisular e incluso epigenético, principalmente debido a su capacidad neuroinflamatoria y a la activación de los receptores TLR4. Sin embargo, el etanol es una molécula que debido a sus propiedades posee complejas interacciones dentro del organismo que dificultan su completo entendimiento. Sabemos que, en el aparato digestivo entre otros, su consumo también ejerce actividad proinflamatoria y alteraciones a lo largo del tiempo, donde el SII tiene un papel principal.

Por todo ello, planteamos como hipótesis de trabajo ***que el consumo crónico de etanol causa modificaciones en los miARNs de la corteza cerebral, regulando la expresión de genes proinflamatorios asociados a la ruta de señalización del TLR4 que causan neuroinflamación y que la administración de un polipéptido conjugado con curcumina reduce los efectos inflamatorios del alcohol en cerebro. Además, proponemos que el consumo de alcohol a largo plazo es capaz de alterar la microbiota intestinal y la respuesta de los receptores TLR4.*** Para abordar esta hipótesis, se han llevado a cabo los siguientes objetivos:

1. Identificar en la corteza cerebral de ratones WT su perfil de expresión de miARNs asociados a la inflamación, y evaluar si el consumo crónico de alcohol altera los niveles de expresión de dichos miRNAs en la corteza cerebral.
2. Investigar si la ausencia del TLR4 modifica los perfiles de miRNAs inflamatorios en corteza cerebral de ratones con o sin consumo crónico de alcohol.
3. Analizar si el tratamiento con un polipéptido nanoconjugado de curcumina, capaz de atravesar la BHE, con propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes, es capaz de disminuir el daño inflamatorio en regiones de la corteza cerebral causado por el consumo crónico de etanol.
4. Investigar si el consumo crónico de alcohol altera la expresión génica del epitelio intestinal, y como se reflejan estos cambios en ratones que carecen del receptor TLR4.
5. Evaluar los cambios en la microbiota intestinal de ratones alcohólicos, en presencia y ausencia del receptor TLR4, mediante la taxonomía de sus poblaciones bacterianas.

Materiales y métodos

Para lograr los objetivos propuestos se empleó un enfoque multidisciplinar, usando técnicas bioquímicas, moleculares y bioinformáticas que se detallan a continuación.

1 Síntesis y caracterización del nanoconjugado

La mayoría de los productos químicos de grado reactivo (grado que indica que cumplen con los estándares de pureza que garantizan la precisión científica y la fiabilidad del análisis químico, las reacciones químicas o las pruebas físicas) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE. UU.) y se usaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Para la síntesis de la nanopartícula conjugada con BDMC se adquirieron cloroformo-d1, DMSO-d6 y D₂O deuterados de Deutero GmbH, (Kastellaun, Alemania). Cy5.5 (6S-IDCC) se adquirió de Mivenion (Berlín, Alemania), la angiopep2-cisteína Ac-TFFYGGSRGKRNNFKTEEYC de Selleck Chemicals LLC (Houston, Texas, EEUU) y el BDMC en TCI Chemicals (Zwijndrecht, Bélgica).

Las propiedades de los distintos conjugados usados en estos estudios se detallan en la tabla 2. El estudio del conjugado curcuminoide fue realizado en colaboración con el laboratorio de Polímeros Terapéuticos del Centro de Investigación Príncipe Felipe, que sintetizaron el polímero y su unión al BDMC.

Tabla 2: Resumen de las características fisicoquímicas de los conjugados usados en la presente tesis. El % de BDMC ha sido determinado mediante UV-Vis y HPLC; el de Cy5.5 mediante fluorometría; la Ang mediante el análisis de sus aminoácidos; y finalmente el potencial Z mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

Compuesto	%w BDMC ^a (%mol BDMC)	%w Cy5.5 ^b (%mol Cy5.5)	%w Ang ^c (%mol Ang)	Tamaño ^d D, nm	Z-pot ^d mV
StClPr-BDMC	14,9% (8,9mol%)	--	--	40,2±2,4	-38,6±2,2
StClPr-BDMC-ANG	14,1 (8,9% mol)	--	14,25% (1,35 mol)	22,1±3,6	-30,6±1,3
StClPr-Cy5,5	--	12,6%	--	--	-20,4±3,5
StClPr-Cy5,5-ANG	--	7,6%	27,16 (3,3 mol)	--	-22,9±2,2

Una representación esquemática de los conjugados y su síntesis viene en la figura 10. BDMC y Cy5.5 se conjugaron con el transportador StClPr usando la forma ácida del transportador. En un matraz de fondo redondo de dos caras, provisto de una barra agitadora y dos septos, disolvimos 1 g de StClPr (7.2 mmol de unidades de ácido glutámico, GAU) en 20 ml de dimetil anhidro formamida (DMF). A continuación, se agregaron 335 ml (2,17 mmol, equivalente a 0,3 GAU) de DIC (diisopropil carbodiimida) en 5 ml de DMF anhidra y se dejó que la reacción ocurriera de forma natural durante 20 min. A continuación, 445 mg (1,44 mmol, equivalente a 0,2 GAU) de BDMC se agregaron a la mezcla, seguido de una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). El pH se ajustó a 7 con la ayuda del compuesto químico N, N-diisopropiletilamina (DIPEA), que actúa como base, y se dejó que la reacción prosiguiera durante 72 h. Pasado ese tiempo, la mezcla se precipitó con éter dietílico en exceso, y se filtró. Hubo una purificación adicional del conjugado usando una columna LH-20 en DMF. Después del aislamiento, se obtiene un sólido amarillento que se convierte en sal mediante la adición de una solución 1 M de NaHCO₃ gota a gota. La solución acuosa se lavó repetidamente con éter dietílico hasta que la fase orgánica perdió el tono amarillento. Finalmente, el producto en fase acuosa se purificó mediante diálisis usando un Vivaspin® MWCO 5000, y fue liofilizado.

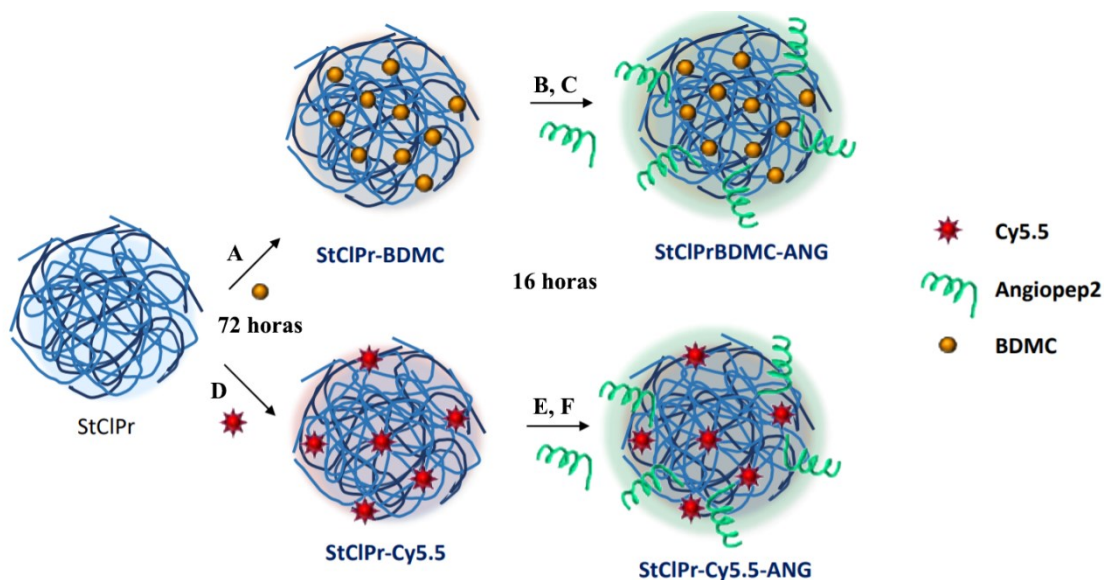


Figura 10. Representación esquemática de las estructuras poliméricas utilizadas en este estudio. **A), D)** Se añaden N, N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC) / 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), N, N-dimetilformamida (DMF), 72 horas a temperatura ambiente (TA). **B), E)** 4-(4,6-Cloruro de dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMMCl), cisteamina piridil ditiol, H₂O, 24 horas, TA. **C), F)** Tampón HEPES pH 7,4, 16 horas, TA.

La carga de BDMC se midió mediante UV-VIS a 405 nm usando una curva de calibración con BDMC libre. Por otra parte, la carga de Cy5.5 (6S-IDCC) se midió por

fluorescencia (λ_{em} : 595 nm, λ_{ex} : 680 nm) utilizando una curva de calibración con el colorante Cy5.5.

La modificación de Angiopep-2 (ANG) se realizó de acuerdo con protocolos estandarizados. Los polímeros se modificaron con un 10% de piridil ditiol (PD) en ambos compuestos, St-CIPr-Cy5.5-PD y StCIPr-BDMC-PD. A continuación, una angiopep con la secuencia modificada en una cisteína, ANG-2-SH, fue conjugada aprovechando la modificación con PD a través de enlaces disulfuro en las diferentes estructuras, todo ello en tampón HEPES a pH 7,4 durante 16 h. Los conjugados finales se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño usando columnas comerciales *Sephadex PD10*. La carga peptídica se estimó mediante H-NMR y UV-VIS a través de la curva de calibración a 280 nm y confirmada posteriormente mediante el análisis de aminoácidos realizados por la *Unitat de Tècniques Separatives i Síntesi de Pèptids* de la Universidad de Barcelona.

Finalmente, el conjugado utilizado en la administración intravenosa en los ratones fue StCIPr-BDMC-ANG (5 mg/kg), consistente en el polipéptido transportador, el curcuminoide y la angiopoyetina-2.

2 Animales y tratamiento de alcohol

Los experimentos se realizaron en ratones C57BL/6J tanto de fenotipo silvestre (“*Wild Type*”, WT, TLR4^(+/+)) (Harlan Ibérica SL, Barcelona) como ratones deficientes para el receptor TLR4, (“*knock-out TLR4*”, TLR4-KO, TLR4^(-/-)), cedidos por el Dr. S. Akira (Universidad de Osaka, Japón). Se utilizaron 28 machos y 109 hembras totales (los machos únicamente fueron usados en el estudio de la microbiota intestinal para las comparativas de sexo) separados en tres cohortes distintas según el objetivo.

Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz y oscuridad (12 / 12h) a una temperatura de 23 \pm 1°C y 60% de humedad, en condiciones de SPF (Specific Pathogen Free) y alojados entre 2 y 4 animales por jaula. El alimento consistió en una dieta sólida ad libitum, *2014 Teklad global 14% protein rodent maintenance diet* (Envigo, Indiana, EE. UU.) (48% de carbohidratos, 14,3% de proteínas y 4% de grasas, 2,9 kcal / g de densidad energética). El aumento de peso corporal al final del período de tratamiento fue similar en todos los grupos de ratones, independientemente del tratamiento o genotipo. Las hembras se encontraban en cajas aisladas durante los periodos de gestación para evitar situaciones de estrés que pudiesen afectar a los resultados del trabajo.

Los ratones iniciaban el tratamiento alcohólico crónico a los 2 meses de edad, y se les mantenía durante 3 meses, hasta los 5 meses de edad, exceptuando la cohorte usada para el estudio de los curcuminoides, que fueron sometidos al tratamiento alcohólico durante 4 meses para permitir la correcta administración de los otros tratamientos del mismo estudio. Para el modelo alcohólico, los ratones pertenecientes a este grupo se mantenían con agua suplementada con etanol al 10%, mientras que los controles se mantenían solo con agua. Al comienzo del tratamiento, la dosis de alcohol en agua comenzaba al 2%, aumentando el volumen a 5 %, 7.5 % y finalmente 10 %, cada dos días, para permitir que los animales se adaptaran al alcohol.

Los niveles máximos de alcohol en sangre (BAL) alcanzados por los ratones después de los meses de tratamiento crónico con etanol fueron alrededor de ≈ 125 mg / dl (rango, 87-140 mg / dl) en los WT tratados con etanol y alrededor de ≈ 122 mg / dl (rango, 98-135 mg / dl) en los ratones TLR4-KO tratados con etanol, respectivamente. Al finalizar el tratamiento de los animales y después de sacrificarlos, las muestras eran recogidas y congeladas sumergiéndolas en nitrógeno líquido a -196°C antes de guardarse a -80°C hasta ser usadas en posteriores análisis.

Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609 / ECC) y (2010/63/ECC), por el Real Decreto Ley 1201/2005 y 53/2013 modificado por el Real Decreto 1386/218, y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CIPF (CEEA) (Valencia, España).

3 Tratamientos y recogida de muestras

3.1 Tratamiento de ratones WT y TLR4-KO para el estudio de la microbiota intestinal

Para este trabajo se utilizó una cohorte de animales conformada por 28 machos y 24 hembras, que fueron divididos en 4 grupos. Los machos consistían en 8 ratones WT y 8 ratones TLR4-KO para las condiciones de control; y 6 WT y 6 TLR4-KO para el tratamiento crónico del alcohol. Las hembras consistían en 6 ratones WT y 6 ratones TLR4-KO para las condiciones de control; y 6 WT y 6 TLR4-KO para el tratamiento crónico del alcohol.

La recogida y almacenamiento de las muestras fecales en los machos fue realizada en los cuatro grupos (WT, WTE/WE, KO, KOE/KE) al final del tratamiento con o sin etanol. En las hembras hubo también una recogida de muestras fecales previa al inicio de los tratamientos alcohólicos, a los 2 meses de edad, en los 4 grupos. Las muestras de todos los ratones de los diferentes grupos fueron recogidas frescas y guardadas por separado. Una vez que el tratamiento

alcohólico había finalizado y las muestras de heces fueron recogidas, los ratones se sacrificaron con CO₂. Se recogió tejido de colon y de corteza cerebral de los animales sacrificados. El tejido de colon se usó para la extracción de ARN y el tejido de corteza cerebral para el análisis metabolómico. El diseño del experimento se ilustra en la figura 11.

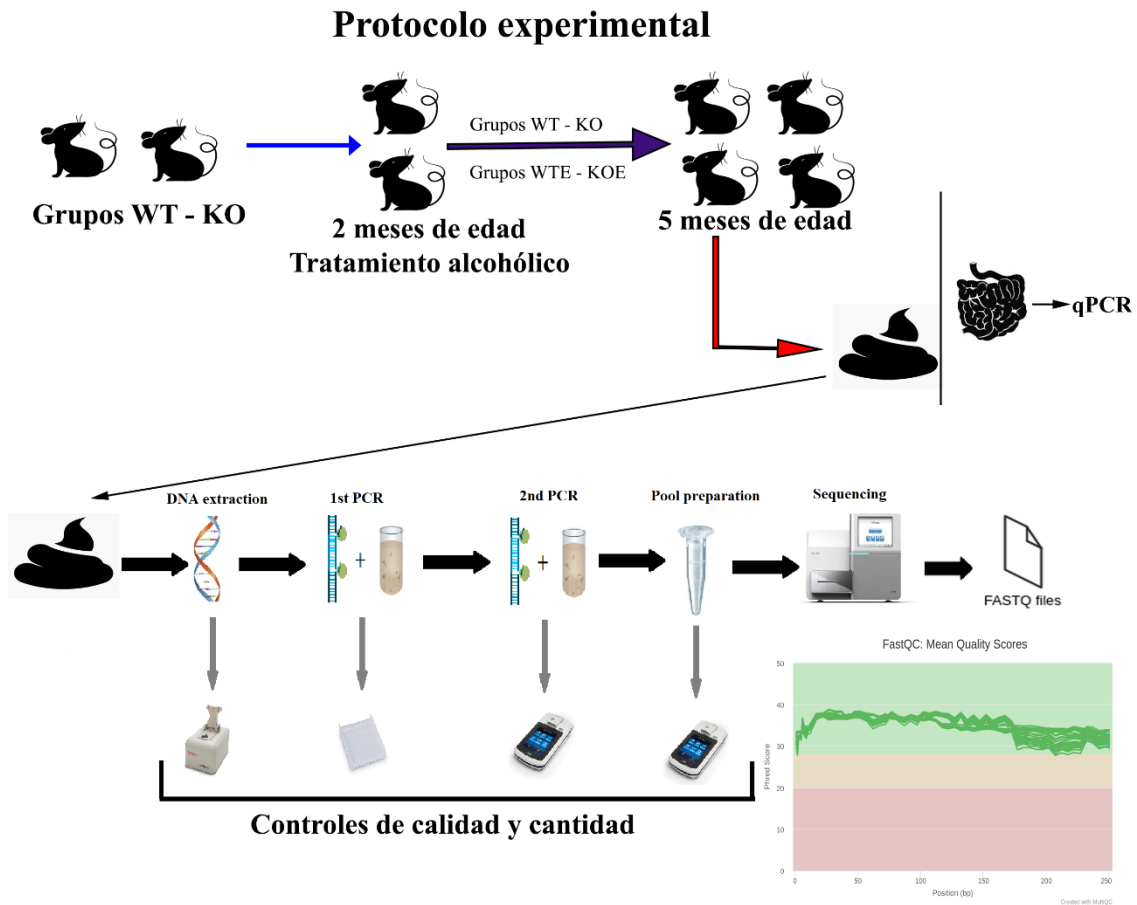


Figura 11. Representación esquemática del diseño y análisis experimental.

3.2 Tratamiento de ratones WT y TLR4-KO para el perfil de miRNAs corticales

Para este trabajo se utilizó una cohorte formada por 44 (11 animales / grupo) ratones hembra WT y TLR4-KO, que se distribuyeron en WT y TLR4-KO controles; y WT y TLR4-KO con tratamiento crónico de alcohol. Después del tratamiento crónico con alcohol, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se diseccionaron las áreas del cerebro de interés utilizando las coordenadas del atlas del cerebro del ratón (Paxinos & Franklin, 2008).

3.3 Tratamiento de ratones WT para el estudio de la curcumina

Para este estudio se usó una cohorte formada por 41 ratones hembra WT de las que 18 animales comenzaron el tratamiento crónico con etanol.

A los grupos sometidos a la administración del curcuminoide BDMC o del conjugado StClPr-BDMC-ANG se les inyectaba con BDMC libre o BDMC conjugada (5 mg/kg), mientras que a los grupos sin este tratamiento se les inyectaba como control salino (cloruro de sodio, NaCl, 0.9%), en la vena de la cola, 2 veces por semana, durante las últimas 8 semanas. Los ratones recibieron en total dieciséis dosis de uno de los tratamientos con BDMC o salino.

Después de 2 meses de tratamiento crónico con etanol, los animales fueron asignados en 6 grupos distintos: un grupo control (n = 7), un segundo grupo manteniendo solo el tratamiento alcohólico (Etanol) (n = 6), un tercer grupo al que se le administraría el curcuminoide libre (BDMC) (n = 8), un cuarto grupo al que se le administraría el curcuminoide conjugado al nanopolímero (StClPr-BDMC-ANG) (n = 8), un quinto grupo con el tratamiento alcohólico y la administración del curcuminoide libre (BDMC + Etanol) (n = 7) y un sexto y último grupo con el tratamiento alcohólico y la administración del curcuminoide conjugado (StClPr-BDMC-ANG + Etanol) (n = 5), teniendo así animales tratados con todas las posibilidades..

Al final de los tratamientos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, y tanto las regiones de la corteza prefrontal (PFC) como cerebral (BC) fueron congeladas a -80°C para posteriores análisis. El peso corporal de los ratones no mostro cambios significativos durante las ocho semanas de tratamiento intravenoso.

4 Análisis de la expresión génica

4.1 Extracción y aislamiento del material genético de las muestras

Se utilizaron muestras del cerebro provenientes de la corteza cerebral congelada previamente a -80 °C (100-200 mg) para la extracción del ARN pequeño (ARNp). Para la extracción principal de ARNp, se siguieron las instrucciones del fabricante del *miRNeasy mini Kit* (Apéndice A, Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras congeladas se insertan dentro de los microtubos y se les añade 700 µl de QIAzol Lysis Reagent. Se homogenizan usando un Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke, Staufen, Alemania). Se deja a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añaden 140 µl de cloroformo, se agitan para mezclar y se deja reposar de nuevo a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Se centrifuga a 6000 g durante 15 minutos a 4°C, y se obtienen tres fases diferenciadas: una superior incolora, con el ARN de interés, la intermedia

blanca y la orgánica inferior roja. La fase superior se transfiere al S-Block, que viene con el propio kit, y se les añade pipeteando un volumen de etanol equivalente al 70% de la fase extraída. Se coloca una placa RNeasy 96 en otro S-Block, se homogenizan las muestras pipeteando y se pasan a los pocillos de la placa. Se sella la placa y se centrifuga a 5600 g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Después se vacía el Block-S y se añaden 800 µl de Buffer RPE en cada pocillo de la placa RNeasy 96. Se sellan y se centrifugan a 5600 g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Se vacía el Block-S y se repite de nuevo este paso, pero con una centrifugación de 10 minutos. Después de comprobar que las membranas están secas, ya que el búfer contiene etanol que alteraría los siguientes pasos, se coloca la placa RNeasy 96 encima de una gradilla con microtubos de elución limpios y se añaden 45–70 µl de agua DEPC. Se sellan, se dejan a temperatura ambiente 1 minuto y se centrifugan a 5600 g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Repetimos este último paso con el mismo volumen de agua DEPC para asegurar una completa obtención del ARN.

Para el ARN total se disgrego 100-200 mg de tejido con 1 ml de QIAzol (Qiagen, Maryland, EE. UU.) usando un Ultra-Turrax T8, seguido del método de fenol cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). El QIAzol lleva 1% β-mercaptoethanol para proteger el material genético de la degradación. Se deja incubar 5 minutos para permitir la completa disociación del complejo nucleoproteico. Se añaden 200 µl de cloroformo, se homogeniza y se deja incubar 2-3 minutos. Centrifugamos las muestras a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Las muestras se separan en las mismas fases comentadas en el protocolo del ARNp. Se transfiere la fase superior a otro microtubo y se le añade 500 µl de isopropanol. Se homogeniza y se deja incubar 10 minutos en hielo. Después centrifugamos los tubos 10 minutos a 12000 g y 4°C. El ARN queda formando un pellet al fondo del microtubo y el sobrenadante se descarta con pipeta. Finalmente se realizan dos lavados con 750 µl de etanol 75%. Se homogeniza y se centrifuga 5 minutos a 7500 g y 4°C. Se descarta el sobrenadante y se repite el lavado con etanol. Después del segundo lavado descartamos el sobrenadante con pipeta, se deja evaporar y se resuspenden en 20-50 µl de agua DEPC. Las muestras se almacenaron a -80°C.

El ADN bacteriano fue extraído utilizando el *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. A las muestras, heces de ratones individualizadas, se les añade 1 ml del InhibitEx Buffer proveniente del kit mientras permanecen congeladas. Para la homogenización de las heces previa a la extracción se usó un sonicador, y posteriormente se calentaron durante 5 minutos a 95°C (debido a la mayor resistencia de la pared bacteriana de las células Gram +). Se homogeniza de nuevo la muestra y se centrifuga 1 minuto a la máxima potencia del rotor (16500 g en nuestra centrifuga). En un microtubo nuevo se añaden 15 µL de proteinasa K, 200 µL de sobrenadante de la muestra centrifugada y 200 µL del Buffer AL, por

ese orden. Los microtubos se homogenizan. Se incuban a 70°C durante 10 minutos. Añadimos 200 µL de etanol 96-100% y homogenizamos. De la mezcla resultante pasamos 600 µL a columnas QIAamp spin y las centrifugamos a máxima velocidad durante 1 minuto. Si no ha pasado toda la muestra a través de la membrana, repetimos la centrifugación. Se cambia el microtubo para evitar el riesgo de que la muestra que ha pasado la membrana pueda impregnarla de nuevo. Se añaden 500 µL de Buffer AW1 y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto. Se cambia de microtubo y esta vez añadimos 500 µL de Buffer AW2 y centrifugamos a máxima velocidad 3 minutos. Cambiamos de nuevo el microtubo, por uno de 1.5 ml, y añadimos 100 µL de Buffer ATE directamente sobre la membrana. Lo incubamos 1 minuto a temperatura ambiente antes de centrifugarlo 1 minuto a máxima velocidad. Se recogen los microtubos con el Buffer ATE que ha arrastrado el ADN bacteriano y se almacenan a -20°C.

4.2 Control de calidad de los ácidos nucleicos

La concentración y calidad de cada muestra de ARN total se determinó utilizando un NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) analizando los ratios de absorbancia de 260/280, donde se aceptaban como válidos valores de 2,0-1,8, y 260/230, donde se consideraban adecuados valores de 2,0-1,6. El ratio 260/280 indica contaminación proteica (las proteínas absorben a 280 nm) y el ratio 260/230 indica contaminación por sustancias químicas usadas en la extracción (el etanol y el isopropanol entre otros absorben a 230 nm). Usamos 1 µL por muestra, y la muestra era diluida y repetida la medición si la concentración superaba los 2500 ng/µL para garantizar que estuviera dentro de los rangos de la máquina.

Las muestras de ARN para el estudio del perfil de miARNs en la corteza se comprobaron también con un bioanalizador Agilent 2100. La integridad del ARN total se analizó con el kit RNA Nano6000 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) para obtener sus valores RIN. El Small RNA Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), especializado en el análisis de la calidad y cuantificación de miARNs y ARNp, se utilizó para los ARNp. Posteriormente, con las muestras unidas en los pools finales, medimos nuevamente los perfiles de ARNp con el Small RNA Kit siguiendo las instrucciones del fabricante, y la integridad total del ARN con el kit de RNA Nano6000.

En el caso de las muestras de ADN bacteriano, se hizo un primer análisis con NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer siguiendo el mismo protocolo que con las muestras de ARN. Posteriormente durante la elaboración de las librerías, se hicieron comprobaciones de calidad y cantidad usando TapeStation High Sensitivity DNA 1000 assay (Agilent Technologies, Santa

Clara, CA, EE. UU.) y Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Cargamos 2 μL de la muestra de ADN bacteriano diluido al 20% en agua DEPC en el TapeStation High Sensitivity DNA 1000 assay, y 2 μL del HS D1000 Sample Buffer. Para el Qubit dsDNA BR Assay Kit usamos 10 μL de cada muestra, a la que añadimos 190 μL de Qubit® working solution antes de cargarlos en la máquina. Este protocolo da la concentración basada en una recta patrón obtenida a partir de la absorbancia de dos estándares, de 0 ng/ μL y 100 ng/ μL respectivamente, y la absorbancia de las propias muestras.

4.3 Retrotranscripción

Antes de la reacción de retrotranscripción del ARN total, todas las muestras se sometieron a un tratamiento con ADNasa para eliminar las trazas de ADN que pudieran haberse recuperado en la fase de extracción. Las muestras tenían 500-2000 ng de ARN en un volumen de 12 μL de agua DEPC y se les añadió 0.5 μL de DNase I (Ambion, Inc, Austin, TX, EE. UU.) y 1.5 μL 10x DNase I Buffer (Ambion, Inc), para someterlas durante 15 minutos a 37°C. Después se les añadió 1 μL de EDTA a 1 mM para proteger el ARN y se calentó las muestras a 85°C durante 5 minutos para degradar el enzima y frenar la reacción, teniendo finalmente 15 μL por muestra. Todas las reacciones de retrotranscripción realizadas fueron en un Master cycler ep. 5341 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania)

Para la retrotranscripción del ARNm, se usaron 500-2000 ng de ARN total en 15 μL y el kit *NZY First-Strand cDNA Synthesis Flexible Pack* (NZYtech, Lisboa, Portugal). De este kit hemos utilizado por muestra 1 μL de dNTP Mix, 1 μL de Random Hexamer mix, 1 μL de NZY Reverse Transcriptase (200U), 2 μL de 10x Reaction Buffer y 1 μL de NZY Ribonuclease Inhibitor, en un volumen final de 21 μL . Las condiciones de la reacción fueron 10 minutos a 25°C, 40 minutos a 50°C y 5 min a 85°C. Después se añadió 1 μL de NZY RNase H para eliminar los restos de ARN unidos al ADNc transcrito y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

Para la retrotranscripción del miARN, se usaron 100 ng de ARN total en un volumen de 1 μL de agua DEPC y el kit *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). El protocolo de este kit conlleva cuatro etapas. Una primera etapa de adición de una cola poli(A) en el extremo 3', donde por cada 1 μL de muestra se añaden 0.25 μL de 10X Poly(A) Buffer, 0.25 μL de ATP, 0.15 μL de Poly(A) Enzyme y 0.85 μL de agua DEPC, en una reacción de poliadenilación a 37°C durante 45 minutos y 65°C 10 minutos para parar la reacción. La segunda etapa es la ligación en el extremo 5' de un adaptador, a cada muestra se le añadieron 1.5 μL de 5X DNA Ligase Buffer, 2.25 μL 50% PEG

8000, 0.3 μL 25X Ligation Adaptor, 0.75 μL RNA Ligase y 0.2 μL de agua DEPC, en una reacción a 16°C durante 60 minutos. La tercera etapa es la retrotranscripción propiamente, en esta etapa a cada muestra se le adicionan 3 μL de 5X RT Buffer, 0.6 μL dNTP Mix, 0.75 μL 20X Universal RT Primer, 1.5 μL 10X RT Enzyme Mix y 1.65 μL de agua DEPC, en una reacción a 42°C durante 15 minutos y 85°C 5 minutos para pararla. A diferencia de las anteriores etapas donde las muestras deben ser llevadas rápidamente a la siguiente fase, al final de la tercera etapa las muestras pueden guardarse a -20°C durante 2 meses. La cuarta y última etapa es la amplificación del miARN, donde a 22.5 μL de cada muestra se le añaden 12.5 μL de 2X miR-Amp Master Mix, 1.25 μL de 20X miR-Amp Primer Mix y 8.75 μL de agua DEPC, en una reacción con un ciclo de 95°C durante 5 minutos para comenzarla, 14 ciclos de 95°C 3 segundos y 60°C 30 segundos, y un ciclo final de 99°C 10 minutos para finalizarla. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso. Las reacciones de los pasos 1 y 2 podían dejarse a 4°C un máximo de una hora al finalizar hasta recoger las muestras y continuar con el siguiente paso.

Para los miARNs que se expresan poco y por tanto serían difíciles de cuantificar por RT-qPCR se hizo una retrotranscripción con sondas específicas, para obtener el DNAc únicamente de estos miARNs. Utilizamos el TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit. Siguiendo el protocolo, usamos 0.15 μL de dNTPs con dTTPs, 1 μL de la MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1.5 μL de 10X Reverse Transcription Buffer, 0.19 μL de RNase Inhibitor y finalmente 4.16 μL de agua DEPC por muestra. Añadimos 1 μL de 5X RT Primer, hasta un máximo de 3 primers por muestra y retrotranscripción. La reacción se hizo a 16°C durante 30 minutos y 42°C durante 30 minutos para la retrotranscripción, y se paró a 85°C durante 5 minutos. Las muestras se guardaban también a -20°C hasta la RT-qPCR.

4.4 Real-time qPCR

Se realizó una RT-PCR cuantitativa del ADNc en un LightCycler® 480 System (Roche, Mannheim, Alemania). Los genes fueron amplificados usando 2,5 μL de *LightCycler 480 SYBR Green I Master (2X)* (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 0,25 μL de los cebadores directo e inverso (10 μM), 1 μL de agua DEPC y 1 μL de ADNc en un volumen final de 5 μL . Los cebadores fueron comprados a Integrated DNA Technologies (Newark, NJ, EE. UU.). La secuencia de los cebadores usados en los genes se detalla en la tabla 3. Las condiciones de amplificación fueron 95°C 10 minutos, seguido de 42 ciclos de 95°C 20 segundos, 63°C 20 segundos y 72°C 20 segundos, un ciclo para el análisis de la curva de fusión de 95°C 15 segundos, 64°C 40 segundos y 97°C, y una extensión final a 40°C 10 segundos.

Tabla 3: Lista de cebadores utilizados para amplificar ADNc en los experimentos de qPCR. El tamaño del fragmento esta dado en pares de bases.

Genes	Directo (5'-3')	Inverso (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)
Smad3	CAG GGC TTT GAG GCT GTC TA	GGT GCT GGT CACT GTCT GTC	105 pb
Mapk14	GAC CGT TTC AGT CCA TCA TTC	AAC ACA TCC AAC AGA CCA ATC A	100 pb
PP1-Gamma	GAG AAC GAG ATC CGA GGA CTC	CGT ATT CAA ACA GAC GGA GCA A	142 pb
TPRV1	GCA GGA CAA GTG GGA CAG AT	TCG CCT CTG CAG GAA ATA CT	235 pb
BDNF	ATT GGC TGG CGA TTC ATA AG	CTG TTT CCT TTC AGG TCA TGG	250 pb
Nav 1.3	CAT TCA AAG GCT GGA TGG AT	TGA TGA CGC CGA TGA ATA GA	159 pb
SIRT1	AGT TCC AGC CGT CTC TGT GT	CTC CAC GAA CAG CTT CAC AA	198 pb
AKT1	TCT ATG GTG CGG AGA TTG TG	CCC GAA GTC CGT TAT CTT GA	128 pb
IL-1R1	TGA AGA GCA CAG AGG GGA CT	CAT TGA TCC TGG GTC AGC TT	169 pb
iNOS	AAT CTT GGA GCG AGT TGT GG	AAT CTC TGC CTA TCC GTC TCG	219 pb
TLR4	AGC TTC TCC AAT TTT TCA GAA CTT C	TGA GAG GTG GTG TAA GCC ATG C	99 pb
CXCL12	GAG CCA ACG TCA AGC ATC TG	TCT TCA GCC GTG CAA CAA TC	72 pb
AQP8	AAC TTG TGG GCT CCG CTC TCT T	ACA GCA GGG TTG AAG TGT CCA C	163 pb
IL-1B	CTC ATT GTG GCT GTG GAG AA	TCT AAT GGG AAC GTC ACA CA	168 pb
TNF-alfa	GAA CTG GCA GAA GAG GCA CT	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	203 pb
COX 2	CAT TGA CCA GAG CAG AGA GAT G	GGC TTC CAG TAT TGA GGA GAA C	288 pb
IL-10	AGG CGC TGT CAT CGA TTT CT	ATG GCC TTG TAG ACA CCT TGG	104 pb
CXCL10	ATG ACG GGC CAG TGA GAA TG	TCA ACA CGT GGG CAG GAT AG	76 pb
ITNL1	TCC AGT CAG CAA GGC AAC AGA G	CAG GTT CTC AGC CTG GAT GTC A	141 pb
CFTR	CCA TCA GCA AGC TGA AAG CAG G	GTA GGG TTG TAA TGC CGA GAC G	155 pb
CDH1	GGT CAT CAG TGT GCT CAC CTC T	GCT GTT GTG CTC AAG CCT TCA C	105 pb
Muc2	GCT GAC GAG TGG TTG GTG AAT G	GAT GAG GTG GCA GAC AGG AGA C	135 pb
Ppia	CGC GTC TCC TTC GAG CTG TTT G	TGT AAA GTC ACC ACC CTG GCA CA	150 pb
snRNA U6	GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T	CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT	89 pb
Región 16S rRNA V3-V4	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA	GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA	~460 pb

	CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG	CTA CHV GGG TAT CTA ATC C	
--	-------------------------------	------------------------------	--

El nivel del ARNm del gen ciclofilina A (PPIA), un gen constitutivo o *housekeeping*, fue usado como control interno para la normalización. El ratio de la expresión relativa entre el gen diana y el de referencia se calculó de acuerdo con la ecuación de Pfaffl (Pfaffl, 2001), que se basa en la proporción obtenida de la relación entre los valores umbral del ciclo (Ct, número de ciclos necesario para que el ADNc se amplifique hasta alcanzar un nivel detectable) de la muestra y los valores Ct del control. Todos los datos fueron analizados usando el software de cuantificación relativa LightCycler 480, incluyendo también las RT-qPCR de los miARNs.

Para el ADNc proveniente de los miARNs la RT-PCR cuantitativa realizada fue diferente, aunque también se usó un LightCycler® 480 System (Roche, Mannheim, Alemania). Se realizaron dos metodologías distintas, dependiendo de la retrotranscripción realizada. Los miARN en los que la retrotranscripción fue inespecífica (sin usarse primers en ella) fueron amplificados usando 2,5 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,25 µL del cebador, 1,25 µL de agua DEPC y 1 µL de ADNc en un volumen final de 5 µL. Las condiciones de amplificación fueron 95°C 1 minuto, seguido de 50 ciclos de amplificación a 95°C 5 segundos y 60°C 30 segundos, y una extensión final a 40°C 30 segundos. El ARN pequeño nucleolar U6 fue usado para la normalización de los miARN analizados mediante este kit. Las secuencias de las sondas de miARNs se especifican en la tabla 4.

Tabla 4: Lista de sondas utilizadas para amplificar los miARNs en los experimentos de qPCR:

Sonda	Localización	Secuencia
hsa-miR-127-5p	Chr.14: 100882979 - 100883075 [+]	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU
mmu-miR-351	Chr.X: 53053255 - 53053353 [-]	UCCCUGAGGAGCCUUUGAGCCUG
hsa-miR-99a	Chr. 21 - 16539089 - 16539169 [+]	AACCCGUAGAUCGGAUCUUGUG
hsa-miR-143	Chr.5: 149428918 - 149429023 [+]	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
mmu-miR-181b-2*	Chr.2: 38853830 - 38853918 [+]	CUCACUGAUCAAUGAAUGCAAA
hsa-miR-7-2*	Chr.15: 88611825 - 88611934 [+]	CAACAAAUCCCAGUCUACCUAA
mmu-miR-96	Chr.7: 129774692 - 129774769 [-]	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU
mmu-miR-182-5p	Chr.6: 30165918 - 30165992 [-]	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACCG
mmu-miR-200a-5p	Chr.1: 1167863 - 1167952 [+]	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA
hsa-miR-26b*	Chr.1: 74394310 - 74394394 [+]	CCUGUUCUCCAUUACUUGGCUC
hsa-miR-21	Chr.17: 59841266 - 59841337 [+]	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-let-7b-5p	Chr.22: 46113686 - 46113768 [+]	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-miR-146a-5p	Chr.5: 160485352 - 160485450 [+]	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
mmu-miR-181a-5p	Chr.1: 137966455-137966541 [+]	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
mmu-miR-155-5p	Chr.16: 84714140 - 84714204 [+]	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU

Por otra parte, los miARNs con una retrotranscripción específica (con primers) fueron amplificados usando 2,5 µL de TaqMan™ Universal PCR Master Mix, no AmpErase™ UNG

(Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 0,25 μL del cebador, 1,25 μL de agua DEPC y 1 μL de ADNc en un volumen final de 5 μL . Las condiciones de amplificación fueron 95°C 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C 15 segundos y 60°C 1 minuto, y una extensión final a 40°C 30 segundos. MiR-181a y miR-181b fueron usados como controles internos para el perfil de los miRNAs corticales. En la tabla 4 vienen listadas las sondas usadas para los miARNs.

5 Generación de librerías

5.1 Librerías de ARNp y su secuenciación

Para la preparación de las librerías de ARNp, se utilizaron 100 ng de la fracción de ARNp de muestras de corteza, mediante el Truseq library prep Small RNA Sample Preparation kit (Illumina, San Diego, USA), con los indexes del Set A. De cada grupo se escogieron las 9 muestras más similares entre sí, y se mezclaron de manera equimolar para generar tres pooles por cada una de las cuatro condiciones experimentales, teniendo un total de 12 librerías finales. De cada librería se cogió 1 μg de ARN en 5 μL de agua DEPC y se le añadió 1 μL de RNA 3' Adapter. Después de calentarlo a 70°C durante 2 minutos, se añadieron 2 μL de 5X HM Ligation Buffer, 1 μL de RNase Inhibitor y 1 μL de T4 RNA Ligase 2. Se incubó la mezcla a 28°C durante 1 hora, antes de parar la reacción con 1 μL de Stop Solution. Se dejó otros 15 minutos a 28°C antes de colocar las muestras en hielo. Mientras calentamos a 70°C durante 2 minutos 1.1 μL de RNA 5' Adapter por muestra. A este adaptador le añadimos 1.1 μL de 10mM ATP y 1.1 μL de T4 RNA Ligase por cada muestra, y pipeteamos la mezcla en las librerías colocadas en hielo. Incubamos la reacción 1 hora a 28°C para permitir la ligación del adaptador 5' y las colocamos de nuevo en hielo.

El ADNc de los miARN se obtuvo mediante el Superscript II Reverse Transcriptase kit (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.). De cada librería se recogieron 6 μL y se les añadió 1 μL de RNA RT Primer, dejándolo incubar a 70°C durante 2 minutos. Después de retirarlo y colocarlo en hielo, para realizar la retrotranscripción, a cada librería se le aplican 2 μL de 5X First Strand Buffer, 0.5 μL de 12.5 mM dNTP Mix, 1 μL de 100 mM DTT1, 1 μL de RNase Inhibitor y 1 μL de la SuperScript II Reverse Transcriptase. La mezcla se incubó 1 hora a 50°C. Finalmente, para amplificar las librerías mediante PCR, usamos 8.5 μL de agua DEPC, 25 μL de PML, 2 μL de RP1 (RNA PCR Primer) y 2 μL de RPIX (RNA PCR Primer Index), en una reacción a 98°C durante 30 segundos, 15 ciclos de 98°C 10 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 15 segundos, y un último ciclo de 72°C durante 10 minutos. Después se hizo una verificación de las librerías mediante High Sensitivity DNA chip.

Se visualizaron y cuantificaron en un bioanalizador Agilent 2100 antes de la secuenciación. Se preparó una mezcla multiplexada a partir de cantidades equimolares, provenientes de las librerías de ARNp elaboradas en los pasos previos, que fue secuenciada durante 50 ciclos de lecturas en la plataforma Illumina HiSeq. 2000 (Illumina, San Diego, CA).

5.2 Librerías del 16S rRNA bacteriano y su secuenciación

Las librerías del gen 16S (ARNr 16S) procariótico, un gen de ARN ribosómico, se generaron a partir del ADN extraído de las heces mediante una PCR para la región variable V3-V4 y el protocolo de Illumina *16S* Metagenomic Sequencing Library Preparation. Este protocolo fue escogido por tener una alta cobertura de especies bacterianas (94,5%). Primero, amplificamos la región de interés usando cebadores específicos con adaptadores overhang (tabla 3, región 16S rRNA V3-V4). Para la amplificación de cada muestra se usaron 2,5 μ L de DNA genómico microbiano (5ng/ μ L), 1 μ L de cada Amplicon PCR Primer, Forward y Reverse (las sondas específicas para la región) a concentración 5 μ M, 12,5 μ L de KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 8 μ L de agua DEPC. La reacción consistió en 95°C durante 3 minutos, 25 ciclos a 95°C, 55°C y 72°C 30 segundos cada uno, y 72°C durante 5 minutos. Tanto esta PCR como la siguiente fueron realizadas en un Master cycler ep. 5341.

Los cebadores no unidos, los fragmentos de cebadores formando dímeros y otros contaminantes se eliminaron utilizando esferas AMPure XP (Illumina, San Diego, CA). Al finalizar la PCR, las muestras fueron centrifugadas a 1000 g durante 1 minuto antes de añadirles 20 μ L de esferas AMPure XP por muestra y homogenizarlas pipeteando. Las muestras se dejan incubar a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la unión de los fragmentos de ADN con las esferas, antes de colocarse en un imán durante 2 minutos. Se recoge el sobrenadante transparente con pipeta, dejando en el fondo el ADN unido a las esferas atraídas por el imán. Sin retirar del imán, se lavan las muestras añadiendo 200 μ L de etanol 80% por muestra, se deja incubar 30 segundos y se retira el sobrenadante con pipeta. Realizamos un segundo lavado igual al anterior. Después de retirar el sobrenadante, dejamos secar las muestras durante 10 minutos para eliminar todo resto de etanol. Retiramos las muestras del imán, añadimos 32.5 μ L de agua DEPC y, con la pipeta, homogenizamos las esferas en el agua, permitiendo que el ADN se libere de ellas. Se deja incubar las muestras durante 2 minutos, las colocamos en el imán y transferimos 30 μ L del sobrenadante de las muestras a una nueva placa, arrastrando el agua el ADN bacteriano amplificado y con las impurezas eliminadas. En esta etapa se pueden guardar las muestras a -20°C.

Se realizó una segunda PCR utilizando Nextera XT Index 1 Primers (N7XX) y 2 Primers (S5XX) (Illumina, San Diego, CA). En la tabla 5 se muestran los indexes de Nextera utilizados.

En esta segunda PCR, se utilizaron 2,5 μL de cada una de las muestras provenientes de la anterior PCR, 12,5 μL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 2,5 μL de Nextera XT Index 1 Primers y 2 Primers, y 5 μL de agua DEPC en una reacción de 95°C durante 3 minutos, 8 ciclos de 95°C, 55°C y 72°C durante 30 segundos cada uno, y 72°C durante 5 minutos. Repetimos el lavado con las esferas AMPure XP igual que el anterior. Las placas con las librerías eran guardadas a -20°C hasta la cuantificación y secuenciación.

Tabla 5: Lista de indexes Nextera utilizados para marcar las muestras de ADN bacteriano antes de secuenciar:

Index S	Secuencia	Index N	Secuencia
502	CTCTCTAT	701	TAAGGCGA
503	TATCCTCT	702	CGTACTAG
504	AGAGTAGA	703	AGGCAGAA
517	GCGTAAGA	704	TCCTGAGC
		705	GGACTCCT
		706	TAGGCATG

La calidad y el tamaño de los productos finales se evaluaron con el kit TapeStation High Sensitivity DNA 1000 (Agilent Technologies, EE. UU.), y la concentración se calculó usando un kit de ensayo Qubit® *dsDNA BR Assay Kit*. Conociendo el tamaño del amplicón y las concentraciones de las muestras, se crearon duplicados de ellas a 10 nM. Luego, de cada muestra de 10 nM se cogieron 2,5 μL y se juntaron en una única librería a 10 nM compuesta por todas las muestras, que sería la librería secuenciada. El conjunto se volvió a cuantificar utilizando el kit TapeStation High Sensitivity DNA 1000 y el Qubit. De la librería de muestras se preparó una alícuota a 4 nM, de la que se recogieron 5 μL para desnaturalizarlos añadiendo 5 μL de NaOH a 0,2 N. Se incuban ambos durante 5 minutos a temperatura ambiente y paramos la reacción añadiendo 990 μL de HT1, para tener el ADN en forma monocatenaria y a 20 pM. Llevamos la librería a 8 pM de concentración final para la secuenciación, que se realizó en la plataforma Illumina MiSeq utilizando un protocolo de lectura 250 pb paired-end (leyendo las moléculas desde ambos extremos) de acuerdo con las especificaciones del fabricante con la adición de un 25% de PhiX. El diseño experimental se muestra en la Figura 11.

6 Métodos antígeno - anticuerpo

6.1 Western blot

Las muestras de corteza cerebral fueron homogenizadas usando un Ultra-Turrax T8 en búfer de lisis con la siguiente composición: 1% NP-40 de tipo Tergitol (NP-40), clorhidrato de Tris (hidroximetil) aminometano 20 mM (Tris-HCl) pH 8, 130 mM NaCl, 10 mM fluoruro sódico (NaF), 10 µg/ml aprotinina, 10 mg/ml leupeptina, 10 µM Ditioneitol (DTT), 1 mM ortovanadato de sodio (Na₃VO₄) y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). La cantidad de búfer usada por muestra se ajustó a 0,5 ml de búfer por cada 250 mg de tejido. Con las muestras de tejido proveniente de intestino, fue necesario usar un sonicador en lugar del Ultra-Turrax debido a la mayor resistencia presentada por dicho tejido.

Las muestras fueron mantenidas en hielo durante 30 minutos, periodo en el que eran homogenizadas mediante un agitador vórtex cada 5-10 minutos, para después ser centrifugadas a máxima velocidad (16000 g) durante 10 minutos. Después se recogió el sobrenadante en un microtubo nuevo y se descartó el precipitado. Para determinar la concentración proteica utilizamos el Ensayo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Este método se basa en el cambio de color de los reactivos dependiendo de las concentraciones de proteínas de las muestras, de las que se mide la absorbancia mediante un espectrofotómetro y comparándose frente a una recta de absorbancia de muestras de las que conocemos su concentración. En una placa ponemos 2 µL de muestra y les aplicamos 244.8 µL de Reactivo A y 5.2 µL de Reactivo B, para dejarlo incubando en oscuridad y agitación durante 30 minutos a 37°C, antes de medirlo a 570 nm.

Para realizar los western blots, a las muestras se les añadió antes de cargarlas tampón de carga 6x (350mM Tris pH 6.8, 30% glicerol, 30% β-mercaptoethanol, 100g/L dodecilsulfato sódico (SDS), 200mg/L azul de bromofenol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos para su desnaturalización. Las proteínas de los lisados fueron posteriormente separados usando geles SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) de 1,5 mm de grosor y con porcentajes de acrilamida de entre 6 y 18% según el peso molecular de los fragmentos a analizar. Para la solidificación de los geles se añadió, por cada 1 ml de gel, 10 µL de APS al 10% y 1,3 µL de temed (Amresco, Solon, OH, EE. UU.). Se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF), aplicando un voltaje de 100 V durante 1 h, o 30 V si se realizaba durante la noche, en un búfer compuesto al 10% Tris-Glycine 10X solution (Fisher Bioreagents, Madrid, España), 70% de agua y 20% de metanol. Las membranas fueron bloqueadas en Tris buffer salino (TBS) conteniendo 0,1% de Tween-20 (TBS-T) y al 5% de albúmina de suero bovino (BSA), durante 30-45 minutos. Las membranas fueron incubadas durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios: anti-TLR4, anti-iNOS, anti-COX2 y

anti-GAPDH, este último como control de carga. TLR4, iNOS y COX2 fueron incubados durante la noche, y GAPDH durante una hora. Los anticuerpos vienen listados en la tabla 6. Posteriormente, las muestras se lavan 3 veces con TBS-T 0,1% y se incuban con los correspondientes anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron usando el kit Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher). Por membrana se añaden 2 ml de ECL Plus Solution A y 50 μ L de ECL Plus Solution B, y se deja incubar 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron en un sistema de fotodocumentación Q9 Alliance (Uvitec, Cambridge, Reino Unido). La intensidad de la banda fue cuantificada usando el software de análisis ImageJ 1.44p.

Tabla 6: Listado de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Organismo	Dilución usada	Empresa
TLR4	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
iNOS	Conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
COX2	Conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	Conejo	1:3000	Santa Cruz Biotechnology
HRP-IgG-Conejo	Cabra	1:20000	Sigma-Aldrich
HRP-IgG-Ratón	Conejo	1:5000	Sigma-Aldrich

6.2 Análisis de citoquinas

Para los niveles de interleucina 1β (IL- 1β) y fractalquina (CX3CL1) en las muestras de corteza cerebral de ratón, la cuantificación se realizó a través del método ELISA usando kits de Peprotech (Rocky Hill, NJ, EE. UU.). Se diluyeron los anticuerpos de captura en PBS hasta tenerlos a concentración 1 μ g/ml, se añadieron 100 μ L en cada pocillo de una placa ELISA y se dejaron incubando durante la noche a temperatura ambiente, con los pocillos sellados. Al día siguiente se eliminó el PBS por aspiración y se realizaron cuatro lavados con 300 μ L de búfer de lavado (0,05% Tween-20 en PBS), eliminando el búfer de nuevo por aspiración. Se añadieron en cada pocillo 300 μ L de búfer de bloqueo (PBS al 1% de BSA) y se dejaron incubando 1 hora a temperatura ambiente, para después repetir los cuatro lavados anteriores. Después se usaron 100 μ L de muestra por pocillo y se dejaron incubando 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron cuatro lavados y se añadió 100 μ L del anticuerpo de detección a concentración 0,5 μ g/ml, y se repitió la incubación de 2 horas a temperatura ambiente. Realizamos de nuevo los cuatro lavados y añadimos 100 μ L del conjugado HRP, para dejarlo incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente realizamos los últimos cuatro lavados, aplicamos 100 μ L de la solución de sustrato e incubamos las muestras a temperatura ambiente previamente a cuantificación mediante un espectrofotómetro.

7 Análisis metabolómico

Se recogieron muestras ($n = 4$ por grupo) congeladas de tejido de corteza cerebral de ratones macho WT y alcohólicos crónicos WT de la misma cohorte usada para los estudios de las heces. Se pesaron (~ 70 mg por muestra) sin dejar que se descongelaran. Luego, se agregaron 480 μl de metanol y las muestras se agitaron y homogeneizaron. A continuación, se realizaron 2 ciclos de descongelación (1 minuto en N_2 líquido y 5 minutos a temperatura ambiente). Posteriormente, se agregaron 360 μL de CHCl_3 y 360 μL de agua mQ, se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos a 4 ° C. Las fases resultantes se separaron: la fase superior (extracto polar en metanol / agua) se recogió, se congeló en nitrógeno líquido, se liofilizó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para la preparación de la muestra para la resonancia magnética nuclear (RMN), el extracto recogido se dejó descongelar, se solubilizó en 550 μl de tampón fosfato (NaP 0,1 M, pH = 7,4, TSP 0,1 mM, D_2O) y se transfirió a un tubo de RMN. Los espectros Noesy 1D con presaturación se consiguieron realizando 400 scans ($ns = 400$), en un espectrómetro de 600MHz con criosonda, a 27°C . A los espectros se les aplicó la transformada de Fourier y automáticamente se corrigió la fase (que las señales fueran simétricas) y se referenció a la señal del estándar TSP con Topspin3. Los metabolitos se asignaron y cuantificaron automáticamente con una plantilla de integración con el software MestreNova en todas las muestras.

8 Cultivos

Los cultivos primarios de astrocitos corticales ($98 \pm 0,5\%$ células positivas para GFAP) se hicieron con crías de hasta 1 día de edad, siguiendo el protocolo del laboratorio (Pascual-Lucas et al., 2014). Las cortezas cerebrales de crías de fenotipo silvestre (WT) (6-8 animales por cultivo) se diseccionan para eliminar las meninges y las zonas del cerebro que no interesan en condiciones estériles y se disocian mecánicamente mediante aspiración con pipeta. Para obtener únicamente astrocitos, el extracto se somete mediante un agitador vórtex a 2500 rpm de velocidad durante un minuto y se filtra a través de una malla de nylon, que permaneció sumergida previamente 30 minutos en etanol 70% para su esterilización, con un tamaño de poro de 22 μm para eliminar agregados celulares.

Las células se cultivan en medio DMEM con 4,5 g/L glucosa y L-glutamina (Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.) al que hemos incorporado suero bovino fetal (FBS) al 20% suplementado con L-glutamina (1%), glucosa (1%), fungizona (1%) y antibiótico (penicilina/estreptomicina) (1%) (Gibco-Life Technologies, Dublín, Irlanda). Las células se

cultivaron en placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Alemania), con un área de crecimiento de 21 cm², en 5 ml de medio de cultivo por placa, en una atmósfera humidificada al 5% CO₂ / 95% aire a 37 ° C, cambiándose el medio al cuarto día. Después de una semana de cultivo, el FBS se reduce al 10%, se elimina la glucosa y se cambia el medio dos veces por semana. Las células se cultivan hasta una confluencia de 70-90%, a los 13-15 días de cultivo. Se hace un cambio de medio sin suero y con 1 mg / ml de BSA durante al menos 3 h antes del tratamiento para estabilizar las células.

Para los análisis de citotoxicidad *in vitro* se realizaron dos tipos de experimentos. En un primer experimento se incubaron astrocitos durante 24 h con diferentes concentraciones de BDMC (0.5, 2, 4 y 8 µM) o dosis equivalentes de StClPr-BDMC-ANG (n = 5). En un segundo experimento las células astrogiales se incubaron con 8 µM de StClPr-BDMC-ANG o BDMC, la máxima concentración usada en el primer experimento, a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) (n = 7). Las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% CO₂ / 95% aire a 37°C. Astrocitos corticales tratados con PBS se usaron como control para el tratamiento con el conjugado StClPr-BDMC-ANG, y astrocitos corticales tratados con dimetilsulfóxido (DMSO) se usaron como control para el tratamiento con BDMC. Para la evaluación de la citotoxicidad, el ensayo de LDH se realizó conforme al protocolo del fabricante (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EE. UU.). Para determinar la actividad de LDH, se restó la absorbancia a 680 nm (señal de fondo) de la absorbancia a 490 nm. Los resultados son presentados como un porcentaje de citotoxicidad de la máxima liberación de LDH en el control. Se realizaron dos replicados para cada experimento.

9 Análisis bioinformático

9.1 Procesamiento de los datos provenientes de las librerías de 16S rRNA.

Se ha utilizado el paquete *DADA2 R* para realizar el control de calidad de las lecturas y alineaciones. Este protocolo de trabajo filtra por calidad de las lecturas considerando la cantidad de errores máximos esperados y el número de N en las secuencias y recorta las secuencias que han pasado el filtro. Se utilizaron *FastQC* versión 0.11.9 y *MultiQC* versión 1.8 para tener una visión integral de la calidad de secuenciación en el conjunto de muestras general. Se aplicó *Divisive Amplicon Denoising Algorithm (DADA)* en el proceso de limpieza de las lecturas. La unión de lecturas solo se realizaba cuando tenían al menos 12 pb que se superponían entre ambas lecturas y las lecturas que eran quimeras fueron eliminadas. El producto es una tabla de variantes de secuencia de amplicones (ASV) (un análogo de la tabla OTU tradicional con mayor

sensibilidad y resolución (Callahan, McMurdie, & Holmes, 2017) usado con frecuencia en estudios de especies en ecosistemas. Los gráficos se generaron con el paquete ggplot.

Las secuencias se clasificaron desde el nivel de filo hasta el de especie. Para asignar un ASV al nivel de especie se requiere una coincidencia exacta con la secuencia de referencia. Silva v138 fue utilizado como base de datos de referencia para identificar y clasificar taxonómicamente las secuencias leídas. Los ASVs del mismo filo o Gram se unieron con su respectivo grupo / clasificación.

9.2 Procesamiento de los datos provenientes de las librerías de ARNp.

El análisis de control de calidad de los archivos de secuenciación fastq resultantes en la corteza cerebral se realizó usando *FastQC*, versión 0.11.6 (Langmead, Trapnell, Pop, & Salzberg, 2009). Luego, las secuencias adaptadas con *Cutadapt* versión 1 (Martin, 2011) se recortaron y filtraron. Las lecturas que fueron validadas se mapearon contra las bases de datos buscando homólogos del ARN no codificante (ncRNA) con *Bowtie*, versión 2.2.5 (Langmead & Salzberg, 2012), y con la versión 2.1.0 del software *TopHat* (D. Kim et al., 2013). Se utilizaron filtros de normalización y post-alineación para eliminar las lecturas de baja calidad, alineaciones caracterizadas por errores en la secuenciación o emparejamientos erróneos. Los conteos de las lecturas se generaron utilizando el software de programación Python y PERL, que permite detectar y anotar supuestos miARNs de interés. Después de obtener una matriz de conteos, los datos de expresión génica se exploraron mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) y métodos de agrupación. Los conteos sin procesar fueron normalizados utilizando el método de normalización *Trimmed mean of M values* (TMM) (Robinson & Oshlack, 2010).

Para la expresión diferencial, el diseño fue analizado a partir del paquete Bioconductor edgeR (Robinson, McCarthy, & Smyth, 2010), ajustando un Modelo Lineal Generalizado Binomial Negativo donde la matriz de diseño incluía un factor para todos los grupos experimentales. Esta prueba detecta los genes expresados diferencialmente entre grupos experimentales. Se utilizó el procedimiento de corrección del *p valor* de prueba múltiple convencional propuesto por Benjamini-Hockberg para derivar los valores p ajustados (Benjamini & Hochberg, 1995).

10 Análisis estadístico

Se utilizaron scripts R personalizados en el análisis bioinformático. Se realizó un non-metric multidimensional scaling (NMDS) basado en Bray-Curtis de todas las muestras para visualizar los grupos en un espacio dimensional reducido. Para estimar la diversidad y abundancia de la microbiota se calculó la diversidad alfa. Se usó el índice de Shannon para medir la uniformidad de las especies (nivel de abundancia similar entre especies), y el índice de Chao1 para estimar la riqueza o abundancia del microbioma en las muestras, finalmente se realizó una prueba U de Mann-Whitney para probar si existen diferencias significativas entre grupos. Se utilizó el paquete *DESeq2* para realizar la prueba de abundancia diferencial. El tamaño de la librería se corrigió usando un recuento posterior en función *sizefactor*. La corrección de inferencia múltiple de los p valores se realizó con el método Benjamini-Hochberg. Los análisis de correlación se realizaron utilizando la correlación de Spearman, y la transformación de relación logarítmica centrada se aplicó en la tabla ASV antes de calcular la correlación.

Los resultados son presentados como media \pm SEM. La estadística significativa fue determinada mediante One-way ANOVA, Two-way ANOVA, la prueba T de student y la prueba de Kruskal-Wallis usando las pruebas de múltiples comparaciones de Tukey y Dunn como post-tests. La diferencia estadísticamente significativa fue considerada en p valor < 0,05. Las pruebas para análisis estadístico de los datos de expresión génica obtenidos por qPCR y los datos de proteínas obtenidos por western blot y ELISA se llevaron a cabo utilizando el software estadístico GraphPad Prism v5.01 o la v8.0.2 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Para los análisis de validación y la bioinformática del perfil de miRNAs en corteza cerebral se usaron el software SPSS v17.0 y el software R versión 3.4.3.

Resultados

1 Análisis de los miARNs corticales mediante Next-Generation Sequencing (NGS)

La corteza cerebral es una de las regiones del organismo más afectadas por los efectos perniciosos del consumo de alcohol (Alfonso-Loeches, Pascual-Lucas, Blanco, Sanchez-Vera, & Guerri, 2010), tanto a nivel tisular, como celular y molecular. Los miARNs, componentes clave en la regulación de los procesos biológicos del organismo (Gebert & MacRae, 2018), no escapan a las alteraciones provocadas por esta droga (Martinez et al., 2019; Miranda, 2014). Por tanto, el primer objetivo de la presente tesis fue comprobar las modificaciones en la expresión de los miARNs en la corteza cerebral causadas por el etanol, y si la ausencia del receptor TLR4, componente del SII, influía en los niveles de estos reguladores.

Para evaluar los miARNs expresados diferencialmente en las cortezas de los ratones tratados y sin tratar con alcohol, se realizó una secuenciación y un análisis posterior. La figura 12 muestra la metodología empleada de forma esquemática. Para el aislamiento del ARN, de las 44 muestras de corteza iniciales solo 36 de ellas tenían una calidad óptima (un valor RIN superior a 7,5) para un análisis de secuenciación, mientras que las restantes fueron descartadas.

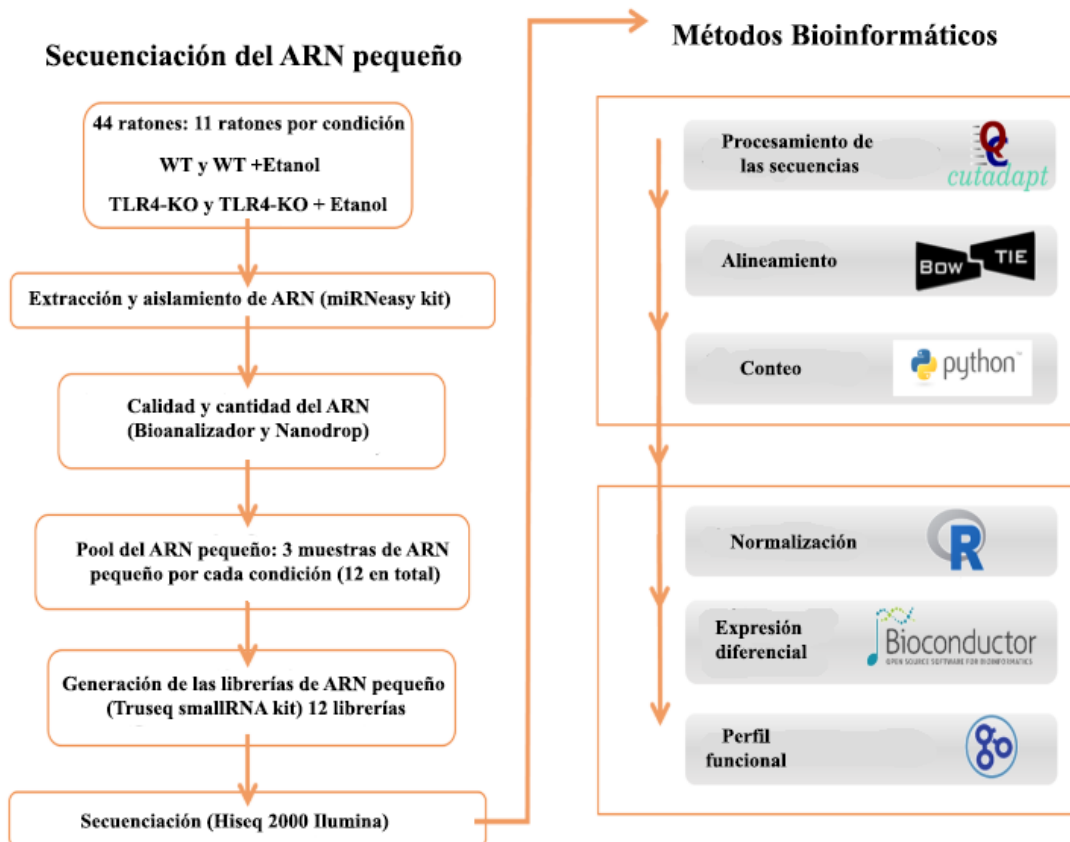


Figura 12: Protocolo de trabajo seguido para la secuenciación de los miARNs.

Después de comprobar la calidad del ARN, se generaron 12 muestras finales, provenientes de juntar las 9 muestras en mejores condiciones de cada una de las 4 condiciones (WT, WT etanol crónico, TLR4-KO y TLR4-KO etanol crónico) en 3 muestras nuevas. La combinación para obtener 3 muestras por condición se hizo como estrategia para mejorar la rentabilidad y eficiencia del muestreo, ya que algunos estudios sugieren que la combinación de muestras minimiza la cantidad de información que se pierde por estar por debajo del umbral de detección (Schisterman & Vexler, 2008).

Los análisis bioinformáticos revelaron que las secuencias obtenidas tenían una calidad alta (QC, nivel de calidad Phred superior a 39 en las 12 muestras) (figura 13), después de filtrar los datos con la versión 1.8 de Cutadapt (Martin, 2011). Para el mapeo de las secuencias, los alineamientos de las secuencias cortas y el QC de las secuencias obtenidas se usaron Bowtie v.2.2.5 (Langmead & Salzberg, 2012) y TopHat v.2.1.0 (D. Kim et al., 2013). Después se utilizaron los softwares de programación Python y PERL, con los que pudimos detectar los miARNs de interés (figura 12).

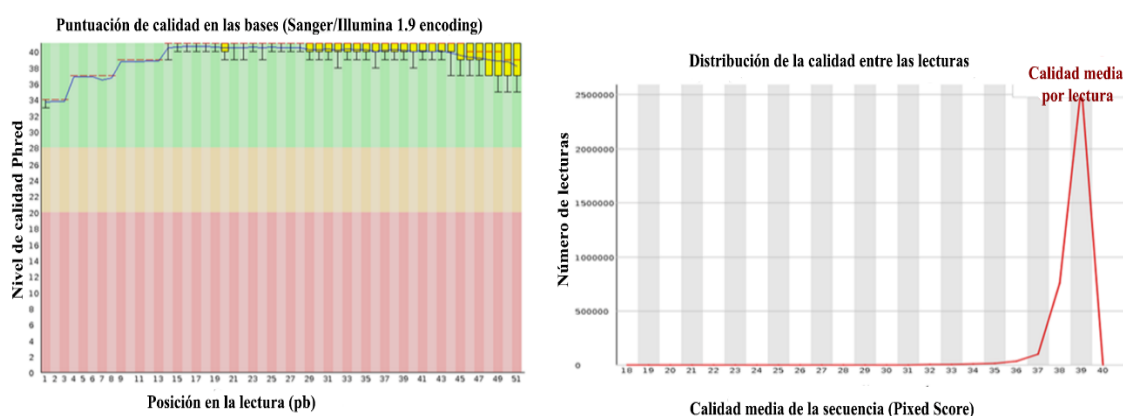


Figura 13. La puntuación de calidad de las secuencias, el valor Q, fue superior a 39 en todas las muestras, siendo la longitud con los mejores Q valores la de 51 nucleótidos.

También en relación con la calidad del ARN, la distribución de la longitud de las lecturas de ARNp obtenidas por NGS reveló un patrón constante, con un pico entre los 19-25 nucleótidos, que corresponde al tamaño medio de los miARNs (figura 14). Un resumen de las lecturas de las 12 librerías y su calidad, antes y después del procesamiento informático (trimmeado), viene detallado en la tabla 7.

Tabla 7: Secuenciación y calidad de las lecturas. La tabla muestra el número de secuencias obtenidas en cada librería, la longitud media de las lecturas, el promedio de la información total en mega bases

obtenida y la media de la calidad de secuenciación. Estos resultados se indican antes y después del proceso de trimmeado.

Muestra	Datos brutos				Datos tras el tratamiento informático			
	Número de secuencias	Longitud media	Tamaño (Mb)	Calidad	Número de secuencias	Longitud media	Tamaño (Mb)	Calidad
Librería 1	3.694.335	51	188	39,26	3.538.978	45	159	39,23
Librería 2	4.000.000	51	204	39,27	3.902.460	45	178	39,25
Librería 3	3.347.939	51	170	39,27	3.235.803	45	146	39,22
Librería 4	4.000.000	51	204	39,29	3.867.763	44	172	39,25
Librería 5	3.737.208	51	190	39,32	3.648.401	45	165	39,30
Librería 6	3.453.060	51	176	39,29	3.292.011	45	150	39,28
Librería 7	4.000.000	51	204	39,28	3.832.890	44	168	39,23
Librería 8	3.695.752	51	188	39,31	3.544.072	45	161	39,29
Librería 9	2.593.533	51	132	39,31	2.500.610	45	114	39,31
Librería 10	3.362.150	51	171	39,31	3.261.983	44	145	39,27
Librería 11	3.851.194	51	196	39,31	3.755.273	45	169	39,28
Librería 12	3.162.596	51	161	39,33	3.080.880	45	141	39,31

El diagrama mostrado en la figura 14A también muestra los porcentajes de calidad MAPQ frente a la base de datos de ARNp no codificante. El MAPQ cuantifica la probabilidad de que una lectura este mapeada de forma errónea, en base a cuál sería su mejor alineamiento dentro del genoma. En el diagrama indicamos que más del 60% de las lecturas tienen un $MAPQ \geq 30$ en todas las muestras. Esto significa que la probabilidad de que este mapeo sea incorrecto es de 1 entre 1000.

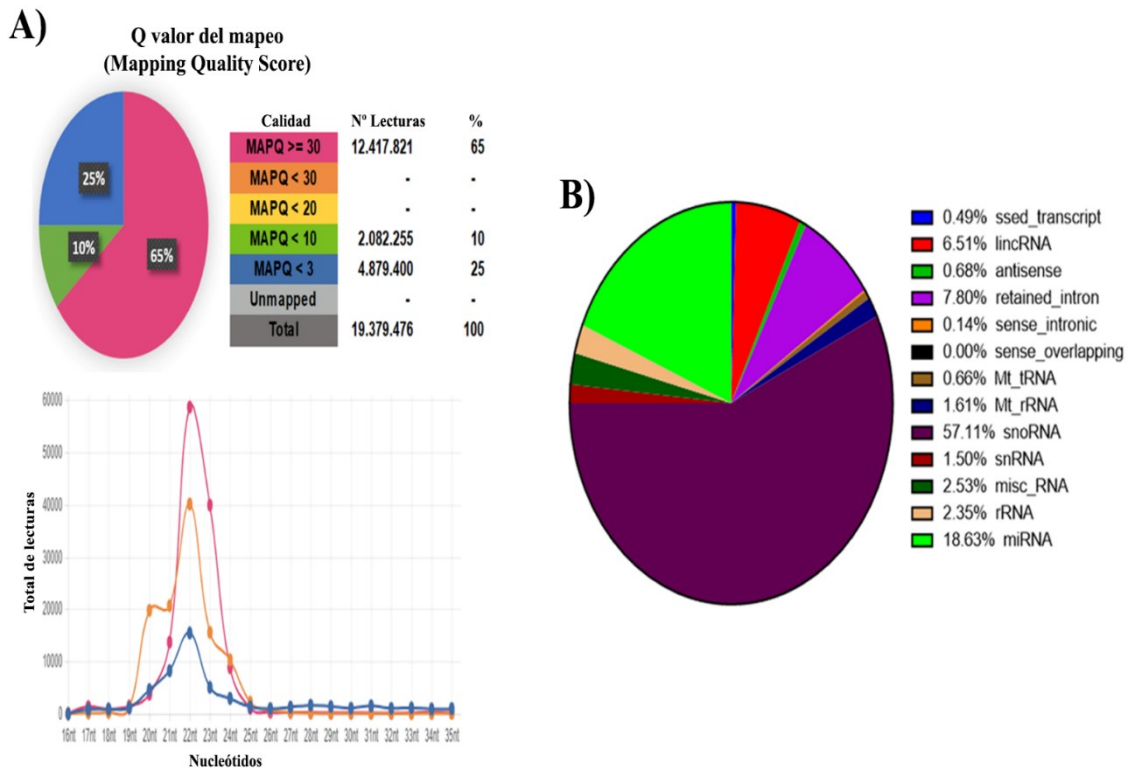


Figura 14. (A) Calidad del mapeo de las lecturas y distribución de MAPQ por la longitud de las lecturas, medida en nucleótidos (21-25nt representa las lecturas de miARN). (B) Porcentaje de las lecturas que han mapeado en los distintos tipos de ARNp.

Después de la secuenciación, se obtuvieron un total de $42.897.767 \pm 417.609$ lecturas brutas de las 12 muestras corticales. Una vez realizado el trimmeado, consideramos que el 95% de las secuencias tenían niveles de calidad adecuados para los análisis posteriores, con un Q valor de 39 o superior, y se obtuvieron en total $41.461.124 \pm 406.609$ lecturas adecuadas para el estudio. Los datos también indican que alrededor del 19% de las lecturas correspondían a secuencias de miARN. Aunque la población más abundante era snoARN (ARN pequeño nucleolar, ARNpn), las lecturas de miARN que obtuvimos fueron suficientes para continuar con el objetivo del estudio (figura 15B), analizar los perfiles de expresión de los miARNs. En la tabla 8 se indica el porcentaje de cada ARNp en cada una de las librerías secuenciadas.

Tabla 8: Resumen del porcentaje de cada miARN no codificante en las 12 librerías analizadas. Las lecturas trimmeadas se mapearon contra bases de datos para ARN no codificantes homólogos (ncARN) usando los softwares Bowtie versión 2.2.5 y TopHat versión 2.1.0.

Porcentaje de cada ARNs en las 12 librerías												
ncRNAs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
processed_transcript	0,486	0,409	0,497	0,844	0,290	0,274	0,800	0,253	0,223	0,705	0,260	0,232
lincRNA	6,507	5,581	6,291	6,462	6,054	5,567	6,551	5,601	5,245	6,485	5,887	5,462
antisense	0,677	0,719	0,646	0,599	0,749	0,800	0,535	0,760	0,704	0,575	0,753	0,680
retained_intron	7,798	9,408	8,294	8,042	8,343	8,493	8,209	8,469	9,582	7,997	8,468	9,131

sense_intronic	0,141	0,128	0,128	0,152	0,133	0,136	0,163	0,129	0,137	0,166	0,139	0,135
sense_overlapping	0,002	0,002	0,001	0,000	0,004	0,004	0,001	0,004	0,003	0,002	0,004	0,002
Mt_tRNA	0,659	0,478	0,553	0,504	0,551	0,460	0,434	0,495	0,397	0,449	0,573	0,440
Mt_rRNA	1,614	2,273	2,091	1,576	2,878	1,892	1,560	2,722	1,414	1,990	1,439	2,340
snoRNA	57,11	61,61	57,75	57,05	59,53	64,38	53,95	61,19	65,33	56,06	61,92	64,78
snRNA	1,497	1,467	1,498	0,818	2,433	2,127	0,564	2,609	1,552	0,966	2,408	1,609
misc_RNA	2,526	1,592	2,530	0,393	4,908	3,795	0,330	5,316	3,106	1,081	4,348	3,207
rRNA	2,348	2,011	2,352	1,583	2,232	2,008	1,424	2,594	2,341	1,678	2,223	1,909
miRNA	18,63	14,31	17,36	21,96	11,89	10,06	25,47	9,85	9,96	21,84	11,57	10,06

2 Análisis de los niveles de expresión de los miARNs corticales

Siguiendo el esquema metodológico mostrado anteriormente, determinamos el perfil de miARNs en el área de la corteza alineando las lecturas frente a la base de datos miRBase. Las secuencias fueron mapeadas contra la base de datos de los ARNp usando Burrows-Wheeler Alignment (BWA) para alinear eficientemente las secuencias cortas (Koboldt et al., 2009). Esto produjo un total de 2.615.887 lecturas correspondientes a miARNs para las 12 muestras.

La figura 15A presenta los miARNs más abundantes expresados en las muestras: mmu-mir-181a, mmu-mir-26a, mmu-mir-125a, mmu-mir-30d, mmu-mir-125b, mmu-mir-486a y mmu-mir-486b. Estos 7 miARNs representan aproximadamente el 50% de todos los miARNs encontrados. También identificamos 590 miARNs que se expresaron en la corteza en todas las condiciones experimentales utilizadas, es decir, comunes a las 12 librerías secuenciadas. Asimismo, se encontraron 351 miARNs expresados en el grupo WT, 21 de los cuales eran específicos para este grupo; 345 miARNs expresados en los WT con tratamiento alcohólico, 18 de los cuales eran específicos; 336 miARNs en el grupo TLR4-KO, de los cuales 15 eran específicos; y finalmente 314 miARNs expresados en los TLR4-KO con tratamiento alcohólico, 6 de los cuales eran específicos para este grupo experimental.

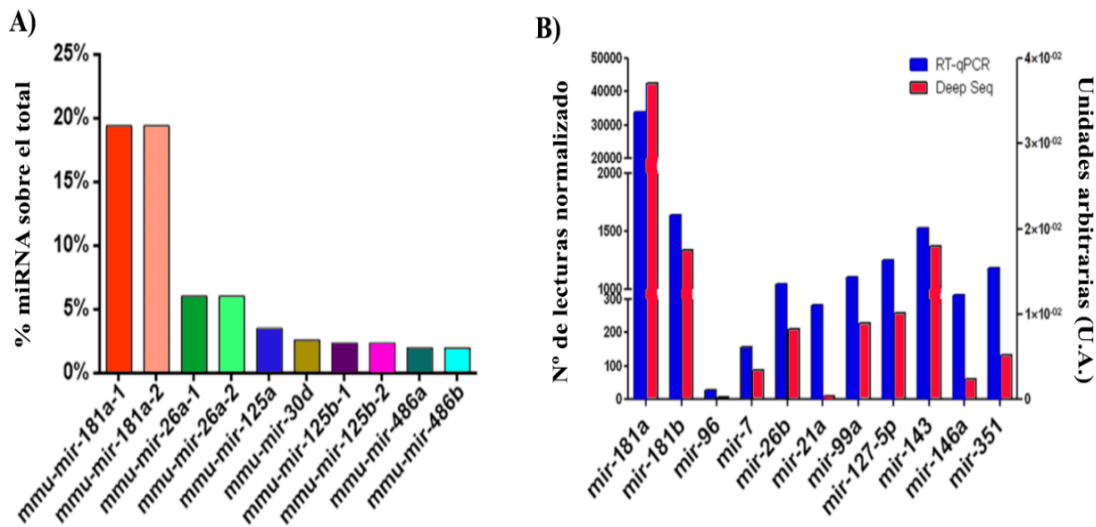


Figure 15: Perfil de miARN. (A) El gráfico muestra los miARNs más abundantes en muestras de corteza de ratones (miR-181a, miR-26a, miR-30, miR-125a / b, miR-486a / b). (B) Distintos miARNs se validaron tanto con NGS, como mediante RT-qPCR. El miR-181a es el miARN más abundante, mientras que miR-96 es el menos presente en ambos métodos de detección.

La figura 15B expone los niveles de miARNs obtenidos mediante ensayos de RT-qPCR TaqMan (barras azules) y que contrastamos con los datos de NGS (barras rojas). El miR-181a tuvo una expresión predominante en la corteza cerebral (figura 15A), mientras que miR-96 tuvo la expresión más baja en NGS, que se confirma por el método TaqMan RT-qPCR (figura 15B). Los resultados también indicaron que, en nuestras condiciones experimentales, el método RT-qPCR muestra una mayor sensibilidad y detección que la NGS. Esto se puede apreciar en la mejor señal del miR-96 obtenida por RT-qPCR en comparación a la NGS.

3 Expresión diferencial de miARNs asociada al consumo de alcohol en la corteza cerebral y el efecto del TLR4

Unos de nuestros objetivos fue evaluar los niveles de expresión diferencial de los miARNs entre nuestros grupos experimentales. El número de lecturas / condición se distribuyó de la siguiente manera: 701.103 ± 20.626 para WT; 633.986 ± 101.718 para WT tratados con etanol; 699.894 ± 172.107 para TLR4-KO y 580.904 ± 79.332 para TLR4-KO tratados con etanol.

La figura 16 expone el distinto perfil de los miARNs en las comparaciones realizadas entre los animales tratados con etanol y los controles. Los datos revelan que el tratamiento con alcohol incrementó la expresión de 7 miARNs, pero redujo los niveles de 14 miARNs en los

ratones WT frente a los control (figura 16A). Entre los miARNs con expresión disminuida por el alcohol, encontramos el clúster 183, formado por los miARNs -183, -96 y -182, y dos miembros de la familia miR-200, los miARNs 200a y 200b, un posible indicador de que la alteración de esta expresión génica está vinculada a rutas moleculares específicas. Cuando el receptor TLR4 estaba ausente, el tratamiento con alcohol regulaba al alza 8 miARNs y a la baja sólo 2 miARNs (figura 16B).

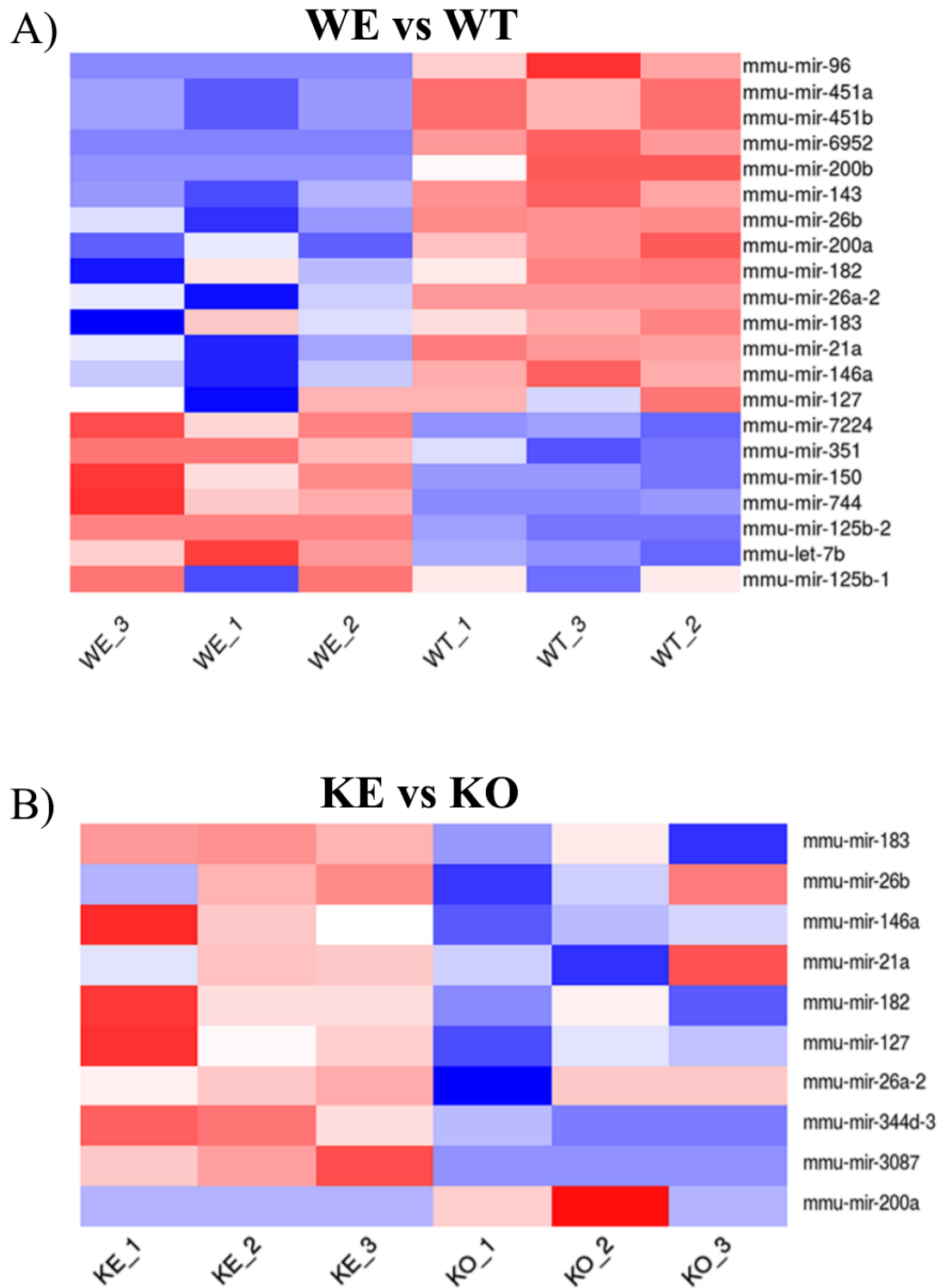
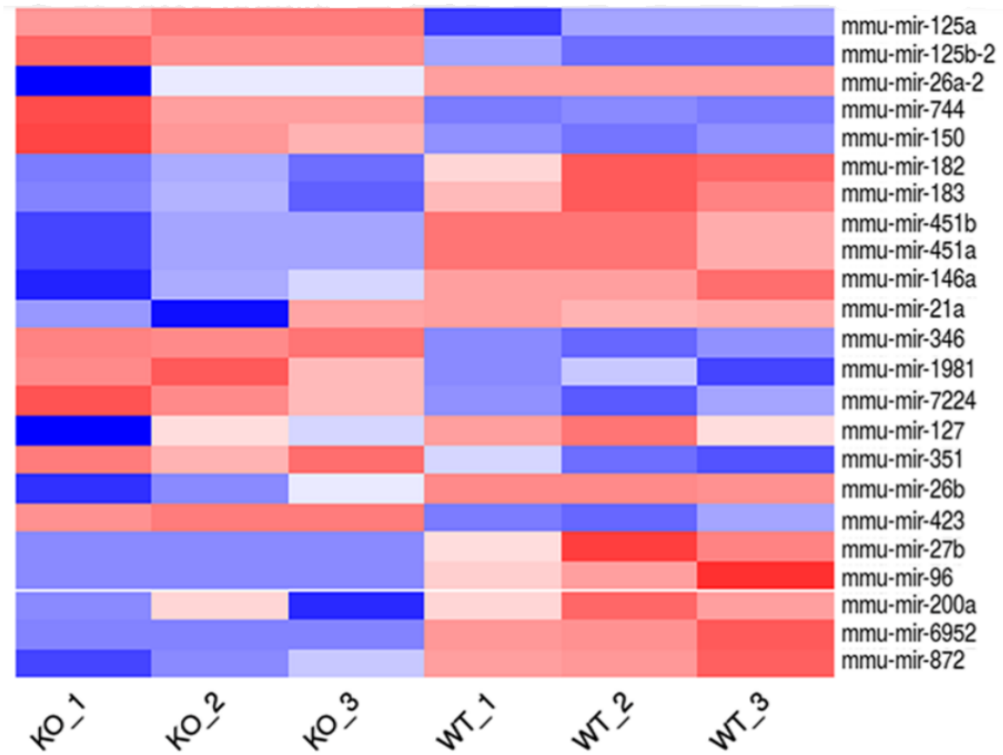


Figura 16: Heatmaps de la comparativa de la expresión de miARNs en las cortezas cerebrales de los distintos grupos de ratones. Los heatmaps muestran los miARN regulados al alza (rojo) o regulados a la baja (azul) en cada comparación de estudio: **(A)** WT etanol crónico frente a WT, **(B)** TLR4-KO etanol crónico frente a TLR4 -KO.

En referencia a la comparativa por genotipos (TLR4-KO vs. WT), 14 miARNs fueron regulados a la baja y 9 fueron regulados al alza, lo que indica que la presencia o la ausencia del TLR4 está asociada con cambios en los perfiles de miARNs en las cortezas de los ratones (figura 17A). Finalmente, la presencia o ausencia del TLR4 cuando hay tratamiento alcohólico (TLR4-KO alcohólico frente a WT alcohólico) mostró una regulación ascendente de 2 miARNs en TLR4-KO alcohólico y 1 miARN regulado negativamente (figura 17B). Estos resultados confirmarían que los perfiles de miARN presentados por la corteza cerebral se ven afectados tanto por el consumo de alcohol, como por la ausencia del receptor TLR4.

A)

KO vs WT



B)

KE vs WE

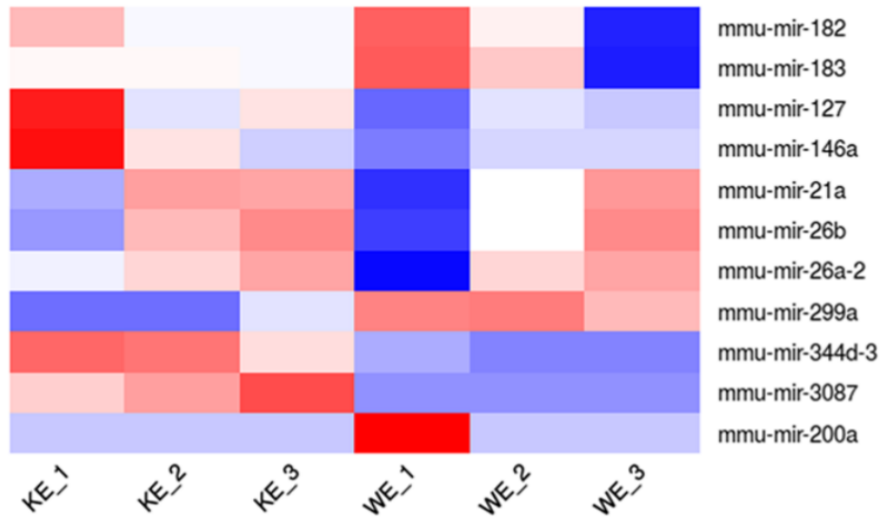


Figura 17: Heatmaps de la comparativa de la expresión de miARN en las cortezas de los distintos grupos de ratones. Los heatmaps muestran los miARN regulados al alza (rojo) o regulados a la baja (azul) en cada comparación de estudio: **(A)** TLR4-KO frente a WT, y **(B)** TLR4-KO crónicos frente a WT crónicos.

En resumen, estos datos sugerirían que parte del daño ocasionado en el SNC por el alcohol se debe a que la activación del TLR4 implica una regulación génica mediada por miARNs. Tanto el alcohol como el TLR4 son capaces, individualmente y en conjunto, de modificar el perfil de los miARNs en condiciones control expresado en la corteza cerebral. Al mismo tiempo, estos resultados dan a entender la relevancia de los miARNs en la respuesta del organismo frente al consumo crónico de etanol y en la actividad del sistema inmunológico.

4 Citotoxicidad *in vitro* de BDMC y StCIPr-BDMC-ANG en astroglía.

El consumo de alcohol provoca neuroinflamación y daño neural, siendo uno de los mecanismos moleculares implicados, los cambios en el perfil de expresión de los miARNs inflamatorios que hemos mostrado en el apartado anterior. A continuación, nos propusimos evaluar el efecto de un posible fármaco o compuesto frente al daño ocasionado por el consumo crónico de etanol en el SNC.

El compuesto o fármaco que seleccionamos fue la curcumina, concretamente el derivado BDMC, por sus conocidas propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Aggarwal & Harikumar, 2009; Hewlings & Kalman, 2017; Kuptniratsaikul et al., 2014; Mazzolani & Togni, 2013; Panahi, Hosseini, et al., 2016; Sahebkar et al., 2015; Trujillo et al., 2013), ya que parte del daño cerebral por alcohol se debe a la generación de un ambiente tisular inflamatorio y oxidante (Alikunju, Abdul Muneer, Zhang, Szlachetka, & Haorah, 2011; Kamal et al., 2020).

Debido a la baja solubilidad y estabilidad de los tratamientos mediante la utilización de curcuminoides libres, utilizamos un nanoconjugado basado en un poliglutamato modificado con propargilo (StCIPr), conjugado con BDMC, a través de un enlace éster. Este enlace responde al medio, degradándose según las condiciones ambientales, y liberando el compuesto unido. El rendimiento en la conjugación fue del 90% (cantidad de producto conseguido al final, en relación con el usado inicialmente, ya que parte se pierde en el proceso) y la eficiencia de la conjugación del 50% (producto conseguido al final del proceso que se encuentra conjugado). La carga de BDMC en el StCIPr-BDMC fue del 14,9% del peso total.

Este nanoconjugado estaba modificado con el péptido ANG-2, para permitir su entrada a través de la BHE gracias a su unión con el receptor LRP-1 (Duro-Castano et al., 2020), obteniendo al final la forma StCIPr-BDMC-ANG (figura 10). El rendimiento fue del 80-90% y la eficiencia de la conjugación del 90-100%. La carga peptídica final del péptido fue del 14,25% del peso en StCIPr-BDMC-ANG.

Es importante destacar que la razón de que se haya introducido restos de propargilo, para que estén presentes en el polímero portador (StCIPr), se debe a que imita el efecto de los inhibidores de la monoamino oxidasa-B (MAO-B) utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (todos los cuales llevan restos de propargilo) (do Carmo Carreiras, Ismaili, & Marco-Contelles, 2020). Con ello se consigue promover respuestas anti-inflamatorias y efectos neuroprotectores y restauradores en los pacientes (Bar-Am, Weinreb, Amit, Youdim, & Youdim, 2005).

Antes de comprobar el valor terapéutico del StCIPr-BDMC-ANG con respecto a la inhibición de la inflamación, fue necesario descartar que tuviera efectos tóxicos en el organismo, por lo que realizamos una serie de pruebas citotóxicas en cultivos primarios de astrocitos corticales. Incubamos las células con BDMC o StCIPr-BDMC-ANG a diferentes concentraciones (0,5, 2, 4 y 8 μM) durante 24 h (figura 18A) y descubrimos que BDMC y StCIPr-BDMC-ANG no inducen ningún efecto citotóxico en ninguna de las concentraciones utilizadas ($F(3, 32) = 1,87$, $p\text{-valor} = 0,15$).

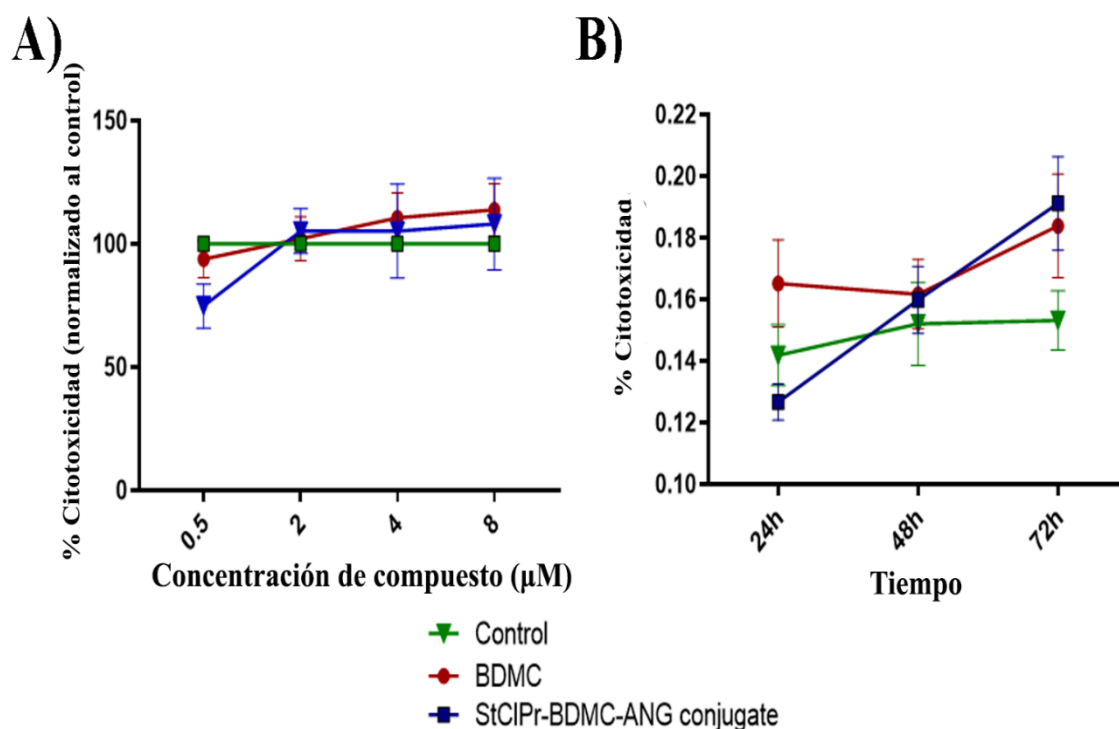


Figura 18: Citotoxicidad de BDMC y StCIPr-BDMC-ANG en cultivos primarios de astrocitos corticales a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Actividad de LDH medida en el sobrenadante de astrocitos corticales. **A)** Nivel de citotoxicidad en astrocitos incubados durante 24 h a diferentes concentraciones de BDMC o StCIPr-BDMC-ANG ($n = 5$). **B)** Nivel de citotoxicidad en astrocitos incubados con 8 μM de BDMC o StCIPr-BDMC-ANG durante 24, 48 y 72 h ($n = 7$). Los

datos representan la media \pm SEM. Se usó DMSO como control para el tratamiento con BDMC y PBS como control para el tratamiento con el conjugado StCIPr-BDMC-ANG.

A continuación, evaluamos la viabilidad de los astrocitos a lo largo del tiempo, utilizando la misma concentración de BDMC y StCIPr-BDMC-ANG (8 μ M BDMC, la más elevada usada en el ensayo anterior) e incubando los astrocitos durante varios tiempos (24, 48 y 72 h). Los resultados obtenidos mostraron un ligero aumento de la toxicidad en los cultivos de StCIPr-BDMC-ANG y BDMC a las 72 h (figura 18B). En general, el análisis estadístico para StCIPr-BDMC-ANG y el tratamiento con BDMC indicó cambios significativos en la viabilidad de las células en el tiempo ($F(1.937, 30.99) = 10.78$, p -valor < 0.05), aunque las comparativas entre el grupo control y ambos grupos tratados en los tres tiempos distintos no fueron significativas.

En cuanto a los estudios *in vivo*, se comprobaron los cambios de peso de los animales a lo largo de los distintos tratamientos, en comparación a los ratones control, y tampoco se registraron cambios significativos en el peso (figura 19). El peso corporal ganado al final del periodo de cuatro meses de tratamiento era similar entre los distintos grupos experimentales. La ausencia de cambios significativos en el peso de los ratones, junto a los estudios de toxicidad en cultivos celulares sugiere una inocuidad general de estos compuestos.

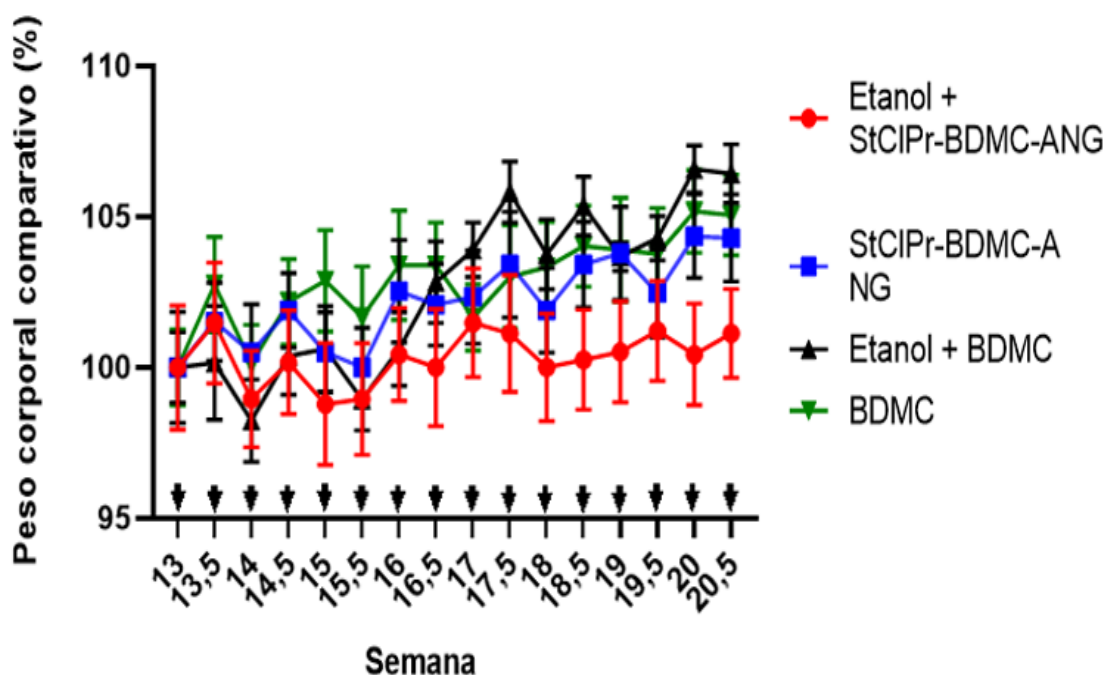


Figura 19: Efecto de los tratamientos en el peso de los ratones. Los ratones eran pesados dos veces por semana, el mismo día que eran administrados con el tratamiento correspondiente. Todos los grupos están normalizados al peso que tenían en la semana 13 ($T = 0$).

5 El tratamiento con BDMC y StCIPr-BDMC-ANG atenúa la neuroinflamación debida al etanol

Es sabido que el consumo crónico de etanol induce neuroinflamación y daño neuronal en el SNC, activando una respuesta mediada por el receptor TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010). Sabiendo que los curcuminoides poseen capacidades anti-inflamatorias, decidimos comparar la capacidad del BDMC y del StCIPr-BDMC-ANG para revertir la neuroinflamación inducida por el etanol. Para ello, realizamos un análisis de la expresión génica y de los niveles proteicos de diversos componentes inflamatorios en dos zonas de la corteza cerebral de ratón después de una serie de tratamientos. Los ratones se dividieron en 6 grupos: control, tratamiento alcohólico, tratamiento con BDMC, tratamiento alcohólico + BDMC, tratamiento con el conjugado StCIPr-BDMC-ANG y tratamiento con el conjugado StCIPr- BDMC-ANG + tratamiento alcohólico (figuras 20 y 21 el análisis de proteínas y figuras 22-24 el análisis de ARNm).

Primero se determinó los niveles de expresión proteica de los mediadores inflamatorios, COX-2 y la óxido nítrico sintasa 2 (iNOS), y del receptor TLR4, en las cortezas prefrontal (PFC) y superior (BC) en todos los grupos experimentales. Los análisis revelaron diferencias significativas entre los grupos para TLR4 en el PFC ($F(5,19) = 5.75, P < 0.05$) y BC ($F(5,21) = 5.15, P < 0.05$), para COX-2 en el PFC ($F(5,24) = 5.10, P < 0.05$) y BC ($F(5,26) = 4.74, P < 0.05$) y para iNOS en el PFC ($F(5,24) = 5.09, P < 0.05$) y BC ($F(5,20) = 5,7, P < 0,05$) (figura 20B).

En resumen, el tratamiento crónico con etanol aumentó la expresión de COX-2, iNOS y TLR4 en las PFC y BC, cuando los datos se comparaban con los valores del grupo control no alcoholizado. Sin embargo, el tratamiento con StCIPr-BDMC-ANG revirtió todas las alteraciones inducidas por etanol en dichas zonas de la corteza, mientras que el tratamiento con BDMC solo redujo los niveles de iNOS en la PFC (figura 20B).

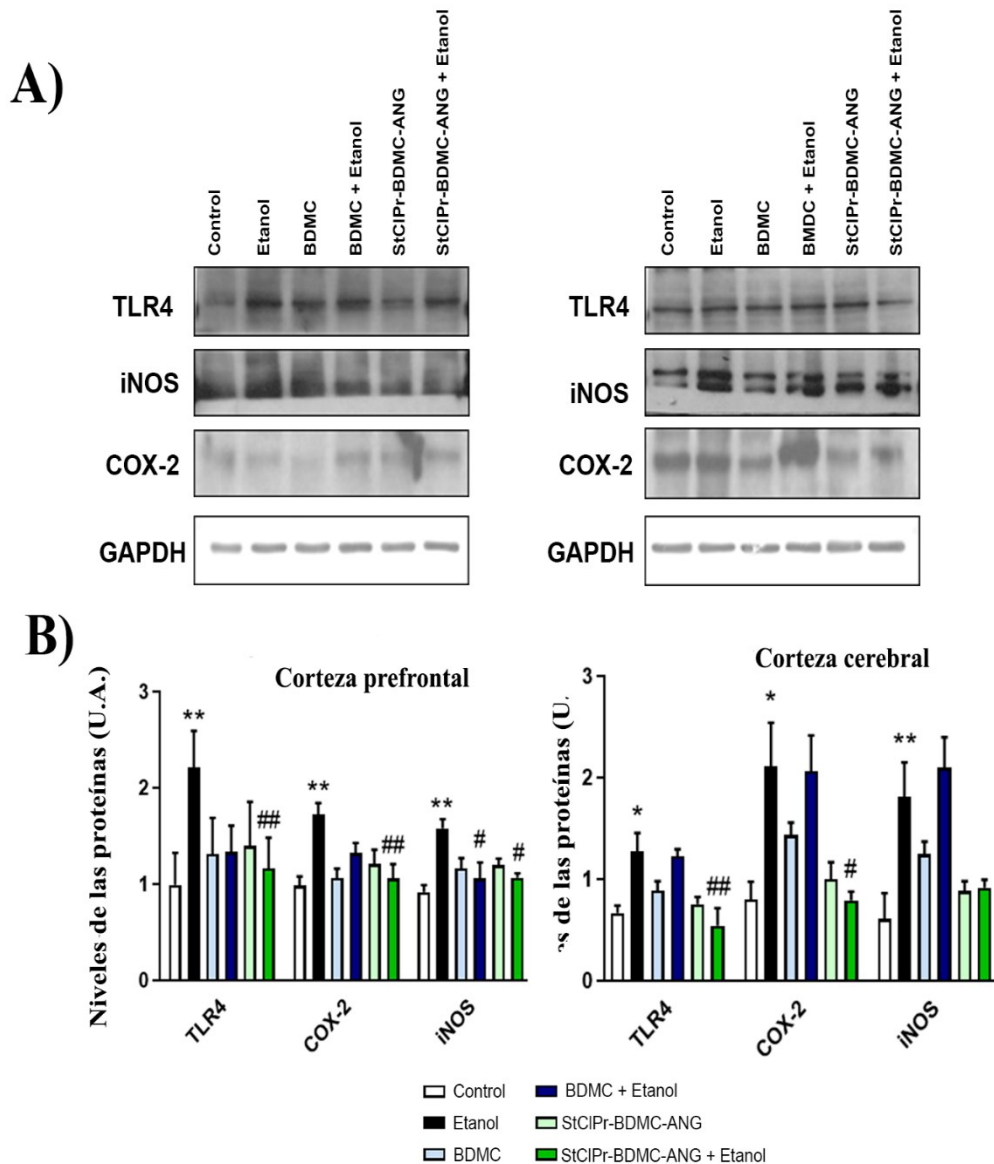


Figura 20. A) Análisis de inmunotransferencia de TLR4, COX-2 e iNOS en lisados de cerebro utilizando GAPDH como control de carga. Se muestra una inmunotransferencia representativa para cada proteína. B) Los datos representan la media \pm SEM, $n = 5$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ en comparación con su respectivo grupo de control. # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ en comparación con el grupo alcohólico, según el análisis One-Way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

También evaluamos el efecto de los tratamientos en los niveles proteicos de la citocina proinflamatoria interleucina 1 beta (IL-1 β) y la quimiocina fractalquina, ya que ambas son inducidas tras el consumo crónico de alcohol. Observamos alteraciones significativas en los niveles de la proteína IL-1 β en ambas regiones del cerebro estudiadas ((F (5,27) = 4.86, $P < 0.05$) para BC y (F (5,28) = 3.79, $P < 0.05$) para PFC), aunque la fractalquina solo mostró diferencias significativas en la región PFC (F (5,25) = 7.52, $P < 0.05$) (figura 21).

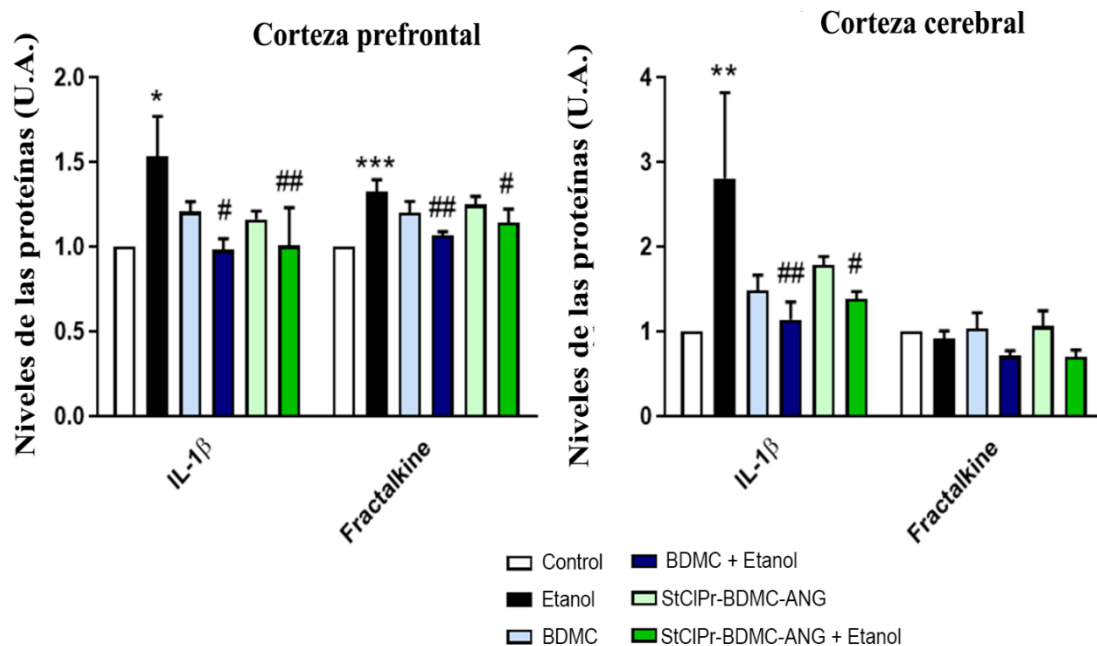


Figura 21. Niveles de IL-1 β y fractalquina en dos regiones del cerebro evaluados mediante ELISA. Los datos representan la media \pm SEM, n = 5. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 en comparación con su respectivo grupo de control. # p < 0,05 y ## p < 0,01 en comparación con el grupo de etanol, según el análisis One-Way ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

En general, observamos un aumento significativo en los niveles de IL-1 β en PFC y en BC después del tratamiento con etanol, y un aumento significativo de la fractalquina únicamente en la PFC. Sin embargo, los tratamientos en los animales alcohólicos crónicos, tanto de BDMC como de StCIPr-BDMC-ANG, redujeron significativamente los niveles de IL-1 β en ambas regiones, y de fractalquina en la región BC, por debajo de los niveles del grupo tratado con etanol (figura 21).

También analizamos la expresión del ARNm de genes asociados con la neuroinflamación (iNOS, TLR4 y CXCL12, una quimiocina inducida por estímulos proinflamatorios ((Karin, 2010))) en la BC mediante RT-qPCR. El análisis One-Way ANOVA muestra que no hay cambios significativos en los niveles de iNOS (F (3,18) = 0,6822, p > 0,05), TLR4 (F (3,16) = 2.907, p > 0.05) o CXCL12 (F (3,17) = 1.01, p > 0.05) (figura 22).

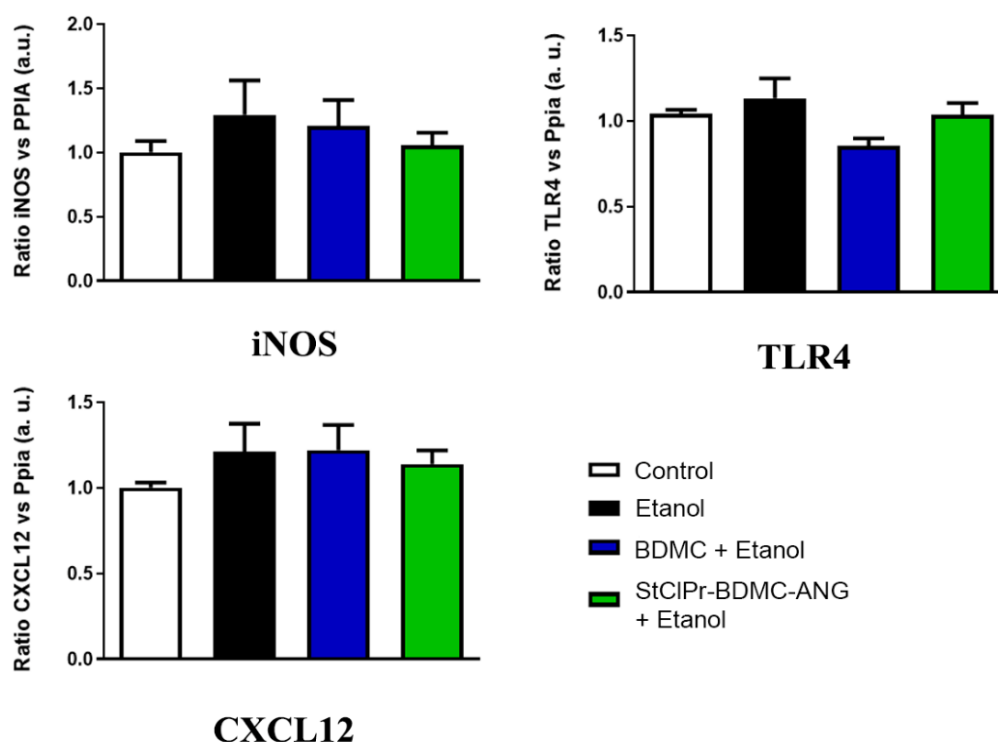


Figura 22. Niveles de expresión génica de iNOS, TLR4 y CXCL12 en la corteza cerebral. Los datos representan la media \pm SEM, $n = 7/5$, * $p < 0.05$, One-Way ANOVA seguido de la prueba Tukey para comparaciones múltiples.

En resumen, observamos aumentos no significativos en los niveles de ARNm de los tres genes evaluados en el grupo con tratamiento de etanol en comparación con el grupo control y disminuciones no significativas en la expresión de iNOS, TLR4 y CXCL12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12) después de la administración de StCIPr-BDMC-ANG o BDMC. Sin embargo, debido al aumento en iNOS y CXCL12 en el grupo tratado con etanol y la disminución de estos niveles de expresión después del tratamiento con StCIPr-BDMC-ANG, quizás podría haberse obtenido un resultado más concluyente con un tamaño muestral mayor.

6 StCIPr-BDMC-ANG altera los cambios inducidos por el etanol en la expresión de miARNs asociados con la neuroinflamación

Como se demuestra en anteriores resultados, el consumo crónico de alcohol induce la expresión de miARNs específicos vinculados a la neuroinflamación en la corteza cerebral (J. R.

Ureña-Peralta, Alfonso-Loeches, Cuesta-Diaz, García-García, & Guerri, 2018). Nos planteamos si las alteraciones en la expresión de ciertos miARNs en la corteza cerebral de animales alcohólicos, que podrían además atravesar la barrera hematoencefálica, servirían como biomarcadores del daño etílico en el SNC (figura 16A).

Por tanto, decidimos determinar si los tratamientos con BDMC y con StCIPr-BDMC eran capaces de revertir a valores normales la disminución en la expresión del miR-182, como representante del clúster 183, y del miR-200a, representante de la familia miR-200.

Los resultados analizados para miR-182 ($F(3,19) = 3.49$, p -valor > 0.05) y miR-200a ($F(3,20) = 2.01$, p -valor > 0.05) indicaron que el tratamiento con etanol causa una disminución marcada, aunque no significativa en los niveles de expresión en comparación con el grupo control no tratado (miR-182 control vs etanol, p -valor = 0,08; y miR-200a control vs etanol, p -valor = 0,13), sin que la administración de BDMC o StCIPr- BDMC-ANG en los grupos con tratamiento de alcohol pudiera restaurar la disminución en los niveles de expresión de miARN-182 y miARN-200a (figura 23).

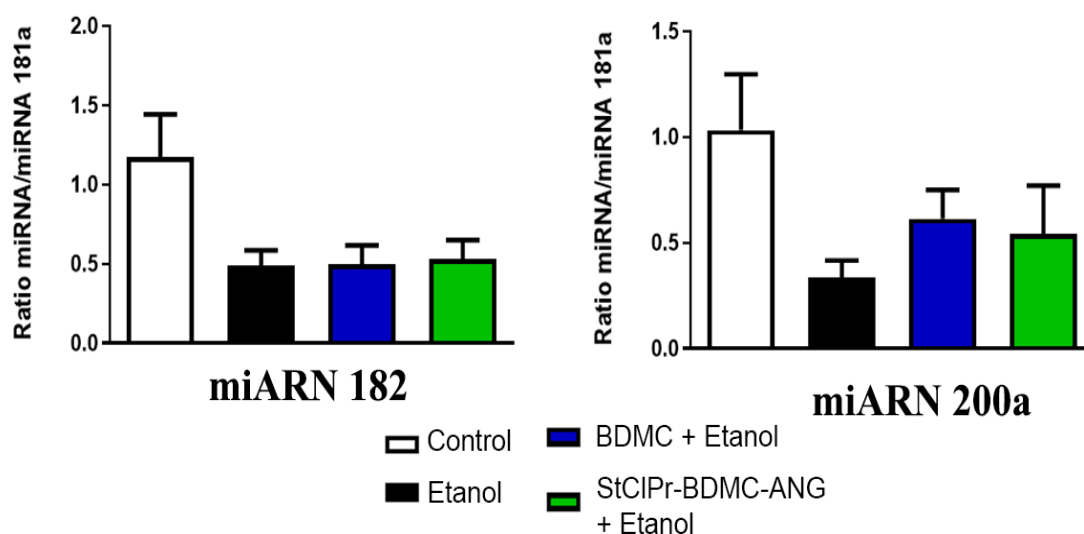


Figura 23. Expresión obtenida por RT-qPCR de los miR-200a y miR-182 en la corteza cerebral en los diferentes grupos experimentales. Los datos representan la media \pm SEM, $n = 7/5$, * $p < 0.05$, One-Way ANOVA seguido de la prueba Tukey para comparaciones múltiples.

Ante estos resultados decidimos pasar a un segundo enfoque, y evaluar los niveles de miARNs que hubieran salido alterados en los perfiles previos de miARNs en corteza cerebral, pero que también estuvieran involucrados en la modulación y señalización del TLR4 de forma

directa. Usando miRTargetLink, (Hamberg et al., 2016) una herramienta para la predicción y validación de interacciones entre genes y miRNAs específicos, comprobamos que miR-146a-5p, y Let-7b-5p, mostraban fuertes interacciones con el gen del TLR4 (figura 24A).

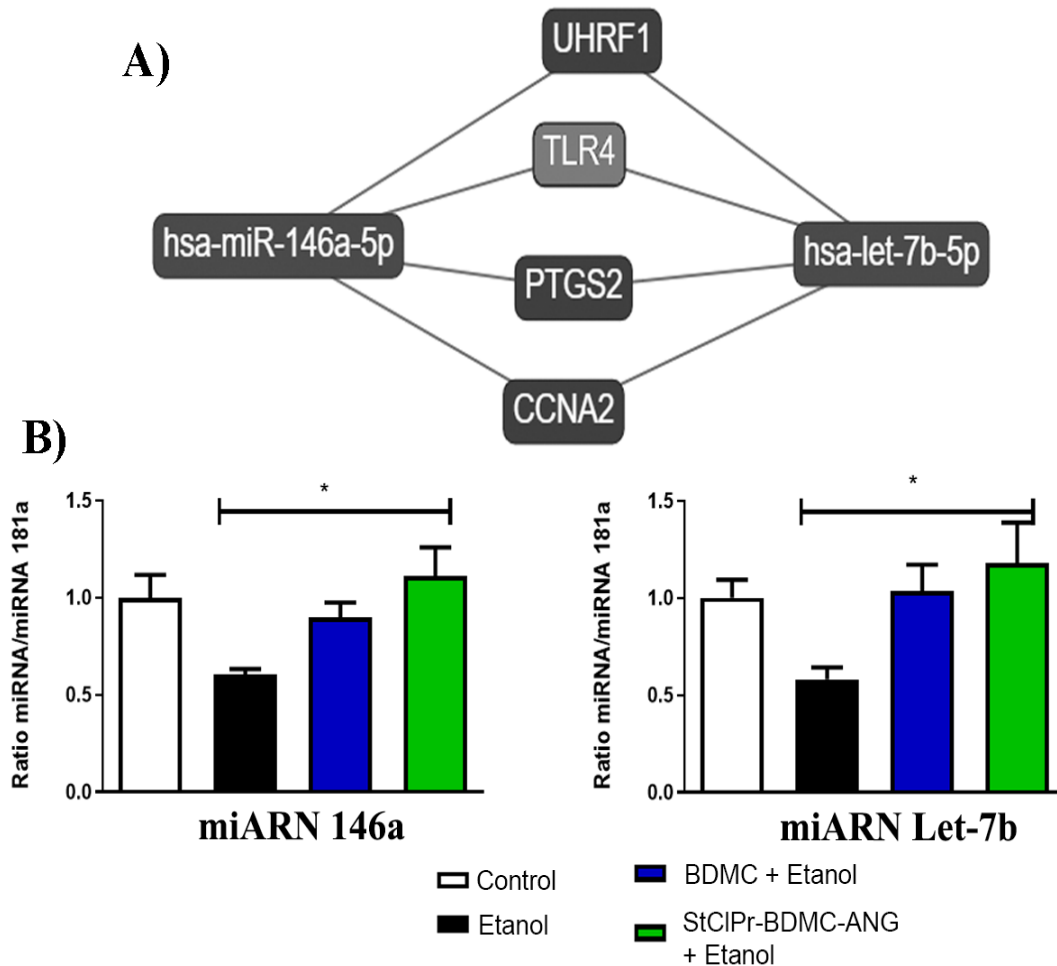


Figura 24. A) miRTargetLink ilustra TLR4 como diana de miARN 146a-5p y Let-7b-5p. B) Expresión obtenida por RT-qPCR de miR-146a-5 y Let-7b-5p en la corteza cerebral. Los datos representan la media \pm SEM, $n = 7/5$, * $p < 0.05$, One-Way ANOVA seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

MiR-146a-5p es un mediador en la supresión de la respuesta inflamatoria en mamíferos (Quinn & O'Neill, 2011; E. A. Ye & Steinle, 2016), y miR-Let-7b-5p es un modulador de la inflamación (Teng et al., 2013). En el caso del 146a-5p, el consumo de alcohol causaba una disminución en sus niveles, mientras que, por el contrario, el Let-7b se veía aumentado con la ingesta de alcohol (figura 16A).

Los datos obtenidos por RT-qPCR mostraron diferencias significativas tanto para la expresión del miR 146a-5p ($F(3,19) = 3.84$, $P < 0.05$) como del miR-let-7b-5p ($F(3,19) = 3.44$, $P < 0.05$) (figura 24B). Ambos presentaban regulación a la baja en los dos miARNs en el grupo con una ingesta crónica de etanol; sin embargo, el tratamiento con StClPr-BDMC-ANG, aunque no con BDMC, inhibió significativamente (grupos etanol vs StClPr-BDMC-ANG, p -valor = 0,023 en miR-146a-5p y p -valor = 0,032 en miR-Let-7b-5p) estas alteraciones en la expresión de los miARNs, que tenían efectos proinflamatorios.

Finalmente, con estos estudios, a nivel tanto proteico como de la expresión génica, podemos concluir que el tratamiento con el BDMC conjugado a la nanopartícula no solo tiene la capacidad de aliviar la respuesta inflamatoria ocasionada por el etanol en el SNC, sino que lo hace con mayor efectividad que la administración del compuesto BDMC en su forma libre, sin que se aprecien efectos tóxicos.

7 El tratamiento con etanol incrementó la expresión génica vinculada a la respuesta inflamatoria en el intestino

El último objetivo a tratar en la presente tesis consistió en evaluar el impacto del consumo crónico de alcohol en la comunidad microbiana, considerando el potencial papel que tendría la respuesta de TLR4 en estos efectos. La ingesta de alcohol a lo largo del tiempo puede dañar el epitelio intestinal y causar disbiosis en los individuos (Patel et al., 2015). Lo primero era confirmar que el consumo crónico de etanol hubiera causado una respuesta inflamatoria en el tejido intestinal del aparato digestivo de nuestros ratones.

Para lograr este objetivo, medimos varios ARNm de genes inflamatorios clave, en el tejido del colon, usando el método de la RT-qPCR (figura 25). La expresión del ARNm de la IL-1 β e iNOS aumentó significativamente en ratones WT con ingesta de alcohol, en comparación con los ratones WT control y los TLR4-KO tratados con alcohol ($F(3, 20) = 5.773$, p -valor < 0.05 y $F(3, 20) = 5.2$, p -valor < 0.05 , respectivamente). Asimismo, los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y COX-2 también fueron regulados positivamente en el grupo WE, en comparación con el grupo TLR4-KO ($F(3, 20) = 3.202$, p -valor < 0.05 y $F(3, 20) = 4.15$, p -valor < 0.05 , respectivamente). La IL-10 dio niveles de expresión significativamente elevados en el grupo WE en la comparación con el grupo WT ($F(3, 19) = 6,812$, p -valor < 0.05). De manera similar, CXCL10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10) mostró un patrón similar a los genes anteriores, con un incremento de su expresión en el grupo WE, aunque en esta ocasión el cambio no fue significativo.

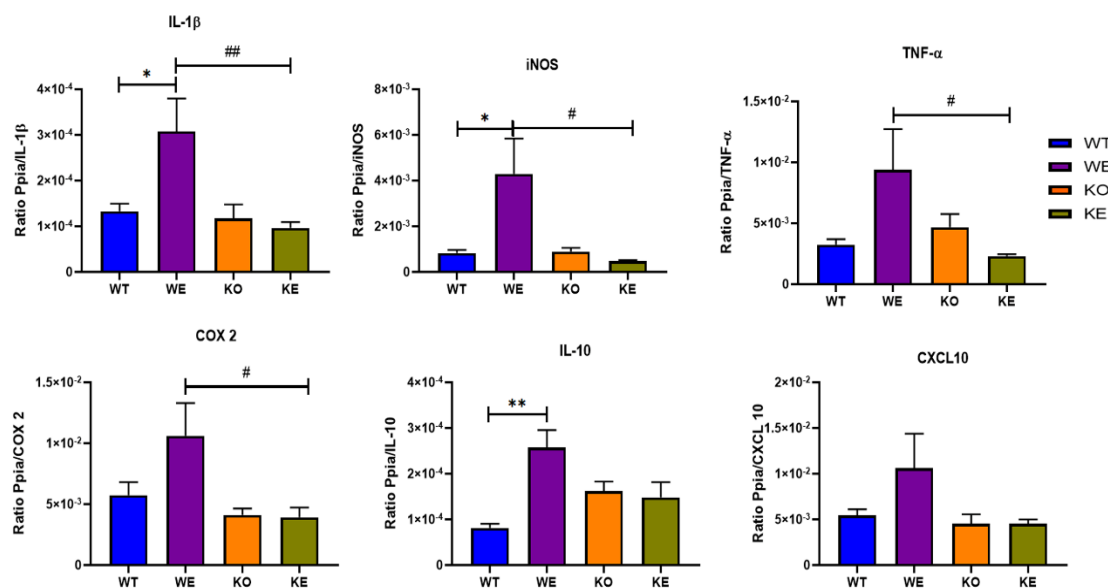


Figura 25. Análisis de expresión diferencial de genes inflamatorios mediante RT-qPCR.

Expresión en el colon de los niveles de ARNm proinflamatorio de IL-1 β , iNOS, TNF- α , COX-2, IL-10 y CXCL10 en ratones WT y TLR4 KO, con y sin tratamiento con etanol. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ para comparación de tratamientos, y # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ para comparación de genotipos por One-Way ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, excepto CXCL10, que fue analizado por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba Dunn para comparaciones. N = 6. Barras representadas como [media \pm SEM].

A continuación, evaluamos los niveles de los miRNAs, miR-155-5p y miR-146a-5p. Nuestros resultados anteriores indicaban que el consumo de alcohol incrementa la expresión de los miARNs miR-155-5p y miR-146a-5p en la corteza cerebral de ratones (J. R. Ureña-Peralta et al., 2018; Juan R. Ureña-Peralta, Pérez-Moraga, García-García, & Guerri, 2020), y que estos miRNAs están relacionados con la inflamación. Además, ambos miARNs se escogieron no solo por verse alterados con el consumo de etanol (Rossetto et al., 2019), sino porque adicionalmente regulan la respuesta inflamatoria al LPS (Bala et al., 2011), mediante su interacción con la ruta del TLR4 (Anzola et al., 2018; Lippai, Bala, Csak, Kurt-Jones, & Szabo, 2013). La Figura 26 muestra que ambos miARNs son inducidos por el tratamiento crónico con etanol en la comparación WT vs. WE. También confirmamos que el mismo tratamiento con etanol no indujo ningún cambio significativo en la expresión de estos miARNs en el grupo TLR4-KO ($F(3, 19) = 3.244$, p -valor < 0.05 y $F(3, 18) = 3.897$, p -valor < 0.05 , respectivamente para miR 155-5p y miR 146a-5p). Estos resultados sugieren que el tratamiento con etanol desencadena una cascada proinflamatoria únicamente en los ratones WT, pero no en los ratones TLR4-KO. Al mismo tiempo, los datos refuerzan la hipótesis de que los ratones WT y TLR4-KO pudieran tener una

microbiota intestinal diferente, debido a la ausencia de dicho receptor del SII. Esta microbiota nueva respondería de forma diferente a la ingesta crónica de etanol.

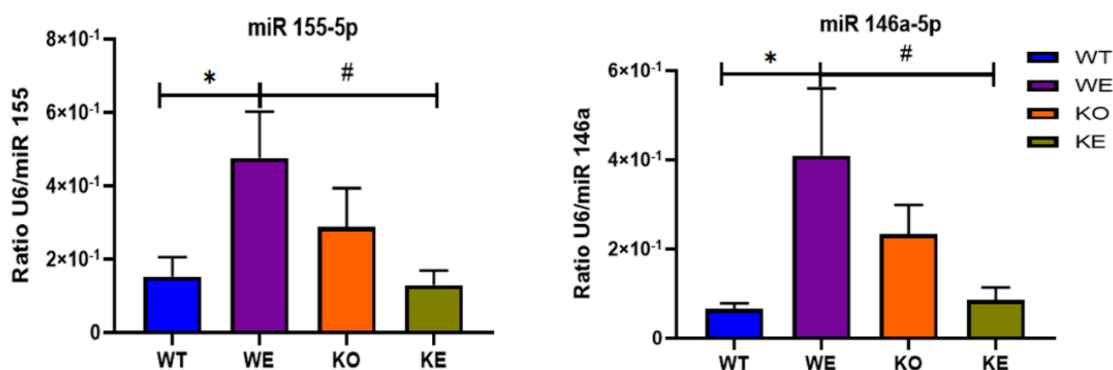


Figura 26. Análisis de la expresión diferencial de los miARNs inflamatorios mediante RT-qPCR. Expresión en el colon de los niveles de miR 155-5p y miR 146a-5p en ratones WT y TLR4 KO, con y sin tratamiento con etanol. * p <0.05 para comparación de tratamientos, y # p <0.05 para comparación de genotipos, por One-Way ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. N = 6. Barras representadas como [media ± SEM].

8 Análisis del peso corporal y de la ingesta en los distintos grupos experimentales

A continuación, se analizó el peso corporal y las ingestas en los diferentes grupos experimentales durante el periodo de tratamiento del alcohol de los animales para controlar que su régimen alimenticio no hubiera sufrido variaciones que pudieran afectar a la microbiota. Tanto la ingesta de alimento sólido como la ingesta de líquidos (agua solamente o agua con etanol al 10% v/v) fue similar en los cuatro grupos de estudio, como se muestra en la tabla 9. La ingesta de sólidos y líquidos, así como las variaciones en el peso corporal del ratón se detallan en la figura 27. Ninguno de los grupos exhibe cambios significativos con relación a los otros grupos, ya fuera por su genotipo o por su tratamiento, en ninguno de los tiempos en los que se realizaron las mediciones.

Tabla 9: Ingesta diaria media de alimento y líquidos por ratón en cada uno de los grupos.

	Ingesta media alimento	Ingesta media líquido
WT	2,48 ± 0,2 g	3,07 ± 0,5 ml
KO	2,6 ± 0,25 g	3,1 ± 0,55 ml
WTE	2,67 ± 0,17 g	2,86 ± 0,63 ml
KOE	2,87 ± 0,34 g	3,67 ± 0,46 ml

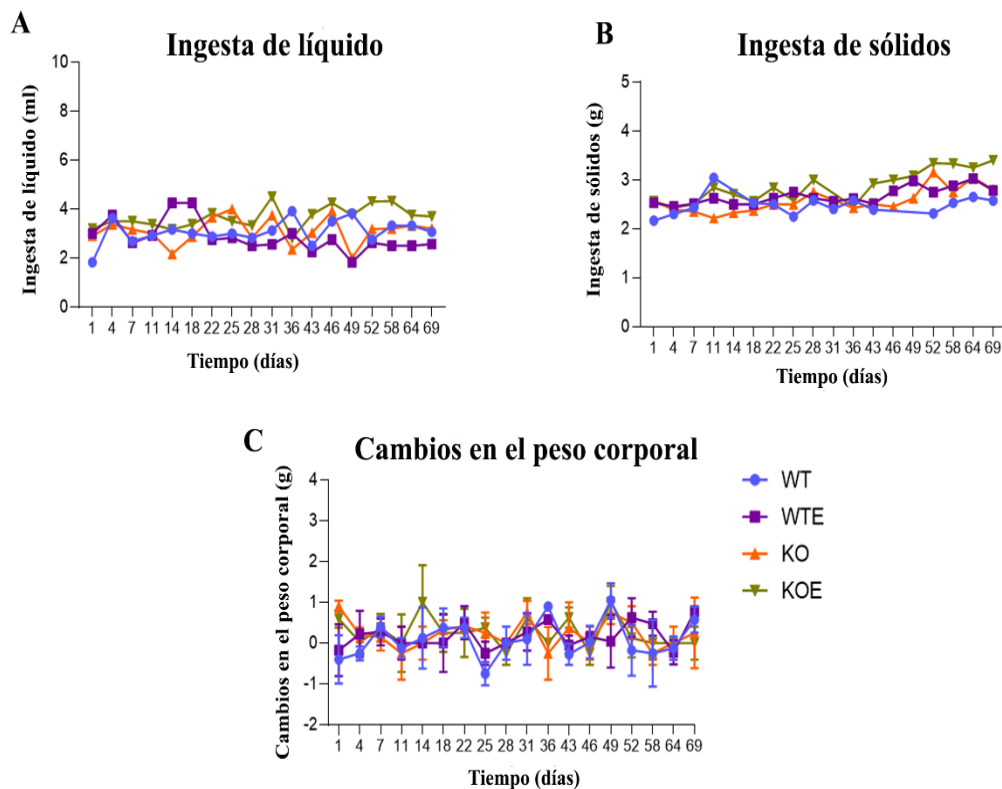


Figura 27: Análisis de la ingesta y del peso corporal en los cuatro grupos de ratones durante el tiempo que fueron tratados con etanol. **(A)** Ingesta de líquido (agua y agua conteniendo 10% de alcohol, según grupo control o grupo tratado). **(B)** Ingesta de alimentos sólidos. **(C)** Variaciones en el peso corporal. No se observaron cambios significativos entre los diferentes grupos experimentales. N = 4 por grupo.

9 Impacto del TLR4 y el consumo de etanol en la comunidad microbiana intestinal

Dada la estrecha relación entre la expresión génica y la inflamación en el intestino, con las especies bacterianas que habitan en él (Blander, Longman, Iliev, Sonnenberg, & Artis, 2017; Lobionda, Sittipo, Kwon, & Lee, 2019; Nichols & Davenport, 2020), teorizamos que las comunidades bacterianas en los cuatro grupos experimentales presentarían un perfil microbiano distinto. Por tanto, realizamos el análisis de las secuencias del ARNr 16S de las heces de los distintos grupos de animales, tanto en machos como en hembras, para determinar los efectos del etanol en la microbiota después de 3 meses de tratamiento. Un esquema resumido de los métodos informáticos usados para el análisis de las secuencias obtenidas se representa en la

figura 28. Los ASVs obtenidos fueron alineados frente a la base de datos SILVA 138 para su asignación taxonómica y ser analizados posteriormente para estudiar la diversidad alfa, realizar el NMDS (escalamiento multidimensional no métrico), análisis de la abundancia bacteriana y análisis estadísticos.

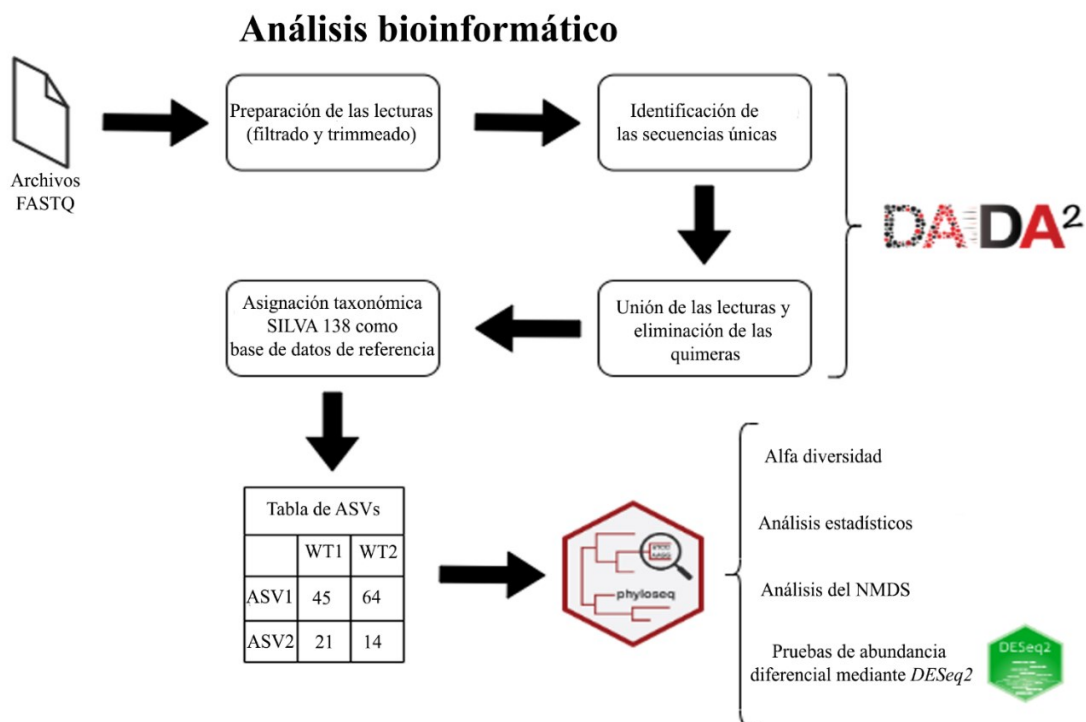


Figura 28. Representación esquemática de los métodos informáticos usados para el estudio de las secuencias bacterianas obtenidas.

Después de limpiar y filtrar los datos, el número final de secuencias utilizadas en el análisis bioinformático tuvo un promedio por muestra de 19.221 lecturas, con una desviación estándar de 15.877. En la tabla 10 se exponen las muestras utilizadas en el estudio de los machos, con los indexes usados en ellas, su longitud media, lecturas totales, lecturas viables finales y porcentaje taxonomizado en cada nivel. No se indica a nivel de especie ya que el porcentaje clasificado en ese taxón fue únicamente del 2/3% por muestra, debido a que para asignar un ASV en una especie, la homología tenía que ser del 100% en toda la longitud de la lectura.

Tabla 10. Muestras usadas en el estudio de la microbiota de los machos con sus indexes, longitud media, lecturas totales, lecturas finales, porcentaje de lecturas finales en relación con el total y el porcentaje de ASVs que se lograron taxonomizar en cada nivel de taxón.

Grupo	Muestra	Indexes	Longitud media	Lecturas totales	Lecturas finales %	Lecturas finales	Niveles taxonomizados %				
							Filo	Clase	Orden	Familia	Género
WT	WT-1	S503 - N702	667	61.725	64,23%	39.649	100%	100%	99,75%	94,22%	47,74%
	WT-2	S503 - N701	673	51.591	68,15%	35.160	100%	100%	100,00%	92,27%	53,37%
	WT-3	S503 - N703	686	31.108	62,49%	19.440	100%	100%	100,00%	95,74%	50,35%
	WT-4	S503 - N704	672	23.280	58,08%	13.520	100%	100%	100,00%	96,65%	53,97%
	WT-5	S503 - N706	660	24.680	62,56%	15.440	100%	100%	100,00%	89,45%	53,91%
	WT-6	S504 - N701	668	23.960	62,72%	15.028	100%	100%	100,00%	95,65%	52,84%
	WT-7	S504 - N702	606	7.144	62,05%	4.433	100%	100%	100,00%	95,38%	50,77%
	WT-8	S504 - N701	630	18.253	65,85%	12.020	100%	100%	100,00%	93,01%	47,31%
WT crónico	WE-1	S503 - N705	621	20.518	65,66%	13.472	100%	100%	99,62%	93,23%	53,01%
	WE-2	S503 - N703	680	23.998	56,86%	13.646	100%	100%	100,00%	92,72%	44,66%
	WE-3	S503 - N704	655	21.630	63,05%	13.638	100%	100%	99,59%	89,30%	46,50%
	WE-4	S503 - N706	621	18.971	71,34%	13.533	100%	100%	100,00%	93,30%	45,88%
	WE-5	S502 - N704	625	31.558	74,44%	23.493	100%	100%	100,00%	91,88%	55,13%
	WE-6	S502 - N703	623	21.989	57,44%	12.630	100%	100%	99,56%	86,40%	45,18%
TLR4-KO	KO-1	S502 - N706	661	89.854	70,92%	63.724	100%	100%	99,80%	93,08%	51,53%
	KO-2	S502 - N705	687	99.983	71,29%	71.274	100%	100%	99,13%	92,36%	44,10%
	KO-3	S517 - N701	628	17.907	60,55%	10.843	100%	100%	100,00%	97,83%	48,26%
	KO-4	S517 - N702	631	27.921	63,79%	17.810	100%	100%	100,00%	94,88%	51,15%
	KO-5	S517 - N703	647	48.240	46,32%	22.345	100%	100%	100,00%	96,49%	52,19%
	KO-6	S517 - N704	628	18.126	52,18%	9.459	100%	100%	99,60%	92,06%	54,76%
	KO-7	S517 - N705	631	18.686	56,23%	10.508	100%	100%	100,00%	93,16%	52,63%
	KO-8	S517 - N706	624	18.654	58,61%	10.933	100%	100%	100,00%	94,47%	53,46%
TLR4-KO crónico	KE-1	S504 - N706	631	16.115	61,23%	9.868	100%	100%	100,00%	93,96%	50,00%
	KE-2	S504 - N703	617	16.102	57,15%	9.203	100%	100%	100,00%	97,56%	47,56%
	KE-3	S504 - N704	606	13.019	61,70%	8.033	100%	100%	100,00%	93,96%	56,38%
	KE-4	S504 - N705	646	13.101	62,35%	8.168	100%	100%	100,00%	94,20%	45,65%
	KE-5	S502 - N701	658	16.241	70,75%	11.491	100%	100%	100,00%	95,60%	49,06%
	KE-6	S502 - N702	659	48.185	61,10%	29.443	100%	100%	100,00%	93,79%	50,31%

A continuación, utilizamos un gráfico de NMDS basado en Bray-Curtis (PERMANOVA F-value: 3.1165, R-squared: 0.28035, p-value: 0.00099) para evaluar la similitud entre las heces de los ratones macho (figura 29A). Utilizando este enfoque, evaluamos las semejanzas estructurales en las comunidades microbianas entre las muestras de WT, WTE, KO y TLR4-KOE, encontrando diferencias significativas entre los perfiles bacterianos de los distintos grupos experimentales. En la figura 29A se muestra una separación significativa entre el genotipo TLR4-KO frente al grupo WT (p-valor ajustado < 0.01), lo que indica el importante papel del TLR4 en la composición bacteriana. Además, los grupos TLR4-KO y TLR4-KOE

presentan sus muestras formando grupos homogéneos separados entre si significativamente (p-valor ajustado < 0.01), mientras que los individuos WT y WTE forman un único grupo heterogéneo (p-valor ajustado = 0.74), lo que indicaría que el consumo de etanol provoca mayores cambios en la microbiota de los individuos TLR4-KO.

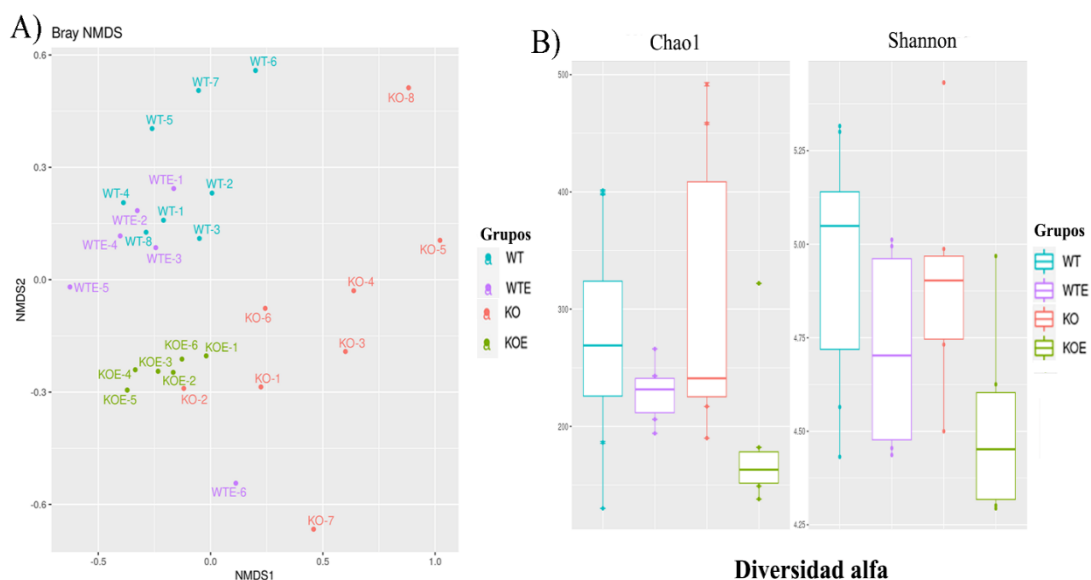


Figura 29: (A) Representación de la microbiota fecal en los cuatro grupos experimentales de machos en un NMDS basado en Bray-Curtis, donde podemos ver como se posicionan en tres agrupaciones diferenciadas. (B) La diversidad de bacterias se analizó mediante el índice de Chao1 y el índice de Shannon. La diversidad alfa de la microbiota se reduce con el consumo de etanol con independencia del genotipo, y la ausencia de TLR4 no afecta al número de especies. Estadística realizada con la prueba U de Mann-Whitney con p-valores corregidos por Benjamini & Hochberg, N = 6.

Después, medimos la diversidad alfa en las heces de los ratones utilizando dos índices diferentes: índice Chao1 y de Shannon (figura 29B). Estos índices de diversidad alfa sugieren que los grupos control (WT y TLR4-KO) tenían una riqueza promedio más alta de especies bacterianas y un mayor grado de diversidad que los grupos tratados con etanol (WTE y KOE), aunque es destacable la desviación dentro de cada grupo entre las muestras. Estos resultados indican que el tratamiento con alcohol provoca una menor diversidad bacteriana en comparación con los controles.

Los grupos KO vs KOE son los más diferentes respecto a su diversidad (p-valores 0,076 y 0,13 en el índice de Chao1 y en el índice de Shannon, respectivamente), mientras que WT vs KO son los grupos más similares (p-valores 0,959 y 0,51 en el índice de Chao1 y en el índice de Shannon, respectivamente).

10 La presencia del receptor TLR4 es un factor más importante para la microbiota intestinal que la edad o el consumo de etanol

Para comprobar si las diferencias en la microbiota tienen relación con la edad, hicimos un segundo NMDS-Bray Curtis con las muestras extraídas de las hembras, donde se habían recogido heces antes del tratamiento, a los 2 meses de edad. Realizamos el Bray-Curtis de las 48 muestras, tanto antes como después del tratamiento (figura 30A), sin que viéramos que las muestras estuvieran agrupadas por edades, sino que se distribuyeron heterogéneamente en relación con esta variable. Aprovechamos el mismo NMDS-Bray Curtis para visualizar las variables de tratamiento y genotipo en las muestras recogidas después de 3 meses de tratamiento con alcohol (figura 30B) en las hembras. En los resultados se observa una separación entre las muestras provenientes de genotipo diferentes, que se hace más notable al añadir las muestras previas al tratamiento (figura 30C). Resultados similares se obtuvieron en el NMDS de los machos, donde la presencia o ausencia del TLR4 era el principal condicionante para el perfil microbiano de la muestra. En relación con el tratamiento, las muestras tratadas con etanol se encuentran más cercanas entre sí y en una posición más centralizada dentro del plano, mientras que las muestras provenientes de los individuos control están distribuidas más arbitrariamente, lo que indica una microbiota menos similar entre ellas. La pérdida de biodiversidad y una respuesta similar de la comunidad microbiana frente a la ingesta de alcohol podría originar unos perfiles bacterianos más semejantes en ambos grupos de animales tratados con etanol que en los grupos control.

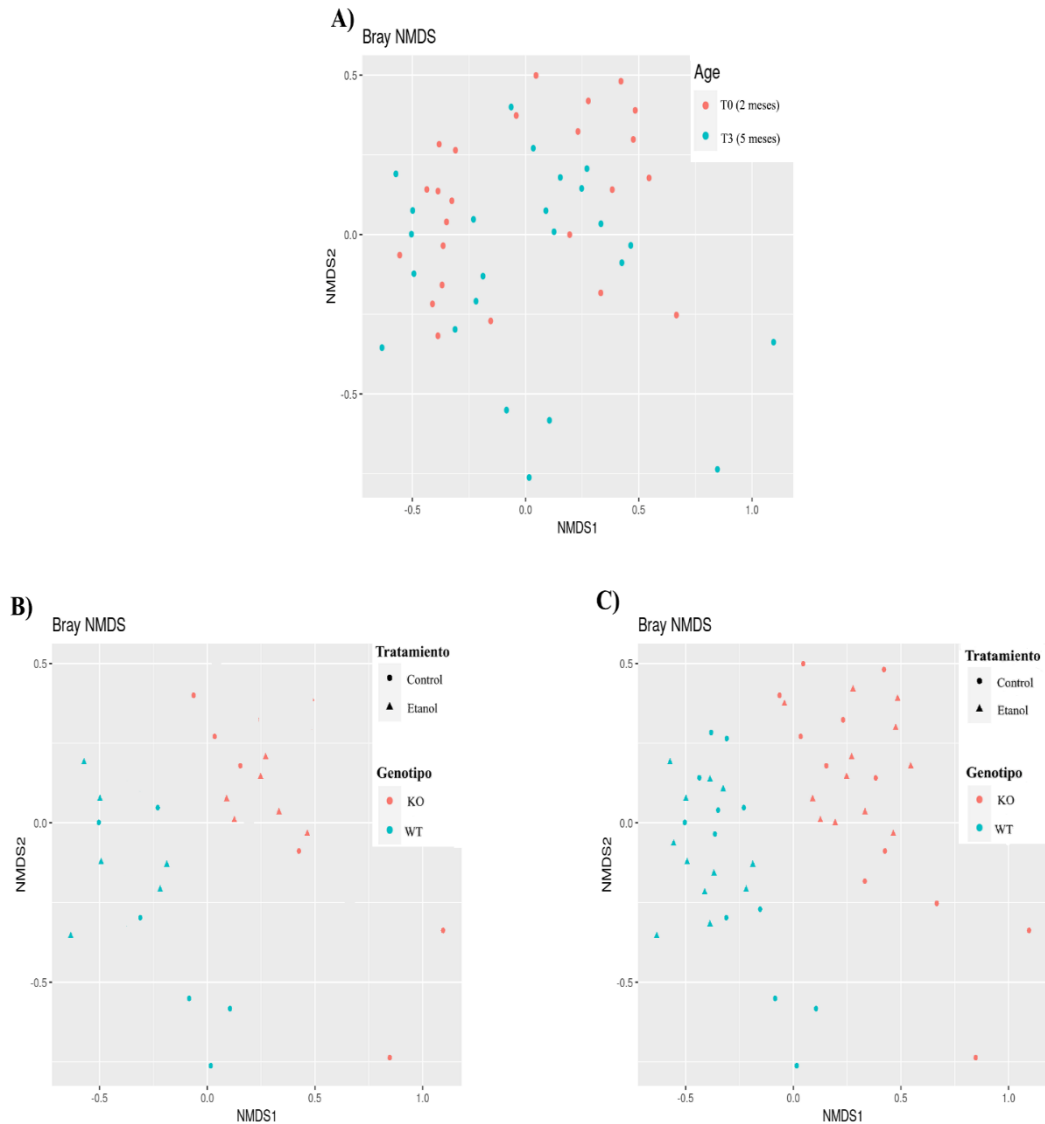


Figura 30: Representación de la microbiota fecal en los cuatro grupos de animales hembras en un NMDS basado en Bray-Curtis. **A)** NMDS-Bray Curtis donde las muestras se marcan por el momento de la recogida. **B)** NMDS-Bray Curtis donde se representan las muestras del T3 (5 meses de edad) marcadas por su genotipo y tratamiento. **C)** NMDS-Bray Curtis donde se representan las muestras tanto del T0 (2 meses de edad) como del T3 marcadas por su genotipo y tratamiento.

Cabe destacar que el perfil bacteriano en las muestras de los machos tratados con etanol (WTE y TLR4-KOE) muestran una mayor similitud entre sí, formando dos clústeres reconocibles, en comparación a los mismos grupos de animales hembra, donde el tratamiento no forma clústeres que se puedan visualizar en el plano del NDMS. Al ahondar en estas diferencias de género, no podemos evitar notar como el comportamiento de la microbiota intestinal en ambos sexos parecen ser distinto frente al cambio en su ecosistema, que supone la incorporación del alcohol.

11 El tratamiento con alcohol crónico y la deficiencia en la expresión del TLR4 pueden modificar la microbiota intestinal en los ratones

Aunque la diversidad alfa no se ve afectada significativamente por el etanol, su consumo y la respuesta del TLR4 modifican los perfiles taxonómicos en el colon de los ratones. Por tanto, realizando un análisis diferencial con el paquete *DESeq2*, se estudiaron las abundancias de cada grupo taxonómico y se evaluaron las diferencias significativas entre los grupos WTE vs WT, TLR4-KOE vs KO y TLR4-KO vs WT.

Los resultados mostraron 9 filos predominantemente presentes en la mayoría de las muestras, tanto en machos como en hembras: Actinobacteriota, Bacteroidota (Bacteroidetes), Cyanobacteria, Deferribacterota, Desulfobacterota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria y Verrucomicrobiota (figura 31). Sin embargo, las especies bacterianas no se distribuyen equitativamente entre estos filos, por ejemplo, la abundancia de los filos Firmicutes y Bacteroidetes combinada fue de alrededor del 90/95% del total.

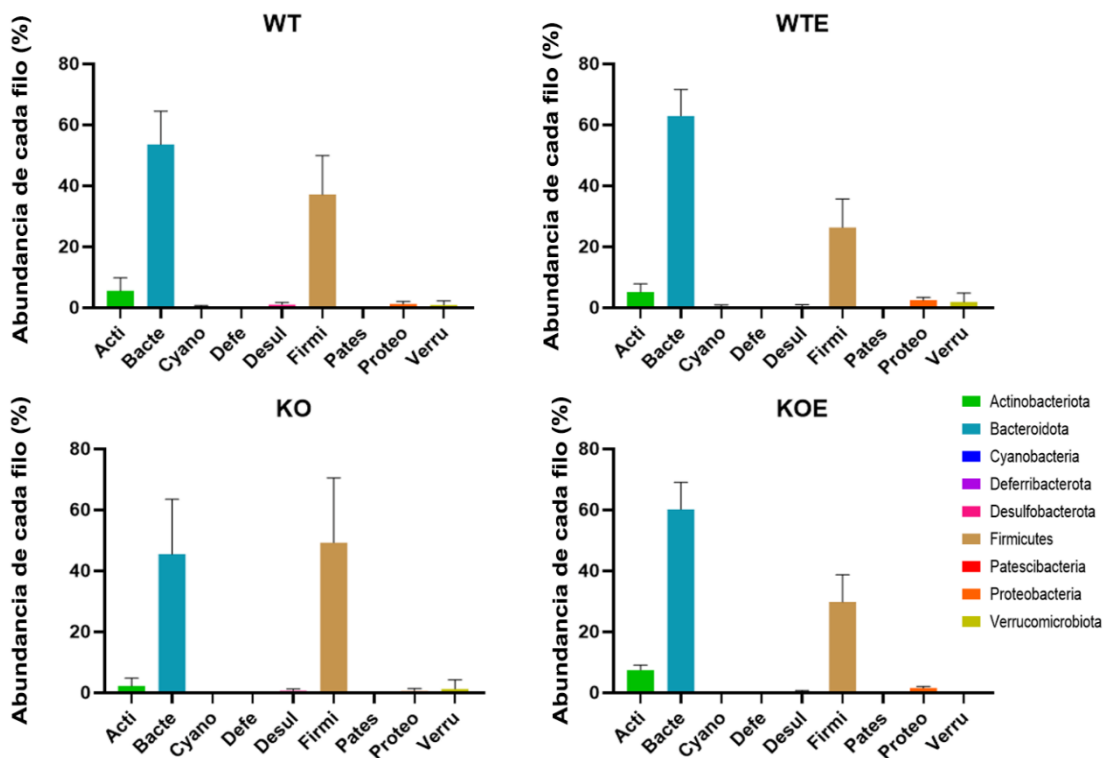


Figura 31: Promedio de la abundancia de los filos hallados en cada grupo experimental, donde se aprecia el dominio de los filos Firmicutes y Bacteroidota.

A nivel de clase, las dos más abundantes (aproximadamente el 90% de todas las bacterias taxonomizadas) son Bacteroidia y Clostridia, pertenecientes a los filos Bacteroidetes y Firmicutes, respectivamente. Dentro del taxón orden, dominan Bacteroidales y Lachnospirales, seguidos (con una abundancia mucho menor en comparación a los dos taxones de orden anteriores) de Erysipelotrichales y Oscillospirales. A nivel de familia, las dos más abundantes son *Lachnospiraceae* y *Muribaculaceae*. Finalmente, a nivel de género, el dominante fue el *Lachnospiraceae NK4A136*. En la mayoría de las muestras, de los géneros taxonomizados, 10 de ellos conforman más del 60% de todos los géneros encontrados. En la figura 32 se exhiben los 10 géneros más abundantes en las heces de las hembras al final del tratamiento.

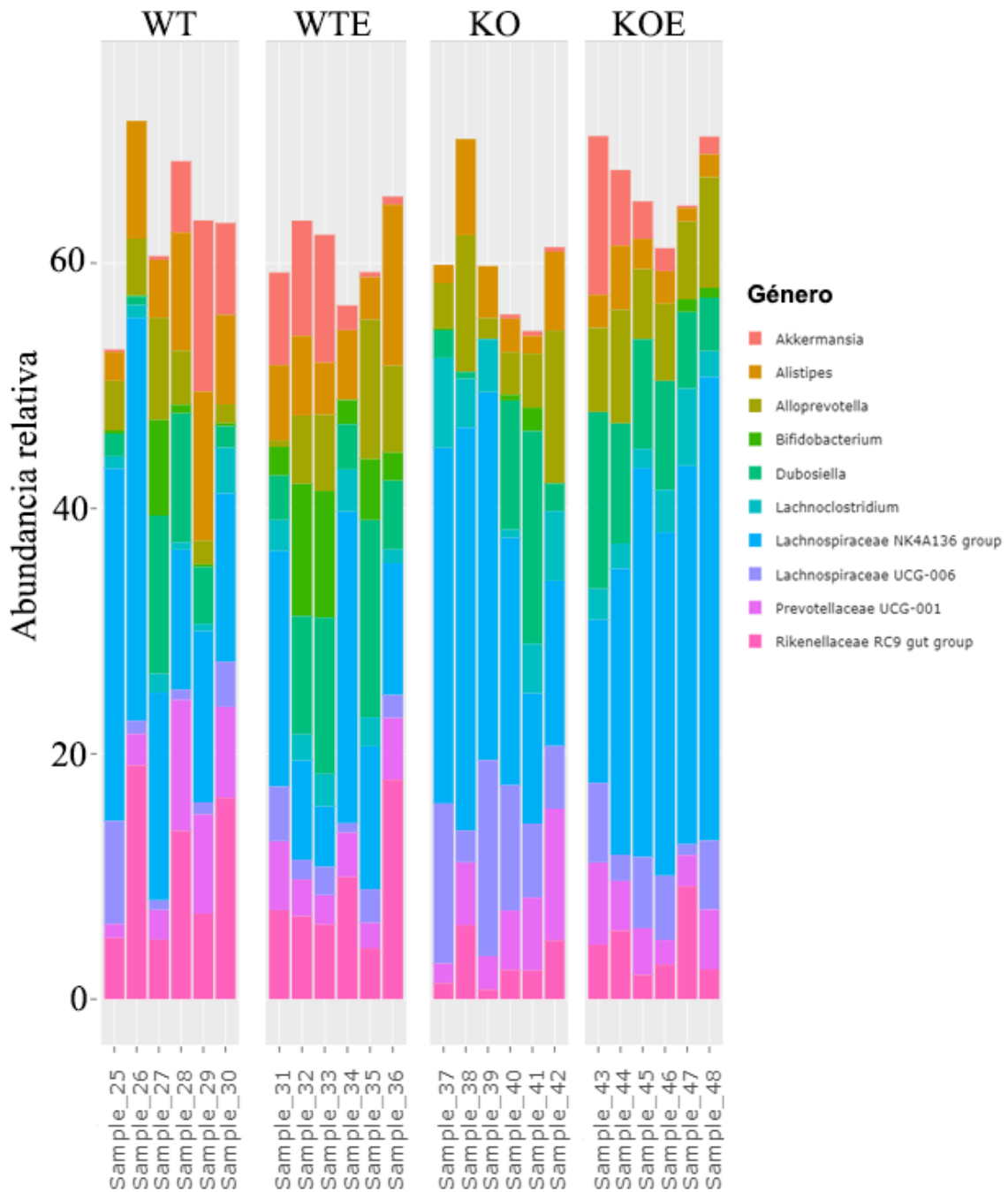


Figura 32: Los 10 géneros bacterianos más abundantes en la microbiota intestinal en hembras, expresados como abundancia relativa en relación con los géneros que han podido ser taxonomizados. Aproximadamente el 50% de los géneros no han podido ser asignados, por lo que no podemos descartar que con el 100% de los géneros clasificados esta lista pudiera cambiar.

Con los datos de los filos, calculamos la ratio Firmicutes / Bacteroidetes, citado en ocasiones como un factor de mayor riesgo de problemas intestinales. El grupo TLR4-KO tiene una proporción más alta en comparación con el grupo WT (ratio de 0,69 y 1,08, respectivamente). Respecto al tratamiento con etanol, encontramos valores similares al

comparar los grupos WTE y TLR4-KOE (0,42 y 0,5). Tanto en machos como en hembras solo en el grupo TLR4-KO el filo Firmicutes es más abundante que Bacteroidetes (figura 33), con una disminución de la ratio en los grupos crónicos, en relación con sus controles.

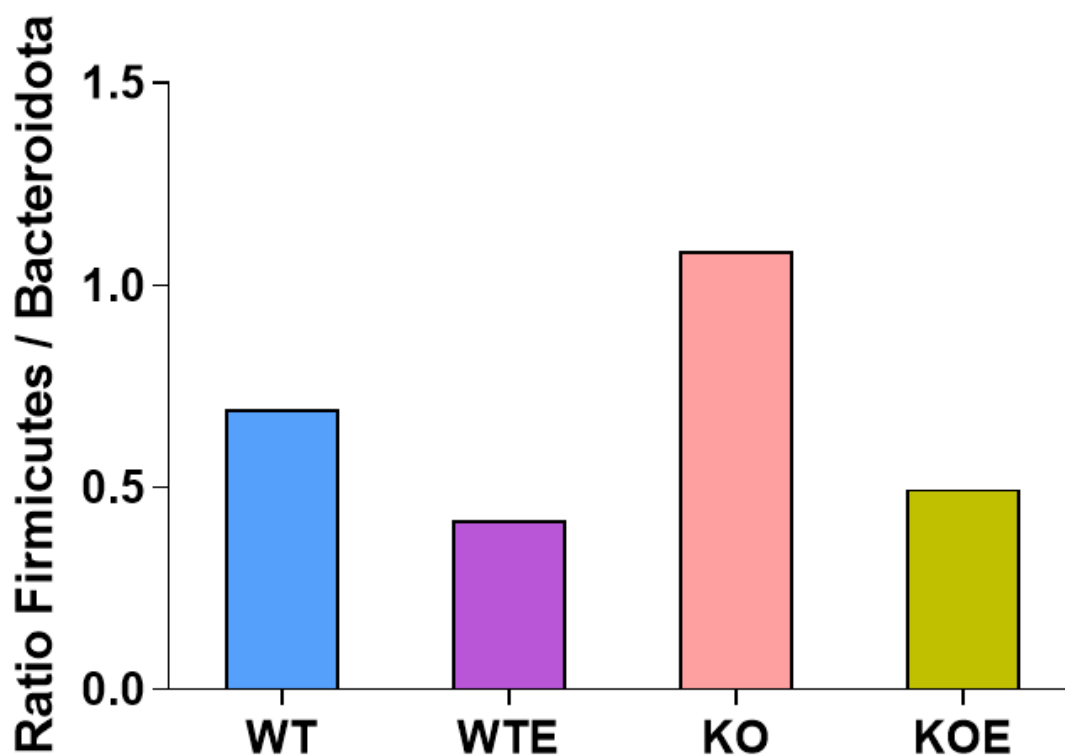


Figura 33. Representación de la ratio Firmicutes / Bacteroidota en cada uno de los grupos experimentales estudiados. Firmicutes domina únicamente en los ratones TLR4-KO.

Con respecto al tratamiento con alcohol y la clasificación bacteriana en Gram (+) y (-), hubo una disminución similar de Gram (+) en ambos grupos alcohólicos, al compararlos contra sus grupos control (figura 34), WT vs WE (42,75% vs 31,62%) y TLR4-KO vs TLR4-KOE (51,31 % vs 37,64%). Aunque estas diferencias no resultaron ser significativas, un aumento del tamaño muestral posiblemente podría confirmar significación en la comparativa WT vs WTE. El análisis estadístico de las comparaciones realizadas se detalla en la tabla 11.

Gram abundance

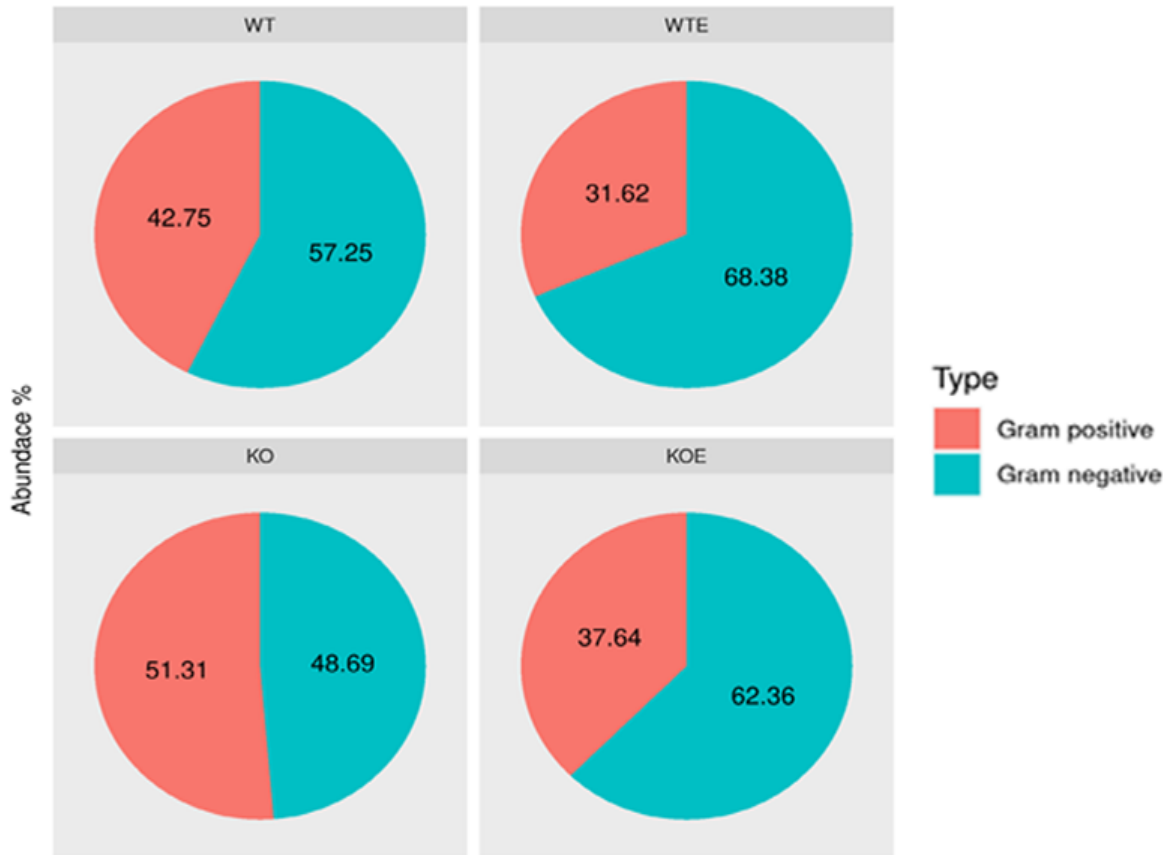


Figura 34: Representación del promedio de la abundancia de Gram (+) y Gram (-) en los cuatro grupos experimentales.

Tabla 11: Análisis estadístico de las abundancias de las bacterias Gram (+) / (-). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los p-valores se corrigieron mediante el método de Sidak.

Comparación	Z-score	P-valor	P-valor ajustado
KO - KOE	-1,3599	0,086921	0,420505
KO - WT	-0,75978	0,223690	0,781118
WT - WTE	-15,9443	0,055419	0,289712

Siendo Firmicutes un filo Gram (+), y Bacteroidetes un filo Gram (-), es evidente que las alteraciones en la abundancia de estos dos fillos son los principales condicionantes para los cambios en los porcentajes de bacterias Gram.

Con respecto a la abundancia en los fillos bacterianos de los machos, la figura 35 muestra cómo el filo Desulfobacterota se reduce en las comparativas de dos grupos de animales: WTE vs WT ($p = 0.036$) y TLR4-KOE vs TLR4-KO ($p = 0.022$), indicando el efecto del tratamiento con etanol en este filo. El filo de las Cianobacterias también se ve afectado

negativamente por el consumo de alcohol en ratones TLR4-KO ($p = 0,024$), pero es interesante destacar que los ratones WT no se ven afectados significativamente por el tratamiento de etanol.

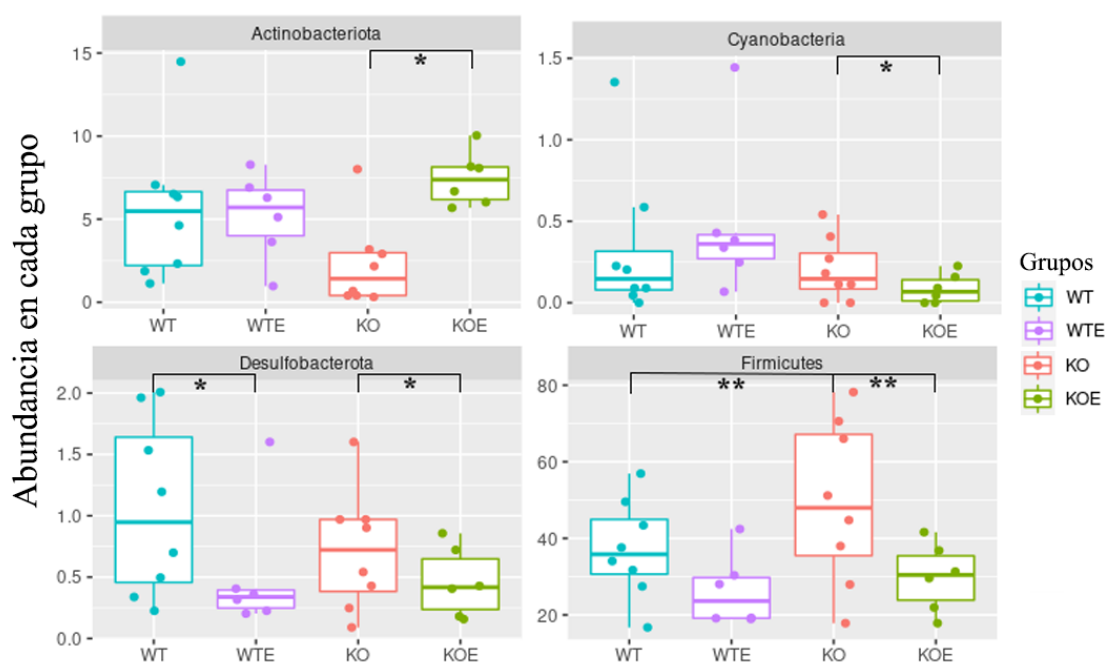


Figura 35. Estudio de la abundancia de cada filo en las comparativas, WTE frente a WT, TLR4-KOE frente a TLR4-KO y TLR4-KO frente a WT. El análisis de la expresión diferencial se determinó utilizando el paquete *DESeq2* y se muestra en la tabla 12. Se utilizó el método de Benjamini-Hochberg para realizar la corrección del p-valor. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

El tercer filo, Firmicutes, también disminuyó significativamente tanto en las comparativas TLR4-KOE vs TLR4-KO ($p < 0,001$), como en las comparativas WT vs TLR4-KO ($p < 0,001$), siendo más dominante en ratones TLR4-KO, como hemos comentado anteriormente. El último filo, Actinobacteriota, es el único en el que la ingesta de etanol provocó un crecimiento de la población, aumentando en TLR4-KOE vs TLR4-KO ($p = 0,043$), aunque no se observó ningún efecto significativo al comparar los grupos WT vs WTE. En la tabla 12 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 12: Expresión diferencial a nivel del filo bacteriano entre WTE vs WT, TLR4-KOE vs TLR4-KO y TLR4-KO vs WT. Solo se muestran comparativas de filios con un p-valor <0.05.

	Media base	log2FoldChange	lfcSE	stat	p-valor	p-adj	Reino	Filo
WTE vs WT								
ASV114	114,4344	-1,270112927	0,6042	-2,1022	0,0355	0,3199	Bacteria	Desulfobacterota
KOE vs KO								
ASV5	751,6963	1,292250696	0,6392	2,0216	0,0432	0,0972	Bacteria	Actinobacteriota
ASV13	6441,3413	-1,388447959	0,3549	-3,9117	0,0001	0,0008	Bacteria	Firmicutes
ASV114	114,4344	-1,384593324	0,6059	-2,2850	0,0223	0,0716	Bacteria	Desulfobacterota
ASV336	42,1149	-1,928904887	0,8537	-2,2594	0,0239	0,0716	Bacteria	Cyanobacteria
KO vs WT								
ASV13	6441,3413	1,197065596	0,3286	3,6432	0,0003	0,0024	Bacteria	Firmicutes

12 La microbiota bacteriana intestinal se modifica tanto por el consumo crónico del etanol como por la ausencia del TLR4 en ratones macho adultos

Para evaluar los cambios en los perfiles bacterianos del resto de los taxones, utilizamos el paquete *DESeq2* para encontrar los ASVs con expresión estadísticamente diferente (p-valor ajustado < 0.01) en tres comparativas: WTE frente a WT, TLR4-KOE frente a TLR4-KO y TLR4-KO frente a WT.

Debido a la gran cantidad de información obtenida en los análisis comparativos, optamos por ser más estrictos con el p-valor usado para acotar los resultados, y cerciorarnos de estudiar los cambios más fiables. La cantidad de ASVs con cambios significativos de cada comparativa vienen resumidos en la tabla 13.

Tabla 13: Taxones bacterianos con cambios significativos entre todas las comparativas realizadas. Solo se han tenido en cuenta los ASVs con un p-valor ajustado < 0,01.

Taxones con abundancias significativamente distintas		
Comparativa	Disminuidos	Aumentados
Machos WTE vs WT	4	5
Machos KOE vs KO	14	4
Machos KO vs WT	14	11

Encontramos que el etanol afectó a 9 ASVs específicos en la comparación entre ratones WTE y WT. La figura 36A muestra un gran incremento en el género *Alloprevotella* y en la familia *Muribaculacetae* (filo Bacteroidota) y una disminución de diferentes especies de *Lachnoclostridium* y *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, provenientes de la familia *Lachnospiraceae* (filo Firmicutes), aunque en uno de estos géneros (concretamente la especie correspondiente al ASV61), el tratamiento con etanol aumentó sus niveles en oposición a las otras ASVs de la familia *Lachnospiraceae*.

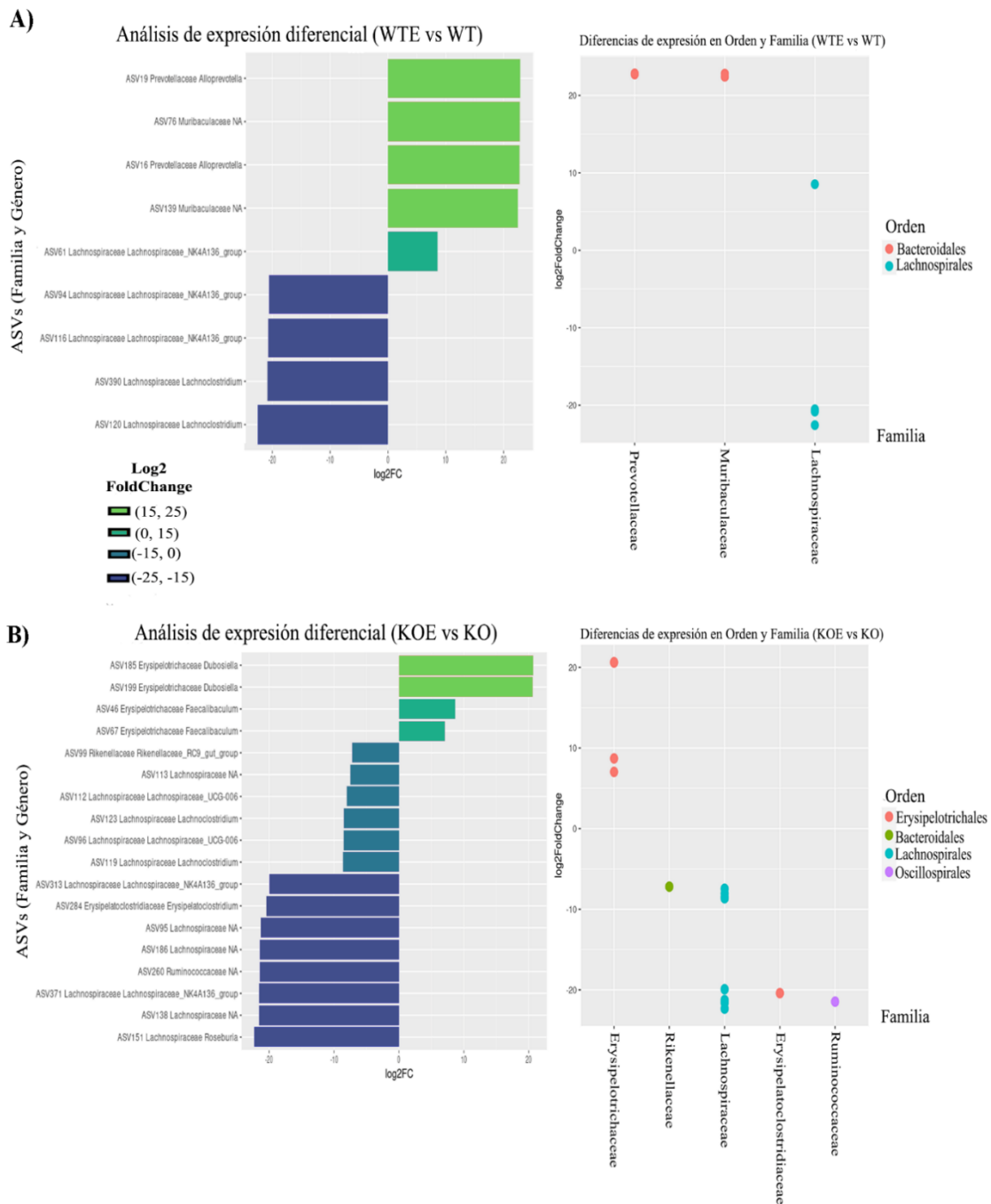


Figura 36: Análisis de la expresión diferencial de las bacterias de la microbiota intestinal a nivel de Orden, Familia y Género entre los grupos de animales macho tratados con o sin alcohol. Los ASVs que se expresan estadísticamente diferentes entre los grupos se representan con gráficos de barras con el cambio expresado en Log2. La posición derecha indica especies enriquecidas y la posición izquierda indica especies disminuidas en dichas comparativas. Comparativas **(A)** WTE vs WT y **(B)** KOE vs KO. Las pruebas de expresión diferencial se realizaron utilizando el paquete *DESeq2*. Solo se muestran los ASVs con un p-valor ajustado < 0,01.

A continuación, comparamos la abundancia de bacterias en TLR4-KOE frente a TLR4-KO (figura 36B). Esta comparación muestra 18 ASVs específicos estadísticamente significativos. Encontramos que el consumo de alcohol aumenta la familia *Erysipelotrichaceae* en dos géneros separados: *Dubosiella* y *Faecalibaculum*. Por el contrario, el etanol induce un efecto negativo en la familia *Ruminococcaceae* y los géneros *Rikenellaceae_RC9_gut_group* y *Erysipelatoclostridium*, y varios géneros de la familia *Lachnospiraceae* (*Lachnospiraceae_UCG-006*, *Lachnoclostridium* y *Lachnospiraceae_NK4A136_group* entre otros) y *Roseburiaceae_NK4A136_group*. Encontramos la mayor disminución en el género *Roseburia*.

Por último, evaluamos el efecto del genotipo comparando TLR4-KO vs WT. La figura 37 revela un contraste complejo entre ambos genotipos, habiendo 25 ASVs específicos con expresión estadísticamente diferente. El paquete *DESeq2* muestra que la ausencia de TLR4 causa alteraciones importantes en la composición del microbioma intestinal, e incluso observamos efectos opuestos dentro del mismo género cuando se comparan WT y TLR4-KO.

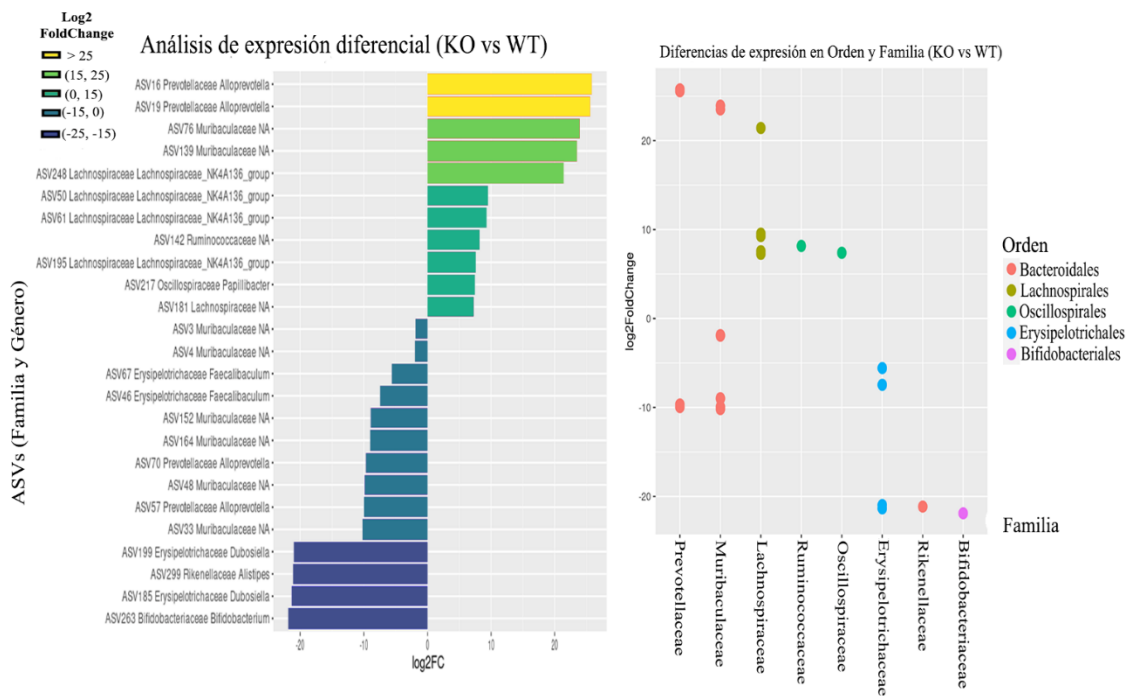


Figura 37: Análisis de la expresión diferencial de las bacterias de la microbiota intestinal a nivel de Orden, Familia y Género entre ambos genotipos en machos. Los ASV que se expresan estadísticamente diferentes entre los grupos experimentales se representan con gráficos de barras con el cambio expresado en Log2. La posición derecha indica especies enriquecidas y la posición izquierda indica especies disminuidas en la comparativa. Las pruebas de expresión diferencial se realizaron utilizando el paquete *DESeq2*. Solo se muestran los ASV con un p-valor ajustado <0,01.

Tanto la familia *Muribaculaceae*, como el género *Alloprevotella* engloban diferentes ASVs con contrastes aumentados y disminuidos entre ellos (± 10 - $20 \log_2$ Foldchange). En la familia *Ruminococcaceae*, los géneros *Lachnospiraceae_NK4A136_group* y *Papillibacter* están regulados positivamente en ratones TLR4-KO en oposición a la familia *Muribaculaceae*, los géneros *Faecalibaculum*, *Dubosiella*, *Bifidobacterium* y *Alistipes* que se reducen en ausencia del receptor TLR4. Cabe destacar que un resultado relevante es la importante reducción ($-21,9 \log_2$ FoldChange) del género *Bifidobacterium*, siendo el único ASV con diferencia significativa que no pertenece al filo Firmicutes o Bacteroidota.

13 La comunidad bacteriana se modifica de forma distinta en las hembras que en machos por el consumo crónico de etanol y/o por la ausencia del receptor TLR4

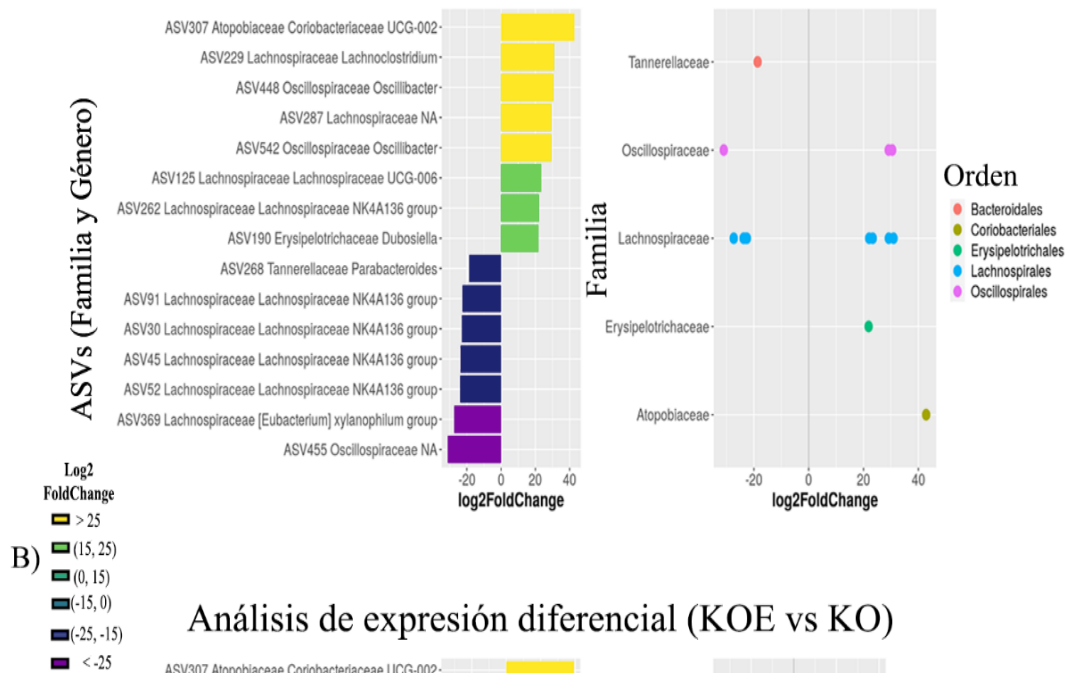
Después del estudio del perfil bacteriano en animales macho, realizamos las mismas comparativas con muestras de heces obtenidas de las hembras en los 4 grupos de animales experimentales. Descubrimos que el etanol afectaba a 16 ASV específicos en la comparación de ratones WTE y WT. La figura 38A muestra los cambios encontrados. En la tabla 14 se presenta la cantidad de taxones que muestran cambios significativos en las comparativas de las hembras.

Tabla 14: Taxones bacterianos con cambios significativos entre todas las comparativas realizadas en ratones hembra. Solo se han tenido en cuenta los ASVs con un p-valor ajustado $< 0,01$.

Taxones con abundancias significativamente distintas		
Comparativa	Disminuidos	Aumentados
Hembras WT T3 vs T0	10	6
Hembras KO T3 vs T0	15	10
Hembras WTE vs WT	8	8
Hembras KOE vs KO	23	24
Hembras KO vs WT	30	16

A)

Análisis de expresión diferencial (WTE vs WT)



B)

Análisis de expresión diferencial (KOE vs KO)

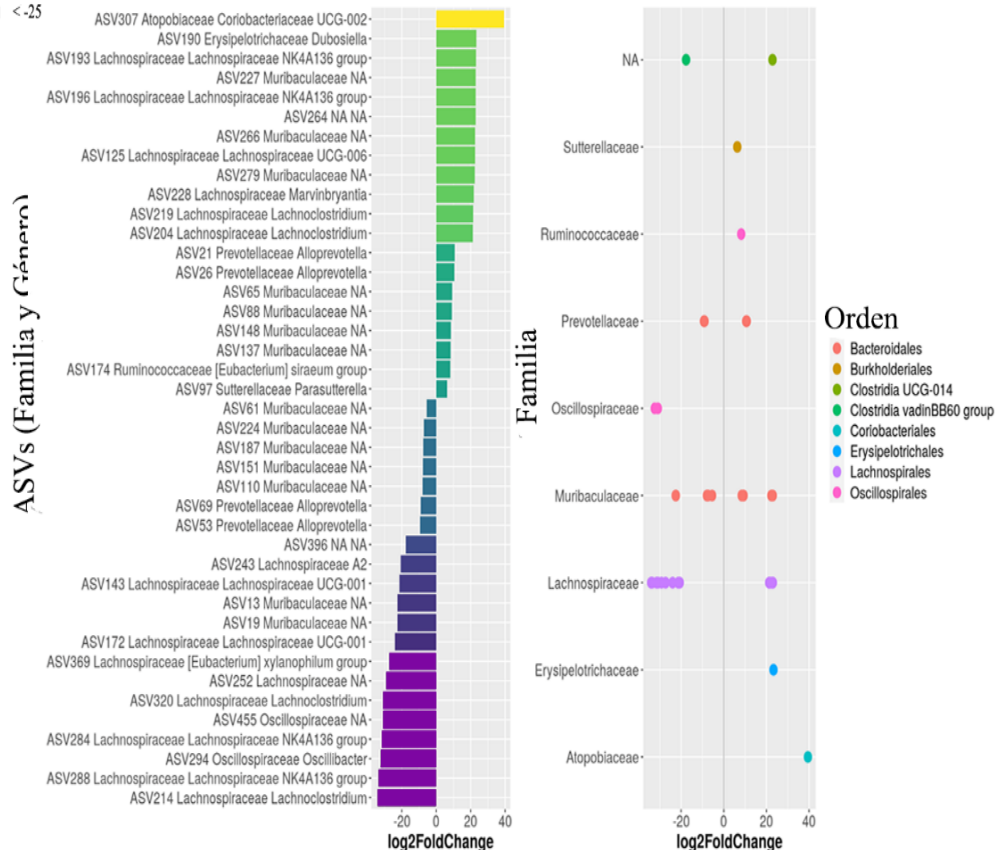


Figura 38: Análisis de la expresión diferencial de las bacterias de la microbiota intestinal a nivel de Orden, Familia y Género entre los grupos tratados con etanol y los grupos control en hembras. Los ASV que se expresan estadísticamente diferentes entre los grupos se representan con gráficos de

barras con el cambio expresado en Log2. La posición derecha indica especies enriquecidas y la posición izquierda indica especies disminuidas en dichas comparativas. Comparativas (A) WTE vs WT y (B) KOE vs KO. Las pruebas de expresión diferencial se realizaron utilizando el paquete *DESeq2*. Solo se muestran los ASV con un p-valor ajustado <0,01.

De forma similar a los machos, el etanol causa un descenso de cuatro especies del género *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, aunque sorprendentemente también el incremento de una especie de este género, que podría ser la misma encontrada en los machos (siendo ambos ASVs del mismo género). Este hecho no se puede confirmar sin llevar a cabo su taxonomía a nivel de especie. Sin embargo, a diferencia de los machos, aquí los ASVs beneficiados pertenecen a los géneros *Coriobacteriaceae UCG-002*, *Lachnoclostridium* (cuyo único ASV de dicho género en ratones WT macho tratados con alcohol fue disminuido), *Lachnospiraceae UCG-006*, *Oscillibacter* y *Dubosiella*.

Entre los taxones disminuidos por el consumo de etanol encontramos al género *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, el cual forma parte de la familia *Lachnospiraceae*, mencionada anteriormente. A su vez se detectan también el género *[Eubacterium] xylanophilum group*, un ASV del género *Parabacteroides* y otro de la familia *Oscillospiraceae*.

A continuación, comparamos la abundancia de bacterias en TLR4 KOE frente a TLR4 KO (figura 38B). Esta comparación muestra 47 ASVs específicos estadísticamente afectados, más que en la comparativa de los individuos de fenotipo salvaje tratados, como sucedió también en el estudio de los machos.

Encontramos que el consumo de alcohol vuelve a incrementar especies de los géneros *Coriobacteriaceae UCG-002*, *Dubosiella* y los dos géneros mencionados antes de *Lachnospiraceae*, *Lachnospiraceae UCG-006* y *Lachnoclostridium*, a los que se une otro género de esta familia, *Marvinbryantia*. Sin embargo, en estos animales se aprecian nuevos aumentos de especies, pertenecientes al género *Alloprevotella*, *Parasutterella*, *[Eubacterium] siraeum group*, a la familia *Muribaculaceae* y una última familia que no hemos podido taxonomizar, del orden Clostridia UCG-014.

Las especies que salen perjudicadas en el consumo son dos del género *Lachnospiraceae UCG-001*, otras dos de *Lachnospiraceae NK4A136 group*, uno de los cuales pudo categorizarse hasta el nivel de especie, siendo *Lachnospiraceae bacterium NK4A136*, y encontramos de nuevo el ASV 369, que estaba también disminuido en los ratones WT tratados con etanol, incluido en el género *[Eubacterium] xylanophilum group*. Aunque presentan especies aumentadas por el etanol, también hay ASVs del género *Alloprevotella* y la familia *Muribaculaceae* que presentan disminución por el tratamiento. Los restantes ASVs que se encuentran disminuidos en esta comparativa son de la familia *Oscillospiraceae*, exceptuando

uno que no hemos podido clasificar, por encontrarse por debajo del orden al que pertenece, el orden Clostridia vadinBB60 grupo.

Por último, evaluamos el efecto del genotipo comparando TLR4-KO vs WT. La figura 39 muestra un contraste complejo entre ambos genotipos, siendo 46 los ASV con expresión estadísticamente diferente. Los géneros *Lachnoclostridium*, *Alloprevotella* y la familia *Muribaculaceae* muestran especies tanto disminuidas como aumentadas en dicha comparativa. Diversos taxones presentan incremento en los individuos TLR4-KO, como son el orden Clostridia UCG-014, los géneros *Marvinbryantia*, *[Eubacterium] siraeum group* y *Lachnospiraceae UCG-006*, y la especie *Bacteroides acidifaciens*.

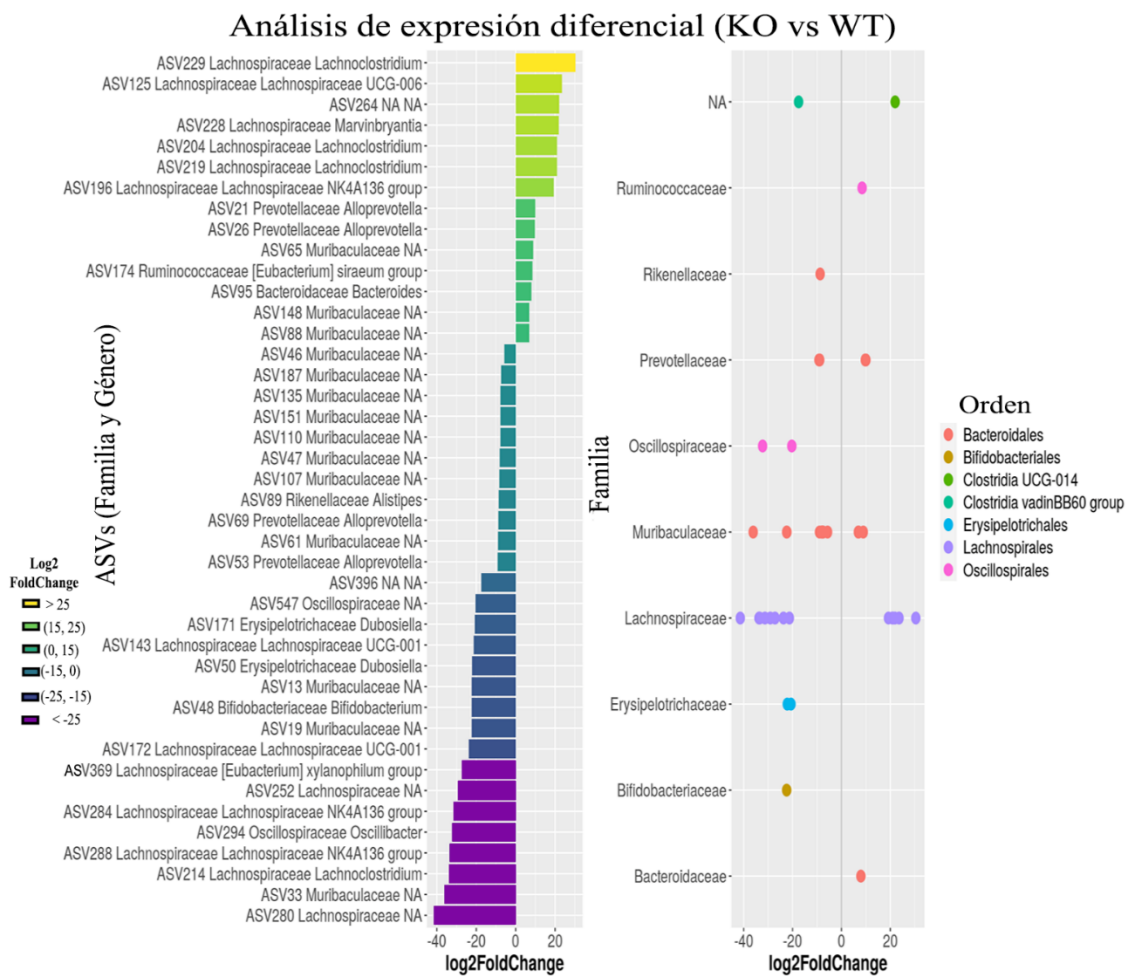


Figura 39: Análisis de la expresión diferencial de las bacterias de la microbiota intestinal a nivel de Orden, Familia y Género entre ambos genotipos en hembras. Los ASVs que se expresan estadísticamente diferentes entre los grupos se representan con gráficos de barras con el cambio expresado en Log2. La posición derecha indica especies enriquecidas y la posición izquierda indica

especies disminuidas en las comparativas. Las pruebas de expresión diferencial se realizaron utilizando el paquete *DESeq2*. Solo se muestran los ASV con un p-valor ajustado $<0,01$.

En contraposición, los taxones con mayor abundancia en los ratones WT salvajes son los géneros *Alistipes*, *Dubosiella* (dos géneros que también hemos visto disminuidos en la comparativa de genotipo en los ratones macho), *[Eubacterium] xylanophilum group*, *Lachnospiraceae UCG-001* y *Lachnospiraceae NK4A136 group*, la familia *Oscillospiraceae*, el orden *Clostridia vadinBB60 group* y la especie *bifidobacterium pseudolongum*. Aunque en los machos el ASV perteneciente al género *Bifidobacterium* no pudimos clasificarlo hasta la especie, debido a que en los dos géneros estos ASVs presentaban valores disminuidos en los ratones TLR4-KO, teorizamos que la especie encontrada en machos fuera también *Bifidobacterium pseudolongum*.

Con todo esto, podemos concluir que tanto la presencia del receptor TLR4, como el consumo crónico de etanol son importantes factores determinantes de la microbiota intestinal, independientemente del género del hospedador.

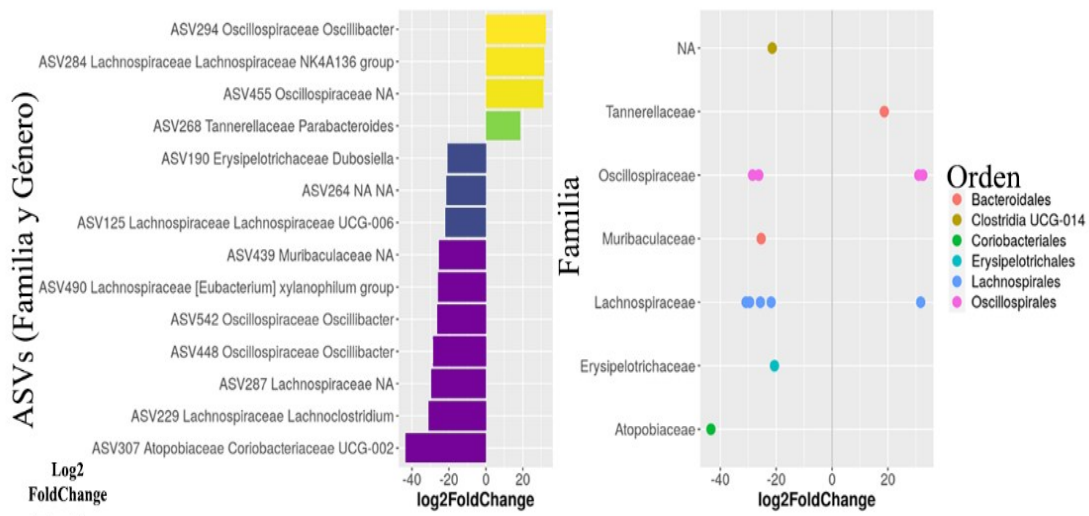
14 Análisis del efecto del envejecimiento sobre los taxones bacterianos en hembras

Aprovechando que en las hembras recogimos muestras de heces tanto al comienzo como al final del tratamiento, lo que constituye un tiempo de tres meses, realizamos también una comparativa de esas muestras en las hembras no tratadas para comprobar que cambios causaba en la microbiota el envejecimiento de los individuos.

En las hembras WT se encontraron 16 ASVs específicos con cambios significativos entre las heces recogidas a los dos meses de edad y las recogidas a los cinco meses de edad (figura 40A). Aunque un ASV del género *Lachnospiraceae NK4A136 group* es el que presenta una mayor abundancia con la edad, hemos encontrado disminuidos los ASVs en cada uno de los géneros, *Lachnospiraceae UCG-006*, *[Eubacterium] xylanophilum groupK*, *Lachnoclostridium*, y finalmente uno en la familia *Lachnospiraceae*, que no hemos logrado identificar a nivel de género. Otros tres ASVs, pertenecientes uno de ellos al género *Parabacteroides* y dos a la familia *Oscillospiraceae* (uno de ellos del género *Oscillibacter*) también presentan mayor abundancia tras los tres meses. Por otra parte, los géneros *Dubosiella*, *Oscillibacter*, *Coriobacteriaceae UCG-002*, la familia *Muribaculaceae* y el orden *Clostridia UCG-014* presentan ASVs con menor abundancia en el individuo envejecido.

A)

Análisis de expresión diferencial (WT T3 vs WT T0)



B)

Análisis de expresión diferencial (KO T3 vs KO T0)

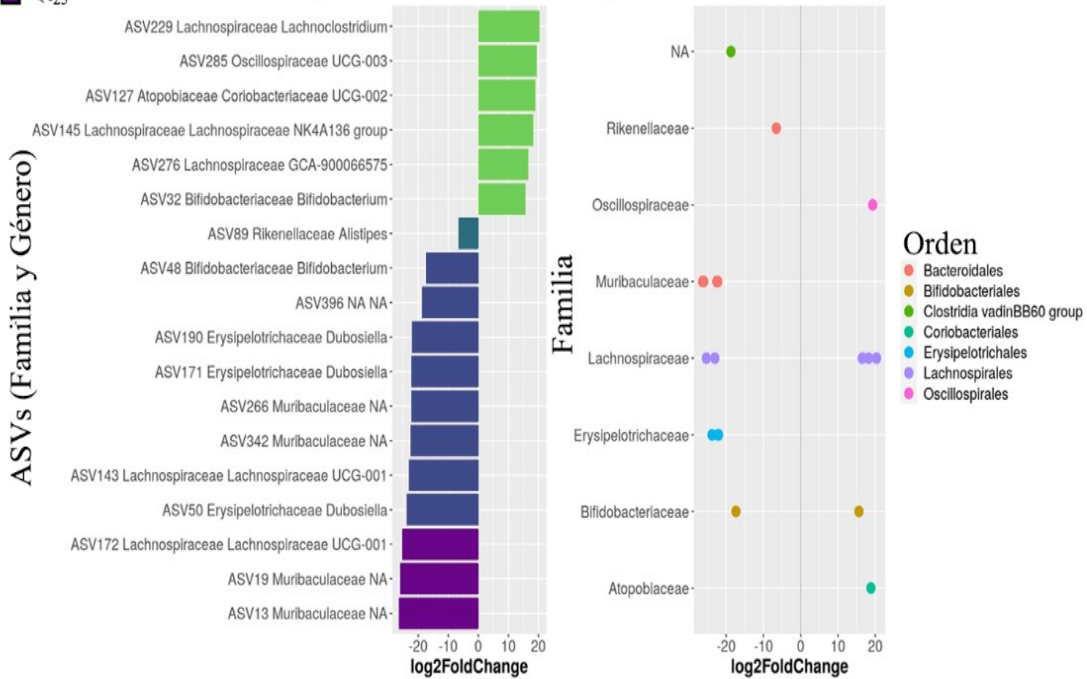


Figura 40: Análisis de la expresión diferencial de las bacterias de la microbiota intestinal a nivel de Orden, Familia y Género en los grupos WT y KO entre las muestras a los cinco meses y a los dos meses, siendo el tiempo la única variable. Los ASV que se expresan estadísticamente diferentes entre los grupos se representan con gráficos de barras con el cambio expresado en Log2. La posición

derecha indica especies enriquecidas y la posición izquierda indica especies disminuidas en las comparativas. Comparativas (A) WT T3 vs WT T0 y (B) KO T3 vs KO T0. Las pruebas de expresión diferencial se realizaron utilizando el paquete *DESeq2*. Solo se muestran los ASV con un p-valor ajustado $<0,01$.

De forma similar a lo que ocurría en el tratamiento de alcohol, los individuos TLR4-KO muestran una microbiota menos estable frente a la variable tiempo que los individuos salvajes, encontrando en ellos 25 ASVs específicos con cambios significativos al comparar las muestras de distintas edades (figura 40B). El género *Coriobacteriaceae UCG-002*, que en los WT disminuía con el tiempo, en los TLR4-KO presenta al contrario un ASV con una mayor abundancia en los individuos envejecidos. Otros ASVs incrementados con la edad en las heces son de los géneros *Lachnoclostridium*, *Oscillospiraceae UCG-003*, *Lachnospiraceae NK4A136 group*, *GCA-900066575* (de la familia *Lachnospiraceae*) y *Bifidobacterium*. Dentro de los géneros disminuidos por la edad, encontramos en común con los individuos WT al género *Dubosiella*, siendo en este taxon donde se encuentra el ASV 190, el único disminuido en ambos genotipos por el tiempo, y la familia *Muribaculaceae*. También presentan disminución los géneros *Alistipes* y *Lachnospiraceae UCG-001*, el orden Clostridia vadinBB60 group y la especie *bifidobacterium pseudolongum*. Así pues, confirmamos que en el presente estudio la edad también es un condicionante para la microbiota intestinal, y que esta variable también cambia a lo largo de la vida del individuo en ambos genotipos analizados.

15 Papel del TLR4 en las alteraciones inducidas por el etanol en los genes estructurales del intestino

Un proceso inflamatorio crónico y la ruptura de la homeostasis bacteriana son dos factores de riesgo para el correcto funcionamiento del intestino. Por eso, decidimos comprobar la expresión de varios genes estructurales asociados con la permeabilidad y el equilibrio del aparato digestivo (figura 41). En nuestros resultados hemos hallado que, la expresión génica de la intelectina 1 (ITLN1) está regulada de forma positiva en el grupo de animales WT tratados con etanol ($F(3, 20) = 4.935$, p-valor < 0.05), pero no se observó un efecto significativo en los TLR4-KO tratados con etanol. Además, el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (un canal iónico epitelial), sufrió una reducción importante en el grupo WT tratado con etanol ($F(3, 20) = 3.568$, p-valor < 0.05), pero la expresión de este gen no se ve alterada en ambos grupos TLR4-KO tratados o no con etanol.

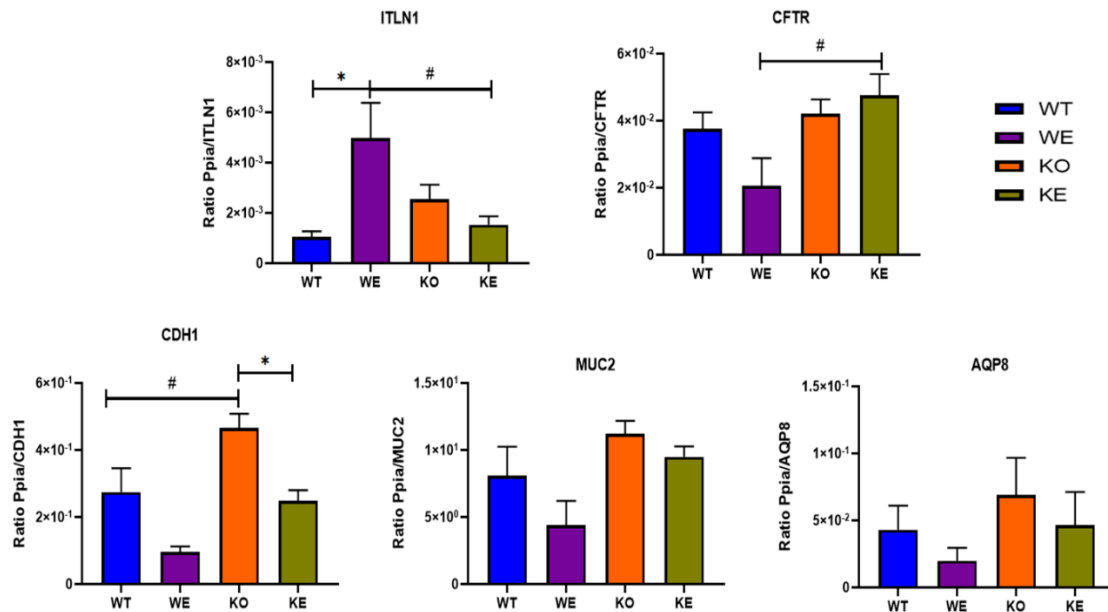


Figura 41: Niveles de expresión en el colon de ratones WT y TLR4 KO, con y sin tratamiento con etanol, de diversos genes. Expresión de ITLN1, CFTR, CDH1, MUC2 y AQP8. * $p < 0.05$ para comparación de tratamientos, y # $p < 0.05$ para comparación de genotipos por One-Way ANOVA, con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples, excepto MUC2 y AQP8, que fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba Dunn para comparaciones. $N = 6$. Barras representadas como [media \pm SEM].

La ingesta crónica de etanol también disminuye la expresión génica de cadherina 1 (CDH1) tanto en ratones WT como TLR4-KO cuando son sometidos al tratamiento de alcohol ($F(3, 19) = 9.957$, p -valor < 0.05). Sin embargo, la expresión basal de CDH1 en TLR4-KO es más alta que en los ratones WT, y esos niveles más elevados se aprecian tanto en el grupo control como en el grupo tratado con etanol.

Los genes de la glicoproteína secretora mucina-2 (MUC2) y aquaporina-8 (AQP8) no sufrieron cambios significativos en el colon, aunque podemos apreciar en la gráfica como muestran un patrón similar a la CDH1. Aunque el tratamiento de alcohol disminuye la expresión en ambos genotipos, los animales TLR4-KO poseen unos valores basales superiores a los ratones WT, lo que conlleva a que los animales TLR4-KO tratados con etanol presenten también valores más elevados de ARNm que su contraparte WT, a pesar del descenso. Un mayor tamaño muestral podría demostrar estas diferencias a nivel significativo y corroborar este comportamiento en la expresión de dichos genes.

16 La abundancia de los taxones bacterianos se correlaciona con la expresión de genes intestinales específicos

A continuación, investigamos la posible relación entre bacterias y genes del huésped en todos los grupos de machos. Para este objetivo, se determinaron las correlaciones entre los genes estructurales previamente analizados con cambios significativos y 3 taxones microbianos con especies con expresión significativamente diferente, que fueron las familiae *Erysipelotrichaceae* y *Lachnospiraceae*, y el filo Firmicutes. Debido a la gran cantidad de taxones que tenían bacterias con abundancias significativamente distintas entre las comparativas, decidimos acotar a tres que consideramos las más interesantes. El filo Firmicutes fue escogido debido a ser el único de los dos filos dominantes con diferencias significativas, incluyendo su aumento en los individuos TLR4-KO y su disminución por el tratamiento alcohólico. Las familiae *Erysipelotrichaceae* y *Lachnospiraceae* se escogieron como las más abundantes dentro del filo Firmicutes.

Usando correlaciones de Spearman, encontramos 4 correlaciones gen-microorganismo significativas (p -valor $< 0,1$) (figura 42). Todas las correlaciones que se encontraron eran negativas entre microorganismos y genes, y todas estas se presentaban en los grupos de animales tratados con etanol (p -valor $< 0,1$), mientras que no observamos correlaciones significativas en ambos genotipos de animales control. La correlación negativa más fuerte (p -valor $< 0,01$) se observó entre la familia *Lachnospiraceae* con CFTR (ρ de Spearman = -1), en el grupo WTE. Otras correlaciones negativas importantes fueron ITLN1-*Erysipelotrichaceae* en KOE (Spearman's ρ = -0,89), CFTR-Firmicutes (Spearman's ρ = -0,94) en WTE y CDH1-*Lachnospiraceae* (Spearman's ρ = -0,83) en WTE.

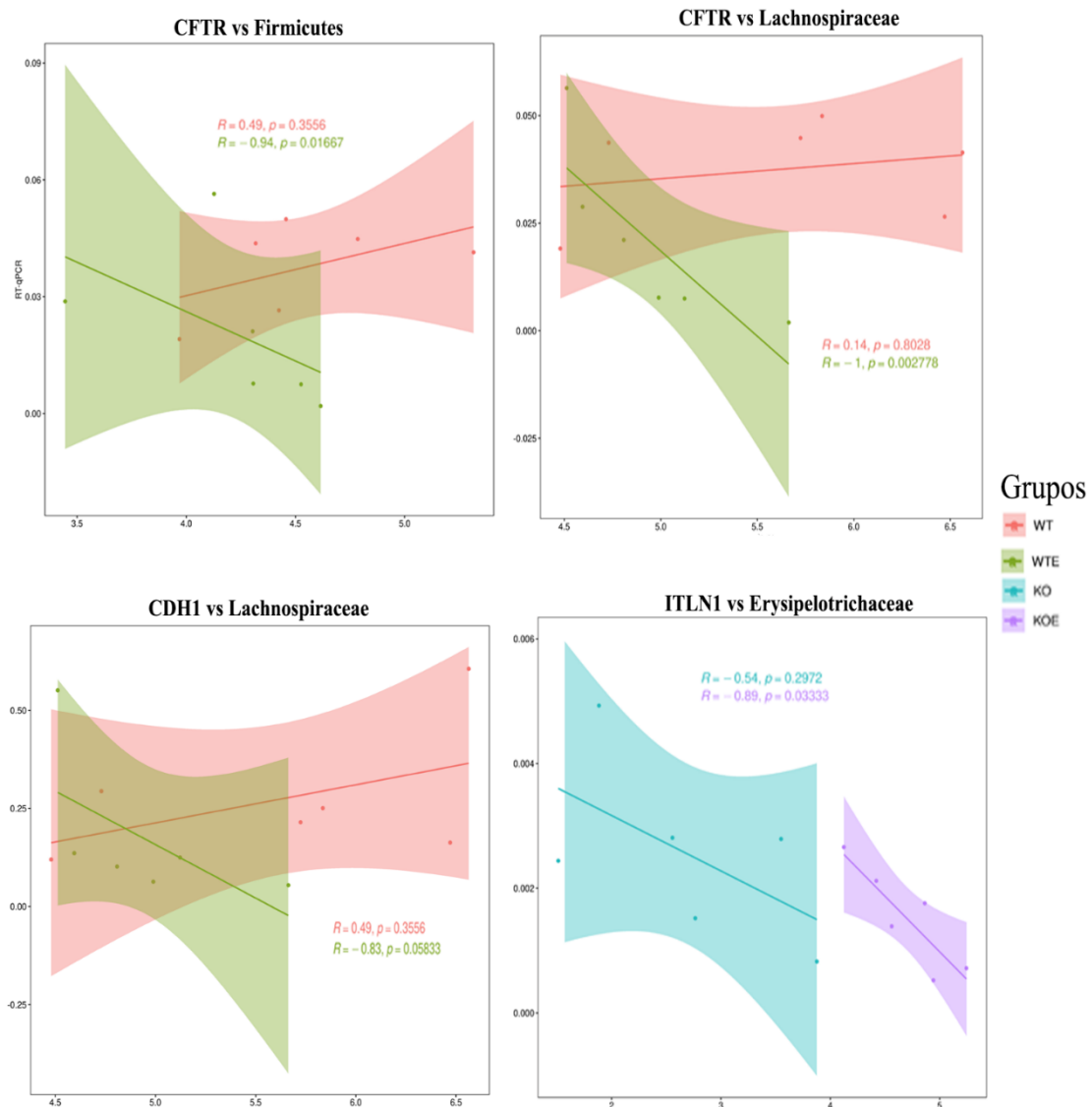


Figura 42: Diagramas de dispersión que representan el análisis de correlación entre genes estructurales de intestino y taxones bacterianos que presentaron abundancia diferencial dentro de los grupos de animales experimentales. La fuerza de la correlación (coeficiente de correlación de Spearman) se representa como (R) y la significancia como (p), ambos se indican en cada gráfico.

17 Perfil de metabolitos analizado por RMN en cerebros de ratones WT y WTE

Por último, analizamos si los cambios observados en la microbiota intestinal, así como la alteración de la permeabilidad intestinal producida por el consumo de alcohol, son aspectos suficientemente importantes para que se puedan ver reflejados en la expresión de diferentes

metabolitos a nivel de cerebro. Para ello, decidimos usar el método de resonancia magnética nuclear (RMN) para cuantificar un amplio espectro de compuestos moleculares en la corteza cerebral y generar perfiles de metabolitos, entre los que se encuentran aminoácidos, lípidos o moléculas mensajeras vinculadas al cerebro. Como se menciona en la introducción, el etanol puede provocar directamente cambios en el cerebro, como neuroinflamación, que podrían confundirse por error con cambios inducidos por la microbiota; por ello, no hemos considerado las citocinas y otros elementos que participan directamente con el sistema inmunológico o el daño tisular. Nos hemos centrado en dos de los cuatro grupos: WT y WTE, donde el etanol ha causado un mayor número de cambios.

Los espectros de RMN se normalizaron a los correspondientes pesos de tejido usados para evaluar el contenido relativo de los metabolitos extraídos y analizados. Se identificaron un total de 39 metabolitos, y dos difirieron significativamente (p -valor $< 0,05$ por prueba T independiente) entre los animales. En el cerebro de ratones tratados con etanol, el nivel de lactato aumentó significativamente y el nivel de NAD + disminuyó significativamente. Se demostró a partir de un Análisis de Componentes Principales (ACP, o por sus siglas en inglés PCA) (figura 43), que los ratones WT mostraron mayor heterogeneidad en los metabolitos y sus concentraciones analizadas en el cerebro, mientras que los ratones WT tratados con etanol, debido a dicho tratamiento tienen una menor variabilidad en varios metabolitos específicos, agrupando las cuatro muestras en un único clúster definido. Los metabolitos analizados que fueron significativos, con sus valores de concentración normalizados y el rango en el que fueron localizados se proporcionan en la tabla 15. Cabe considerar, que estos perfiles se pueden deber al efecto directo del etanol sobre el cerebro, ya que son metabolitos vinculados al estado oxidativo del tejido, sin que las alteraciones en la microbiota intestinal tengan repercusión en los metabolitos analizados. Por ello consideramos no llevar a cabo el perfil de metabolitos de los grupos de animales TLR4-KO tratados con o sin alcohol.

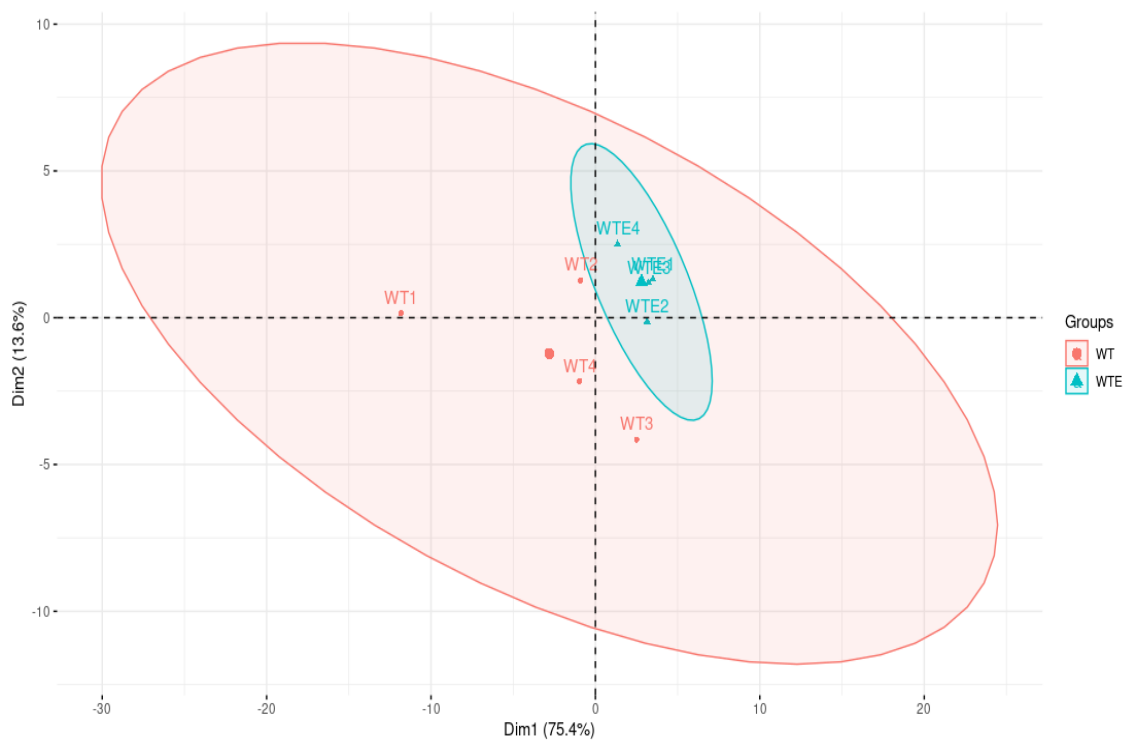


Figura 43: Efectos del etanol sobre los perfiles metabólicos en muestras de tejido cerebral. Clasificación ACP (escala de Pareto) basada en los espectros normalizados. WT en rojo y WTE en azul. El quinto punto de mayor tamaño en ambos grupos indica la media de las muestras y las elipses expresa la variabilidad.

Tabla 15. Metabolitos analizados que presentaron cambios significativos (p -valor $< 0,05$) con los valores de sus concentraciones normalizados y las regiones integradas en el RMN usadas para su estudio.

Metabolito	Región (ppm)	Muestra							
		WT 4	WT 5	WT 7	WT 8	WTE 1	WTE 2	WTE 3	WTE 4
TSP (estándar)	0,158 0,183	0,047	0,052	0,037	0,043	0,080	0,053	0,052	0,067
Lactato	1,313 1,352	100,480	109,207	108,718	111,638	124,409	118,780	122,336	126,592
NAD+	8,821 8,862	0,069	0,025	0,031	0,039	0,017	0,018	0,017	0,012
NAD+	9,137 9,175	0,078	0,048	0,045	0,035	0,014	0,026	0,030	0,029
Nucleótidos	4,594 4,630	0,933	1,204	1,618	1,069	0,814	0,790	0,768	0,896
Nucleótidos	6,071 6,083	0,759	0,691	0,870	0,928	0,667	0,543	0,634	0,592

Discusión

“¿Cómo funciona?” dijo el Archicanciller Mustrum Ridcully, el Maestro de la Universidad Invisible.

Este era el tipo de pregunta que Ponder Stibbons odiaba casi tanto como “¿Cuánto costará?” Eran dos de las preguntas más difíciles a las que se enfrentaba un investigador. Como jefe de facto de desarrollo mágico de la universidad, trataba especialmente de evitar cuestiones de finanzas a toda costa.

TERRY PRATCHET

LA CIENCIA DEL MUNDO DEL DISCO

1 La corteza de los ratones TLR4-KO presenta un perfil de miARN único en alcohólicos crónicos

Trabajos en los últimos años han establecido el papel fundamental de la vía de señalización del TLR4 y su activación por el alcohol en diferentes procesos patológicos en el SNC. En concreto, se ha demostrado que el consumo de alcohol es capaz de producir neuroinflamación (Alfonso-Loeches et al., 2010; Lippai et al., 2013), muerte neuronal, degradación de la mielina (Alfonso-Loeches et al., 2012), desregulación de las vías proteolíticas (concretamente la vía ubiquitina-proteasoma y la vía autofagia-lisosoma) (Pla, Pascual, Renau-Piqueras, & Guerri, 2014) y por tanto neurodegeneración (Alfonso-Loeches et al., 2010).

El cerebro es uno de los órganos con mayor expresión de miARNs (Boudreau et al., 2014; Cao, Li, & Chan, 2016; Narayan, Bommakanti, & Patel, 2015), donde desempeñan un importante papel regulador en la expresión génica, debido a su capacidad de que un solo miARN pueda unirse a múltiples ARNs (Catalanotto, Cogoni, & Zardo, 2016), permitiendo que la célula se adapte rápidamente a cambios en el entorno.

Distintos estudios han demostrado que el abuso del alcohol desregula los miARNs, y se han identificado cambios en la expresión de los miARNs en la corteza frontal y en otras regiones cerebrales en humanos alcohólicos post-mortem (Lewohl et al., 2011; Mamdani et al., 2015), y también en la corteza de ratones alcohólicos crónicos (Gorini, Nunez, & Mayfield, 2013; Nunez et al., 2013; Osterndorff-Kahanek et al., 2018; Tapocik et al., 2012).

Teniendo en cuenta por tanto que los miARNs, con su función reguladora de la expresión génica, desempeñan un papel clave en las enfermedades neurodegenerativas (Cao et al., 2016), la respuesta del sistema inmune y la neuroinflamación (Cardoso, Guedes, & De Lima, 2016), uno de los primeros objetivos fue evaluar el potencial papel modulador de los miARNs en la respuesta inmune del TLR4 inducida por el alcohol, y la consiguiente neuroinflamación en la corteza cerebral.

Para identificar los miARNs afectados por el consumo crónico de alcohol y su relación con la respuesta del TLR4 en la corteza cerebral del ratón, decidimos realizar una secuenciación del ARNp, seguida de análisis informáticos. Se identificaron varios miARNs que se expresaban de manera diferente en las cortezas de los ratones tratados crónicamente con etanol, y vinculados todos ellos con la excitabilidad neuronal, la ruta de señalización del TLR4 y la inflamación. Anteriormente ya se habían detectado en las cortezas prefrontales de personas alcohólicas y de ratones sometidos a consumo crónico de alcohol varios miARNs alterados, como eran miR-152, let-7, mirR-15, miR-140 y miR-7, entre otros (Lewohl et al., 2011).

De entre los miARNs que presentaron cambios en nuestros grupos de estudio destacan dos clústeres de miARNs, el clúster miR-183C (que agrupa los miARNs miR-183, -96, -182) y la familia miR-200s, que regulan genes diana como MAPK e IL1R1, que se encontraban regulados negativamente en las cortezas cerebrales de los ratones TLR4-KO en comparación a los controles WT. Estos hallazgos indican un rol específico de la señalización del TLR4 en la expresión de los miARNs inducidos por el alcohol.

En consonancia con nuestros resultados, se han identificado varios miARNs (miR-183C, miR-96, miR-451, miR-200, miR-182, miR146, miR-127 y let-7b) cuyos niveles estaban incrementados en las cortezas cerebrales de ratones que se encontraban en las primeras etapas de la dependencia al alcohol (Nunez et al., 2013). Sin embargo, en nuestros resultados observamos una regulación a la baja con el consumo crónico de alcohol, exceptuando el miARN let-7b, que mantuvo la expresión al alza. Las adaptaciones sufridas por los miARNs después de una ingesta de alcohol a largo plazo, junto con diferencias tanto en el modelo del alcohol como en la metodología utilizada para evaluar los miARNs (NGS frente a microarrays) (Edeki, 2012), podrían explicar las diferencias observadas. Algunos miARNs, como el miR-411, se han asociado directamente con el consumo del alcohol (Most et al., 2019), mientras que otros miARNs, como el let-7b que se expresa principalmente en microglía, participa en la propia patología neurológica (Coleman, Zou, & Crews, 2017).

Utilizando un análisis de expresión en la corteza cerebral de los ratones, integrado con métodos bioinformáticos, identificamos que el 50% de los miARNs obtenidos inicialmente en nuestras muestras correspondían a solo siete miARNs (mmu-miR-181a, mmu-miR-26a, mmu-miR-125a, mmu-miR-30d, mmu-miR-125b, mmu-miR-486a y mmu-miR-486b). Algunos de estos miARNs, como el miR-181a, se han relacionado con la enfermedad de la esclerosis múltiple y la señalización del TNF- α (Ghorbani, Talebi, Chan, et al., 2017; Ghorbani, Talebi, Ghasemi, et al., 2017), o el miR-125, que controla la integración de la actividad sináptica y participa en la modulación de las señales de la inmunidad innata (Chawla, Deosthale, Childress, Wu, & Sokol, 2016; H. M. Lee, Kim, & Jo, 2016).

Cuando se evaluó la expresión diferencial de los miARNs asociados al tratamiento crónico con alcohol, observamos que mientras que 14 miARNs estaban disminuidos, 7 habían aumentado, cuando se comparaban los datos de ratones WT tratados y sin tratar con alcohol. Los resultados demostraron que el consumo crónico de alcohol no solo altera un gran número de miARNs, sino que un solo miARNs tiene la potencial capacidad de regular una gran cantidad de genes relacionados con las alteraciones causadas por el alcohol (Nunez & Mayfield, 2012; Tapocik et al., 2012). Además, teniendo en cuenta que los miARNs tienen como función principal la regulación negativa de sus ARNm diana (MacFarlane & R. Murphy, 2010), y que el

consumo de alcohol reduce la expresión de varios miARNs, los resultados sugieren que el consumo crónico de etanol causa una sobreexpresión de diferentes genes en la corteza cerebral. En otras comparaciones, observamos que la expresión de 9 miARNs estaba aumentada, pero solo un miARN se regulaba a la baja entre los ratones TLR4-KO tratados con y sin alcohol. Por tanto, el alcohol tiene una menor influencia en los ratones que carecían del receptor, al menos en la expresión relativa de los miARNs.

Otro comportamiento interesante fue en el clúster del miR-183C (miR-182/96/183), que estaba regulado a la baja en la corteza cerebral de los ratones WT. En cambio, no se observaron diferencias significativas en los ratones TLR4-KO, sugiriendo entonces que el etanol requiere de la presencia del receptor TLR4 para alterar estos miARNs. Salvo excepciones, los miARNs que componen un mismo clúster tienen un factor de transcripción o ruta de señalización común (Kabekkodu et al., 2018), y es también el caso del miR-183C (Ichiyama et al., 2016).

El clúster miR-183C tiene secuencias homólogas a distintos genes (Dambal, Shah, Mihelich, & Nonn, 2015) que están implicados en diversas patologías, como enfermedades autoinmunes (Dai et al., 2010), trastornos neurológicos y neurodegenerativos (Kye et al., 2014; Ubhi et al., 2014), dolor neuropático (H. P. Chen et al., 2014) y degeneración retiniana (Lumayag et al., 2013). Los tres miARNs que componen este clúster también se desregularon en la corteza frontal de ratones en las primeras etapas del consumo de alcohol (Nunez et al., 2013).

En relación con la familia del miR-200, ambos miR-200a y 200b se encuentran regulados negativamente en la corteza de los ratones con ingesta de alcohol de genotipo WT. Sin embargo, en los TLR4-KO, solo el 200a repite la disminución por el tratamiento alcohólico. Mientras que el miR-200b está relacionado con el TLR4 y su cascada inflamatoria, ya que reprime la expresión de la proteína MyD88 y disminuye sus transcritos, como el NF- κ B (J. Chen, Liu, & Yang, 2014; Wendlandt, Graff, Gioannini, McCaffrey, & Wilson, 2012), no parece que el miR-200a actúe en esas rutas. Se ha encontrado el miR-200a inducido en enfermedad hepática alcohólica, regulando el gen ZEB2, vinculado a la actividad apoptótica y no a la inflamatoria (Zhao et al., 2018). A diferencia del clúster miR-183C, en la familia del miR-200 parece que sus dos componentes afectados participan en diferentes etapas de las alteraciones del etanol, el 200b vinculado a la actividad del TLR4 mientras que el 200a estaría vinculado a una ruta distinta.

En resumen, los presentes resultados destacan nuevos miARNs putativos en la corteza cerebral de ratón que están involucrados en la neuroinflamación inducida por el alcohol, aunque el etanol requiere la activación del TLR4 para alterar varios de estos miARNs.

2 El nanoconjugado con curcumina reduce la neuroinflamación en alcohólicos crónicos

Durante los últimos años, nuestro laboratorio se ha interesado por la búsqueda de posibles dianas terapéuticas para paliar la neuroinflamación producida por el consumo de alcohol. De hecho, nuestro grupo ha demostrado que la indometacina previene alteraciones del comportamiento (Maria Pascual, Blanco, Cauli, Miñarro, & Guerri, 2007) y el nalmefeno previene la neuroinflamación y el daño cerebral debidos al consumo de alcohol (Montesinos, Gil, & Guerri, 2017). Por ello, en este trabajo hemos utilizado un nanoconjugado diseñado para transportar un curcuminoide al cerebro, que tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes para paliar la respuesta neuroinflamatoria producida por el consumo crónico de alcohol.

En las últimas décadas se han confirmado las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los curcuminoides a través de la inhibición de diferentes vías proinflamatorias como la de los factores de transcripción NF κ B y AP-1 (Shehzad, Rehman, & Lee, 2013), la vía de señalización del TLR4 y la vía de activación del inflammasoma NALP3 (del inglés NAcHT Leucine-rich repeat Protein 3) (Yin et al., 2018). Esta capacidad antiinflamatoria ha sido aprovechada ya en casos prácticos. En pacientes con síndrome metabólico, la suplementación con curcumina disminuyó la concentración en suero de TNF- α , IL-6, TGF- β y MCP-1 (Panahi, Hosseini, et al., 2016). Con la proteína C reactiva, otro marcador habitual de inflamación sistémica, se han visto reducidos sus niveles con la suplementación de curcuminoides (Sahebkar, 2014).

Sin embargo, su escasa solubilidad en agua (Tønnesen, Måsson, & Loftsson, 2002) y la inestabilidad que sufren en condiciones ácidas, básicas u oxidativas limitan la biodisponibilidad de los curcuminoides (Sharma, Gescher, & Steward, 2005). La nanoformulación de estos compuestos puede mejorar su solubilidad acuosa y alterar su farmacocinética y, por lo tanto, mejorar su potencial terapéutico innato (Duro-Castano et al., 2017). A lo anterior añadimos que, si bien algunos estudios han proporcionado evidencia de que los curcuminoides pueden atravesar la BHE y llegar al cerebro (Q. Wang et al., 2005), las nanopartículas transportadoras de curcuminoides prolongan significativamente el tiempo de retención de los curcuminoides en la corteza cerebral (aumentado en un +96%) y en el hipocampo (aumentado en un +83%) (Tsai et al., 2011).

Utilizando un conjugado de BDMC basado en poliacetal, otros grupos han confirmado que la administración de nanoconjugados de BDMC, sensibles al pH, muestra ventajas significativas en la neuroprotección y neuroregeneración después de la administración

intratecal en modelos de lesión de médula espinal (Requejo-Aguilar et al., 2017) frente al uso del compuesto en su forma libre. Utilizando un enlace éster para conjugar el BDMC, también se describió anteriormente cómo el conjugado StClPr-BDMC (en este caso no dirigido) protegía tanto células renales, que eran tratadas con estímulos proinflamatorios letales, como un modelo experimental de ratón de inflamación renal aguda nefrotóxica en comparación de nuevo con la forma libre del BDMC (Córdoba-David et al., 2020). Cambios en los niveles de pH están asociados con la neuroinflamación (Kellum, Song, & Li, 2004; Ortega-Ramírez, Vega, & Soto, 2017), lo que respalda el diseño de nanoconjugados y el sistema de liberación. El polímero protege al curcuminóide del ambiente ácido, y al mismo tiempo por la naturaleza del enlace éster, aumenta su liberación en ese medio, frente a otras zonas del organismo donde no es necesario. Es importante señalar que también se ha empleado el mismo nanoconjugado dirigido a LRP1, StClPr-BDMC-ANG, para mejorar el paso a través de la BHE en ratones APP / PS1, que son un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer (Lok et al., 2013), demostrando su seguridad y eficacia (con una recuperación de la capacidad olfativa) (Cuesta et al., 2021; Melnyk, Đorđević, Conejos-Sánchez, & Vicent, 2020). En conjunto, los resultados anteriores nos llevaron a utilizar el polímero StClPr-BDMC-ANG para el tratamiento de una situación neuroinflamatoria crónica menos explorada, pero de gran prevalencia en la sociedad actual, como es la desencadenada por el consumo crónico de alcohol.

Además, puesto que los curcuminoides pueden suprimir la activación de TLR4 y NALP3 (Yin et al., 2018), podrían también bloquear la neuroinflamación inducida por el etanol (figura 44). Nuestros estudios han demostrado que la administración intravenosa del StClPr-BDMC-ANG, produjo una reducción significativa de proteínas neuroinflamatorias (TLR4, COX-2, iNOS, IL-1 β y fractalkine) en la corteza cerebral de ratones con una ingesta crónica de etanol.

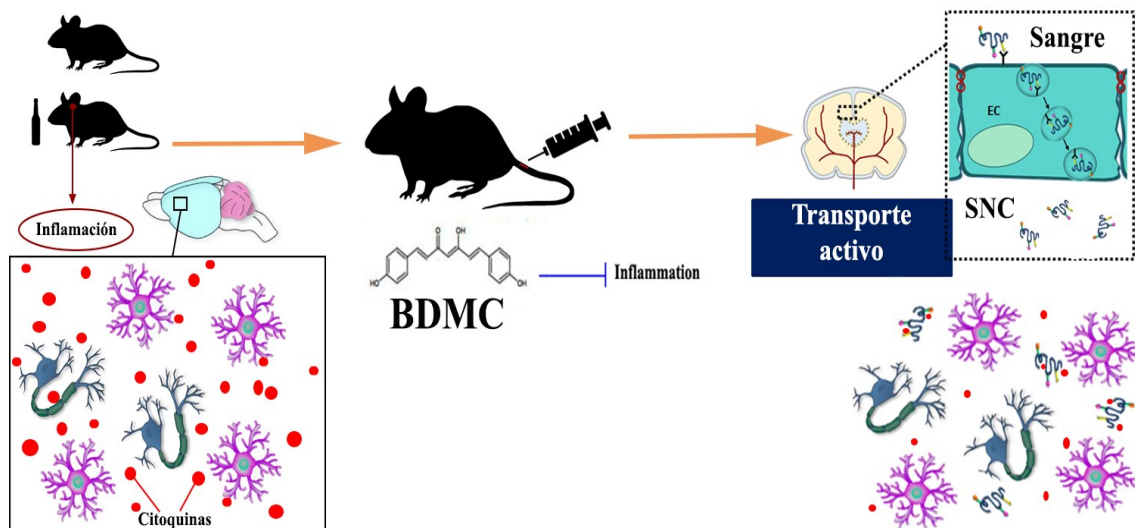


Figura 44. Cuando el curcuminoide atraviesa la BHE y llega al cerebro, su actividad antiinflamatoria disminuye la cascada inflamatoria causada por el etanol en individuos alcohólicos.

Los resultados expuestos en la presente tesis indicaron también que el tratamiento con StCIPr-BDMC-ANG revierte la regulación a la baja de la expresión de algunos miARNs, como miR146a-5p y miR-let-7b-5p inducida por el tratamiento con etanol. Dichos miARNs desempeñan funciones vitales en la regulación de los procesos tanto inflamatorios, como oxidativos, y la regulación positiva de estos miARNs atenúa las vías inflamatorias mediadas por la señalización TLR4 / NF- κ B (E. A. Ye & Steinle, 2016) y la consecuente liberación de citocinas y mediadores (Yuhan Chen et al., 2016). Por ejemplo, está registrada una reducción de miR146a-5p en varias enfermedades inflamatorias, trastornos cerebrales y neuropatías asociadas con la neuroinflamación (L. Chen et al., 2019; Yuhan Chen et al., 2016; Y. Xie et al., 2018). De manera similar, Let-7b tiene entre los ARNm a los que se une el propio ARNm del TLR4, permitiéndole inhibir la activación de la ruta TLR4 / NF- κ B y la expresión de genes inflamatorios (Teng et al., 2013). De hecho, este último miARN se considera un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer (Y. Liu, He, Li, & Wang, 2018). Por lo tanto, la reducción inducida por el etanol en los niveles de miR-146a y Let-7b podría estar asociada con una regulación a la baja de la neuroinflamación y de la vía de señalización de TLR4 / NF- κ B. Esta regulación de los miARNs podría incluso ser parcialmente la responsable del descenso en los niveles de las proteínas inflamatorias, lo que explicaría que los niveles de sus ARNm apenas se hayan visto afectados pero su transcripción a proteína se encuentre disminuida. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con StCIPr-BDMC-ANG puede revertir estas alteraciones perjudiciales.

En resumen, los datos dan a entender que el StCIPr-BDMC-ANG, un nanoconjugado de BDMC basado en polipéptidos dirigidos, puede aliviar el daño causado por el abuso del alcohol

en el cerebro. Estos hallazgos son una evidencia de la posible importancia que tendrán en el futuro los miARNs para el control de la inflamación en particular y las enfermedades nerviosas en general, y del potencial terapéutico de los nanoconjugados curcuminoides basados en polipéptidos, que pueden proporcionar un nuevo medio para tratar la neuroinflamación asociada con el abuso de alcohol y otras enfermedades neurodegenerativas.

3 La ausencia del receptor TLR4 genera una microbiota diferente con otras adaptaciones tras el consumo de etanol

Cada vez hay más estudios que demuestran la importancia de la microbiota intestinal en la salud del hospedador, contribuyendo e interactuando con el resto del organismo, incluso siendo a veces considerada como un “órgano esencial” por algunos autores (Riccio & Rossano, 2020). Es por ello, que el siguiente objetivo a desarrollar en esta tesis fue el estudio de los cambios producidos en el perfil bacteriano intestinal tras el consumo de alcohol y la ausencia del receptor TLR4.

Para entender la complejidad y la relevancia de la microbiota intestinal en el organismo, solo hay que pensar que la microbiota intestinal tiene aproximadamente 150 veces más genes que todo el genoma humano (Qin et al., 2010), con su correspondiente versatilidad bioquímica. Los avances más recientes en este campo han demostrado que los microorganismos en el intestino humano no solo colaboran con el sistema digestivo, sino que también están involucrados en casi todos los procesos biológicos humanos (Pascale et al., 2018). Sin embargo, muchos de estos mismos estudios también han demostrado que disfunciones en la microbiota humana participan en distintas enfermedades, como la enfermedades inflamatorias intestinales, la diabetes mellitus, neuroinflamación, etc. (Fung, Olson, & Hsiao, 2017; H. J. Wu & Wu, 2012).

En relación con el alcohol, su abuso causa disbiosis, inflamación y permeabilidad del epitelio intestinal (Bishehsari et al., 2017; Bode & Bode, 2003), y de nuevo en estos trastornos no es inusual que el SII contribuya de forma patogénica. Es por ello por lo que en el siguiente apartado de la presente tesis mostramos como el consumo crónico de alcohol causa inflamación intestinal y alteraciones de la microbiota, y que en estos daños se encuentra involucrada la activación del receptor TLR4.

Como se expuso en la introducción, el TLR4 se expresa en la mayoría de las líneas de células epiteliales y reconoce diferentes tipos de componentes bacterias, participando por tanto

en la homeostasis intestinal y siendo intermediarios de su relación con el hospedador. Un mal funcionamiento o estado de este receptor puede desembocar en inflamación. Pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, tanto colitis ulcerosa como la enfermedad de Crohn, tenían el TLR4 hiperactivo y, sin embargo, el TLR3 y el TLR5, con una expresión constitutiva superior en el epitelio intestinal, permanecían sin cambios (Cario & Podolsky, 2000). En otras situaciones la inflamación debida al TLR4 no se debe a un funcionamiento anómalo o la presencia de una infección patogénica. (Caesar, Tremaroli, Kovatcheva-Datchary, Cani, & Bäckhed, 2015)comprobaron que, al alimentar a unos ratones con manteca de cerdo, rica en grasas saturadas, frente a ratones alimentados con aceite de pez, rico en grasas insaturadas, los primeros tenían unos niveles más elevados de LPS y por ende una mayor actividad del TLR4 por sobreexposición. Estas situaciones prolongadas de señalización del TLR4 pueden desembocar en trastornos más graves, siendo entre otros un importante factor de riesgo del cáncer de colon (Fukata et al., 2007).

El papel de los TLRs en el control de la microbiota de la mucosa colónica se ha demostrado en varios estudios (Burgueño & Abreu, 2020; Xiao et al., 2019) y se ha observado como los ratones sin TLR4 presentaban un ecosistema bacteriano diferente al de sus contrapartes de genotipo salvaje (Xiao et al., 2019). Nuestros resultados muestran que, después de los 3 meses del tratamiento alcohólico y a la edad de 5 meses, ambos grupos de ratones TLR4-KO control y TLR4-KO tratados manifestaban una microbiota propia y única, distinta tanto entre los dos grupos mencionados, como cuando se comparaban con los grupos de genotipo WT, tanto WT control como WT tratado.

Utilizando la secuenciación del gen 16S rRNA, realizamos un análisis y clasificación taxonómicos del contenido bacteriano de las heces. Encontramos una serie de cambios significativos en las abundancias bacterianas de los ratones tratados con alcohol en comparación con sus respectivos controles, y de los ratones WT frente a los ratones TLR4-KO. Dos de los filos identificados, Bacteroidetes y Firmicutes, constituían el 90/95 % de todas las lecturas secuenciadas, seguidos del filo Actinobacteriota. Estos resultados eran coherentes con la caracterización de la microbiota humana, donde Firmicutes y Bacteroidetes representan también el > 90% de abundancia, mientras que Actinobacteria suele ser otro de los filos más abundantes, aunque representando únicamente < 1-5 % de la población bacteriana (Rinninella et al., 2019).

Otro resultado análogo entre la microbiota de los ratones y la microbiota humana ha sido la evolución de las abundancias de las bacterias Gram (-) y Gram (+) por el tratamiento. Diferentes resultados indican que el consumo prolongado de alcohol aumenta el crecimiento de bacterias Gram (-) (Malaguarnera, Giordano, Nunnari, Bertino, & Malaguarnera, 2014). Nuestros animales presentaron un aumento de las bacterias Gram (-) intestinales tanto en WT

como en TLR4-KO cuando se someten a la ingesta de alcohol, aunque estos incrementos no fueron significativos. Este crecimiento supone un riesgo debido a que la endotoxina LPS, presente en la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram (-) (X. Wang & Quinn, 2010), puede causar inflamación intestinal (Im, Riegler, Pothoulakis, & Rhee, 2012) por su actividad inmunogénica. De hecho, una microbiota dominada por las Gram (-) se ha relacionado con un aumento en la concentración de LPS, resultando en una mayor predisposición a que se genere una patología asociada a disbiosis (Fan, Jin, Chen, Ma, & Zhang, 2021; Salguero, Al-Obaide, Singh, Siepmann, & Vasylyeva, 2019). Consecuentemente con estos resultados, observamos que las bacterias Gram (+) disminuyen con la ingesta de alcohol.

A diferencia de otros trabajos (G. Wang et al., 2018), en nuestros resultados observamos que el tratamiento crónico con alcohol provocaba una disminución en el filo Firmicutes, el filo Gram (+) dominante en el intestino, posiblemente debido a una reducción en la familia *Lachnospiraceae*, principalmente el género *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, tanto en machos como en hembras. Esta familia es abundante en el intestino de un humano adulto sano (Kriss, Hazleton, Nusbacher, Martin, & Lozupone, 2018), pero exhibe poca resistencia a los cambios en la comunidad bacteriana (Forbes, Van Domselaar, & Bernstein, 2016). La disminución de la familia *Lachnospiraceae* en ratones con ingesta de alcohol se ha demostrado también en otros estudios (Bull-Otterson et al., 2013). Adicionalmente a su falta de resiliencia, todas las especies de la familia *Lachnospiraceae* son anaeróbicas, mientras que el metabolismo del etanol en el organismo humano tiene entre sus productos finales especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (González, Pariente, & Salido, 2007). Estos efectos causan un enriquecimiento de las especies aerotolerantes, más resistentes a este ambiente oxidativo (Tsuruya et al., 2016). Una mayor presencia de especies bacterianas aerobias o anaerobias facultativas, frente a las anaerobias estrictas habituales en el intestino, como la creación de un ambiente oxidativo en esa región, que es uno de los causantes de este desplazamiento entre las especies, se han relacionado con una pérdida de homeostasis intestinal y factor de riesgo para enfermedades (Rigottier-Gois, 2013).

Por otro lado, nuestros resultados demuestran un incremento en la familia *Muribaculaceae* y el género *Alloprevotella* en la microbiota de los ratones WT macho con consumo de alcohol, coincidiendo con hallazgos previos en pacientes humanos alcohólicos (Yanfei Chen et al., 2011). Además, el género *Alloprevotella* se ha asociado con la permeabilidad y la inflamación intestinal (R. Gao, Tian, Wang, & Zhu, 2021; Xia et al., 2020), efectos comunes en el consumo de alcohol. Un caso interesante es el género *Coriobacteriaceae* *UCG-002*, en donde observamos un incremento en la microbiota de hembras alcohólicas, pero sin cambios en machos, mientras que por el contrario en otros análisis se ha encontrado

aumentado en machos con enfermedad hepática alcohólica pero no en las hembras (Das et al., 2022). Su fuerte incremento únicamente en las hembras, pero en ambos grupos alcohólicos, podría ser indicativo de una vinculación con el sexo del individuo.

Siguiendo con las hembras, la pérdida del género *Parabacteroides*, que no sucede en los machos, podría estar no solo asociado al consumo de alcohol (Bull-Otterson et al., 2013), sino también a una peor condición del tejido en comparación a los machos (Cuffaro et al., 2020), siendo normalmente las hembras más afectadas fisiológicamente por el consumo de alcohol.

Sin embargo, los animales TLR4-KO exhibieron algunas diferencias en los cambios de su microbiota cuando fueron sometidos al tratamiento de alcohol en comparación con los animales WT. Por ejemplo, la familia *Erysipelotrichaceae* aumentó en los ratones TLR4-KO tratados con alcohol, algo que se había observado en ratones con ingesta de alcohol en otros estudios (Betrapally, Gillevet, & Bajaj, 2016; Kaakoush, 2015), pero estos cambios no fueron significativos en los ratones WT macho con el mismo tratamiento.

Entre los géneros más afectados negativamente en los TLR4-KO y WT tratados con etanol están *Roseburia* y *Lachnoclostridium*, ambos con una disminución asociada al consumo de alcohol en humanos (Maccioni et al., 2020; Seo et al., 2020) y conocidos productores de butirato (Gutiérrez & Garrido, 2019). Estudios en humanos han observado que el consumo de alcohol reduce la concentración de butirato en el tracto gastrointestinal, un SCFA con numerosos beneficios para la salud (Canani et al., 2011), en comparación con personas no bebedoras (Bjørkhaug et al., 2019). La reducción de estas especies productoras de butirato en los individuos alcohólicos explicaría la menor concentración del ácido graso en su intestino, con la consiguiente pérdida de sus múltiples propiedades beneficiosas.

Diferentes evidencias indican que la composición de la microbiota intestinal está condicionada en gran medida por el sistema inmunológico del hospedador (D. Zheng, Liwinski, & Elinav, 2020), y en concreto con la respuesta del TLR4 (Burgueño & Abreu, 2020; Dheer et al., 2016). El LPS es un ligando importante del receptor TLR4 (Park & Lee, 2013), y podría ser la principal causa para la reducción en la abundancia de las bacterias Gram (-) en los ratones TLR4-KO frente al genotipo WT. De hecho, el LPS liberado por el microbioma intestinal puede facilitar la tolerancia del huésped a las bacterias en un mecanismo donde se encuentra involucrado el TLR4 (Abreu et al., 2001; d'Hennezel, Abubucker, Murphy, & Cullen, 2017). Por tanto, la ausencia del receptor inmune podría afectar negativamente la coexistencia de las bacterias Gram (-) con el sistema inmunológico del huésped. Por ejemplo, el género *Alistipes*, un potencial patógeno oportunista (Parker, Wearsch, Veloo, & Rodriguez-Palacios, 2020) que sintetiza un LPS con baja capacidad inmunoestimuladora (d'Hennezel et al., 2017), esta reducido en los ratones TLR4-KO en ambos géneros. Algunos estudios sugieren (Xiao et al.,

2019) que la población de los géneros *Alloprevotella* y *Bacteroides*, ambos Gram (-), se reduce en el grupo TLR4-KO. Es curioso que en nuestro estudio hay especies del género *Alloprevotella* disminuidas en los animales TLR4-KO, pero otras se encuentran expandidas.

Sin embargo, también hay taxones Gram + que disminuyen debido a la ausencia del TLR4. El género *Bifidobacterium*, el taxón más disminuido en los animales TLR4-KO macho, también presenta una disminución en las hembras en comparación a los WT. Hay que destacar que *Bifidobacterium* es una bacteria con una fuerte capacidad para modular la vía del TLR4, promoviendo e inhibiendo su expresión (Yang, Gao, Liu, & Ren, 2017). Por tanto, la ausencia de un receptor del SII al que se ha adaptado y con el que interacciona *Bifidobacterium* podría afectarle negativamente en un ecosistema tan competitivo como es el interior del intestino.

Un aspecto a tener en cuenta es que el alcohol posee otras propiedades que tienen la capacidad de interactuar con la microbiota intestinal y modificarla. El alcohol tiene un gran valor energético (7.1 kcal/g) (Battista & Leatherdale, 2017), y existen especies que habitan el intestino y que tienen la capacidad de obtener energía de él, como las cepas del género *Methanosphaera*, una arquea del ecosistema intestinal (Kosnicki et al., 2019). De igual manera, existen especies que son capaces de fermentar y producir etanol de forma natural en el intestino (Elshagabee et al., 2016).

Finalmente, un punto a resaltar es que actualmente se desconoce el mecanismo del aumento en el número de células bacterianas en la microbiota de los consumidores habituales de alcohol. La hipótesis más establecida es que, al reducirse la motilidad gastrointestinal por el efecto del alcohol, los alimentos permanecen más tiempo en el intestino y permiten una mayor proliferación bacteriana, causando por tanto un cambio colateralmente (Meroni, Longo, & Dongiovanni, 2019).

4 La microbiota intestinal cambia con el envejecimiento del hospedador

Considerando que los cambios en la microbiota con la edad han sido caracterizados y relacionados con el propio envejecimiento y salud del hospedador en las últimas décadas (Boehme et al., 2021; Xu, Zhu, & Qiu, 2019), en el presente trabajo también se analizó el efecto de la edad en los animales hembra antes y después del tratamiento de etanol (periodo de tiempo de tres meses). Además, el sistema inmune tampoco está exento de sufrir alteraciones con la edad (Nikolich-Žugich, 2018). (Thevaranjan et al., 2017) comprobaron que ratones deficitarios para TNF presentaban con la edad una menor inflamación junto con menores concentraciones

de componentes bacterianos en el plasma, y observaron que su microbiota divergía menos con el paso del tiempo que los animales WT. Al comparar los grupos entre sí, pudimos apreciar como la microbiota variaba en el tiempo de forma distinta dependiendo de la presencia o ausencia del TLR4. Los cambios fisiológicos por los cuales el envejecimiento puede estar modificando la microbiota son diversos. Por ejemplo, en ambos grupos hemos obtenido un descenso en el género *Dubosiella*, que podría deberse a que los ratones al envejecer sufren una ganancia de peso, siendo un género que se ve negativamente afectado en individuos obesos (Schroeder et al., 2020). En los ratones TLR4-KO se observa una disminución en la especie *Bifidobacterium pseudolongum* con la edad, lo que podría justificar por qué los animales adultos TLR4-KO tienen una abundancia significativamente menor de esta especie, en comparación con los animales control WT.

Quizás todos los animales jóvenes posean una abundancia similar, pero la carencia del TLR4 hace que *Bifidobacterium pseudolongum* sea desplazada rápidamente por otros microorganismos en este genotipo. Aun así, el género *Bifidobacterium* declina con la edad habitualmente (Xu et al., 2019), lo que por otra parte es interesante, debido a que los TLR4-KO tienen disminuida significativamente la especie *Bifidobacterium pseudolongum*, pero en cambio presentan un aumento significativo de otra especie no identificada del género *Bifidobacterium*. Otras variaciones en la composición de bacterias intestinales que se observan con la edad es la evolución del género *Coriobacteriaceae UCG-002*. Mientras que en los ratones WT este género disminuye con la edad, en los TLR4-KO está incrementado. En un estudio con hámsteres (Gong et al., 2018) comprobaron que el comportamiento de este género era inverso al de *Bifidobacterium*, por lo que una hipótesis podría ser que fueran competidores y *Coriobacteriaceae UCG-002* dependiera del nicho vacío para su crecimiento.

Otro género con un comportamiento dispar en ambos grupos fue *Parabacteroides*, género aumentado en los WT, pero no en los TLR4-KO. Este género ya se había comprobado que aumentaba a medida que el hospedador envejecía (J. Liu et al., 2019). Aunque es un microorganismo poco abundante, se considera una de las bacterias “core” (Chamarande et al., 2021), lo que remarca las diferencias bacterianas entre ambos genotipos.

5 La ausencia del receptor TLR4 evita la inflamación intestinal debida al consumo crónico de etanol en machos

El alcohol no solo tiene la capacidad de remodelar la microbiota intestinal y la fisiología del intestino por sus efectos directos, como son el aporte calórico o la oxidación que ocasiona en los tejidos. Numerosas publicaciones han demostrado que el alcohol, en grandes cantidades,

puede causar inflamación intestinal, aumentar la permeabilidad de dicho epitelio y alterar el funcionamiento del sistema inmune en el aparato digestivo (Bishehsari et al., 2017). A esto debemos añadir que la propia microbiota puede ser un colaborador en la inflamación intestinal inducida por el alcohol. Por ejemplo, muchas bacterias aerobias y anaerobias facultativas aumentan en personas alcohólicas y exhiben actividad catalasa, pudiendo metabolizar el etanol hasta acetaldehído, un metabolito tóxico y carcinogénico que daña la pared intestinal, contribuyendo a la inflamación (Elamin, Masclee, & Jonkers, 2016; Malaguarnera et al., 2014).

En nuestros resultados, mostramos como el consumo crónico de alcohol regulaba positivamente en el colon diversos ARNm (IL-1 β , iNOS, TNF- α , COX-2, IL-10 y CXCL10) y miARNs (miR 155-5p y miR 146a-5p) asociados con la respuesta inflamatoria en los ratones WT, pero por el contrario esta sobreexpresión no se reflejaba en los animales TLR4-KO sometidos al mismo tratamiento. Este incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias se aprecia también en los pacientes por alcoholismo crónico y es una de las primeras patologías en surgir (Achur, Freeman, & Vrana, 2009). Puede llamar la atención que en el grupo de ratones WT tratados con etanol haya un aumento de la expresión génica de IL-10, una citocina anti-inflamatoria (Iyer & Cheng, 2012). Esta citocina se ha encontrado aumentada en pacientes alcohólicos con niveles hasta dos veces superiores a los controles (Leclercq et al., 2012). La IL-10 es clave en el mantenimiento de la homeostasis en un tejido como es el colon, donde “conviven” microorganismos externos al organismo con el SI del hospedador, y este incremento podría ser un indicador de una inflamación y de los intentos de los linfocitos reguladores por evitar que se dañe el tejido (Hooper & MacPherson, 2010). Debido a la correlación que existe entre la expresión del gen TNF- α y el miR 155-5p, era de esperar una sobreexpresión de este último (Bala et al., 2011), un efecto encontrado previamente en animales tratados crónicamente con alcohol, aunque no en animales con tratamientos agudos (Lippai, Bala, Catalano, Kodys, & Szabo, 2014). Esto podría ser un indicador no solo de inflamación, sino también de desregulación en las uniones celulares (R. Tian, Wang, Xie, Jin, & Yu, 2013). Así mismo el aumento en el miR 146a-5p posiblemente sea debido a un efecto compensatorio para controlar la inflamación y la ruta TLR4/MyD88/NF-kB (Anzola et al., 2018; E. A. Ye & Steinle, 2016). Los ratones TLR4-KO mostraban así una resistencia al efecto inflamatorio del etanol en el intestino. Resulta dudoso que este efecto se deba solo a la ausencia del receptor TLR4, siendo más probable que la protección se deba a una sinergia entre la ausencia del TLR4 y la diferente microbiota desarrollada en este genotipo. De hecho, distintos trabajos han destacado la capacidad anti-inflamatoria de la microbiota (Lobionda et al., 2019).

Debido a su pequeño tamaño y solubilidad, el etanol tiene la capacidad de penetrar y afectar la estructura y los canales del epitelio intestinal, causando un importante incremento de

la permeabilidad de la membrana y con ello la translocación de metabolitos potencialmente tóxicos (Leclercq et al., 2012). Varios estudios han mostrado que el etanol produce una alteración progresiva en las proteínas de la barrera intestinal (Capaldo & Nusrat, 2009; T. Y. Ma, Nguyen, Bui, Nguyen, & Hoa, 1999; Ying et al., 2014).

Algunos estudios indican que la cantidad de alcohol ingerido tiene una correlación positiva con el aumento en la permeabilidad del epitelio intestinal y los niveles de endotoxinas en plasma (Ferrier et al., 2006; Parlesak, Schäfer, Schütz, Bode, & Bode, 2000). De hecho, nuestros resultados muestran que la expresión de varios ARNm asociados a la integridad del epitelio intestinal (ITLN1, CFTR, CDH1, MUC2, AQP8) se encuentran alterados de forma diferente en los ratones WT y TLR4-KO.

ITLN1 es un receptor cuya función principal es la unión y captación de lactoferrina (Akiyama et al., 2013), pero que puede funcionar como una proteína del SII al unirse a los epítomos de glicanos bacterianos (Wesener et al., 2015). Esta capacidad de actuar como una proteína inmune explicaría su patrón de expresión en los cuatro grupos de ratones, muy parecido al de las proteínas inflamatorias, con un gran aumento únicamente en el grupo de ratones WT tratados con etanol. Respecto al CFTR, es un canal proteico del cloro en el que se sabe que el etanol provoca una reducción en la expresión de su ARNm y en su estabilidad proteica (Maléth et al., 2015), y que su actividad es anómala cuando hay presencia de inflamación en el intestino. Estos efectos se han visto tanto en pacientes con fibrosis quística (De Lisle & Borowitz, 2013), como en estudios con células CFTR knock-out (Crites et al., 2015). Nuestros resultados demuestran que el abuso crónico de alcohol modifica la expresión de los genes ITLN1 y CFTR en el intestino de los ratones WT, con cambios menores en los TLR4-KO en comparación con el grupo control. Otro gen que sufrió cambios fue el gen CDH1, una cadherina involucrada en la adhesión célula-célula y en la inhibición de la invasión celular, con una contribución destacada en el mantenimiento del epitelio durante los procesos inflamatorios (Schnoor, 2015). Debido a ello, este gen sobrelleva una expresión reducida cuando se expone al etanol (Devall et al., 2020) y/o en áreas inflamadas del intestino (Stewart et al., 2018). Nuestros resultados confirman que, aunque el abuso de alcohol puede inducir inflamación en el colon, afectando las funciones intestinales y la composición de la microbiota, los efectos perjudiciales del etanol son más prominentes en los ratones WT que en los TLR4-KO. Es probable que este hecho se deba a la ausencia de la respuesta inmune innata asociada con el receptor TLR4, y al desarrollo de una microbiota diferente y particular a este genotipo que se comporta y se adapta de forma distinta en esas condiciones ambientales.

Algunos estudios han demostrado que ciertas bacterias específicas están asociadas con la integridad de la membrana intestinal. Por ejemplo, el género

Lachnospiraceae_NK4A136_group es una importante bacteria homeostática y productora de SCFAs (L. Ma et al., 2020; Manuel, Latuga, Ashby, & Reznik, 2019), que es más abundante en ratones TLR4-KO control que en los ratones WT control. Por otra parte, Actinobacteriota es un filo importante en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis intestinal (Binda et al., 2018), y hemos comprobado un aumento de este filo en los ratones TLR4-KO tratados con etanol, a pesar de que el filo Firmicutes por el contrario disminuye con dicho tratamiento. Estos resultados sugieren la posibilidad de que parte del nicho vacante que deja el filo Firmicutes en este ecosistema, a causa del etanol, podría ser reemplazado por otras especies no patógenas que sean también Gram (+), sin LPS en su pared, como sería el filo Actinobacteriota, en lugar de especies Gram (-) con una mayor capacidad inmunogénica.

Hemos comentado a lo largo de la tesis que la microbiota no solo tiene un papel relevante en el mantenimiento del aparato digestivo, sino que su influencia afecta a todo el organismo, incluyendo al SNC, mediante el eje Microbiota-Intestino-Cerebro. Así pues, decidimos realizar un estudio de los metabolitos presentes en la corteza cerebral de los ratones WT y WT con alcohol.

Los dos metabolitos que presentaron cambios significativos fueron el lactato, incrementado, y el NAD⁺, disminuido, en la corteza de los ratones crónicos. NAD⁺ es un cofactor clave en las reacciones redox y en la regulación metabólica (Cantó, Menzies, & Auwerx, 2015), participando en la oxidación del etanol catalizado por el complejo de la alcohol deshidrogenasa para formar acetaldehído. Un descenso en su concentración es un biomarcador que indica un incremento en el estrés y el daño oxidativo en el cerebro y es habitual cuando hay ingesta de alcohol (McElfresh & McDonald, 1983). Por otra parte, el lactato, una sal del ácido láctico, es otro biomarcador del estrés oxidativo en el cuerpo que sufre desregulación cuando hay ingesta de alcohol (Kreisberg, Owen, & Siegal, 1971). En resumen, en los perfiles metabólicos estudiados en el SNC el único cambio registrado ha sido un aumento del estrés oxidativo, cuya causa probable es el efecto directo del etanol sobre el cerebro. Aun así, no podemos descartar que los cambios que hemos registrado en la microbiota de nuestros ratones no estén modificando el SNC mediante otros metabolitos o rutas que no hemos podido detectar.

Conclusiones

1. Los análisis mediante secuenciación masiva de corteza cerebral de ratones con consumo crónico de alcohol demuestran que el abuso de alcohol altera diferentes miARNs en corteza cerebral, incluyendo el clúster miR-183 (miR-96/-182/-183) y los miR-200a y miR-200b de la familia miR-200, que regulan genes asociados con la respuesta neuroinflamatoria y con la activación de la ruta de señalización del TLR4.
2. En contraposición, los animales que carecen del receptor TLR4 poseen un perfil diferente de expresión de miARNs en la corteza cerebral, y presentan menos cambios tanto en los miARNs como en la expresión de genes inflamatorios cuando se someten a un consumo crónico de alcohol
3. El tratamiento con un curcuminoide (BDMC) nanoconjugado, biodegradable y capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, disminuye la expresión de moléculas inflamatorias asociadas con el consumo de alcohol en cerebro, tanto a nivel de la expresión génica, como sus proteínas, con mayor eficacia que la forma libre de la curcumina.
4. El consumo prolongado de alcohol, en el aparato digestivo, también causa inflamación y daños en el epitelio intestinal en los animales WT. Estos cambios conducen a un desequilibrio en la microbiota intestinal, con cambios en la abundancia de los taxones bacterianos.
5. De manera similar a lo que ocurre en el SNC, los animales deficientes en el receptor TLR4 presentan resistencia a los cambios estructurales en el epitelio intestinal y a la inflamación que produce el consumo crónico de alcohol.
6. Por primera vez, hemos demostrado que la ausencia del receptor TLR4 genera una microbiota intestinal única y diferente a la que poseen los animales WT, con sus propias variaciones frente al tratamiento de alcohol. Esta nueva comunidad bacteriana podría estar contribuyendo a mitigar los efectos del etanol sobre el tejido intestinal.
7. Los resultados de la taxonomía bacteriana muestran la relevancia del receptor TLR4 sobre el establecimiento de la microbiota bacteriana, siendo incluso superior a la del consumo de alcohol o a la edad de los animales. Estos datos ponen de manifiesto la importancia del SII y su interacción con las bacterias intestinales en el equilibrio de la integridad del epitelio intestinal.

Bibliografía

- Abe, Y., Hashimoto, S., & Horie, T. (1999). Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological Research*, *39*(1), 41–47. <https://doi.org/10.1006/PHRS.1998.0404>
- Abrahamo, K. P., Salinas, A. G., & Lovinger, D. M. (2017). Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron*, *96*(6), 1223–1238. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2017.10.032>
- Abreu, M. T., Arnold, E. T., Thomas, L. S., Gonsky, R., Zhou, Y., Hu, B., & Ardit, M. (2002). TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(23), 20431–20437. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110333200>
- Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., & Ardit, M. (2001). Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(3), 1609–1616. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.3.1609>
- Achur, R. N., Freeman, W. M., & Vrana, K. E. (2009). Circulating Cytokines as Biomarkers of Alcohol Abuse and Alcoholism. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* *2009 5:1*, *5*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1007/S11481-009-9185-Z>
- Adachi, Y., Moore, L. E., Bradford, B. U., Gao, W., & Thurman, R. G. (1995). Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology*, *108*(1), 218–224. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90027-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90027-6)
- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *76*(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/S00018-018-2943-4>
- Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(1), 40–59. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2008.06.010>
- Akiyama, Y., Oshima, K., Kuhara, T., Shin, K., Abe, F., Iwatsuki, K., ... Matsuda, T. (2013). A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *The Journal of Biochemistry*, *154*(5), 437–448. <https://doi.org/10.1093/JB/MVT073>
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I., & Guerri, C. (2010). Pivotal Role of TLR4 Receptors in Alcohol-Induced Neuroinflammation and Brain Damage. *Journal of Neuroscience*, *30*(24), 8285–8295. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010>
- Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., Gómez-Pinedo, U., Pascual-Lucas, M., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (2012). Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia*, *60*(6), 948–964. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22327>
- Alikunju, S., Abdul Muneer, P. M., Zhang, Y., Szlachetka, A. M., & Haorah, J. (2011). The Inflammatory Footprints of Alcohol-induced Oxidative Damage in Neurovascular Components. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(Suppl 1), S129. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2011.01.007>
- Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. (2018). Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Frontiers in Immunology*, *9*(OCT), 2379. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02379/BIBTEX>
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2013 14:8*, *14*(8), 475–488. <https://doi.org/10.1038/nrm3611>
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*, *4*(6), 807–818. <https://doi.org/10.1021/MP700113R>
- Anzola, A., González, R., Gámez-Belmonte, R., Ocón, B., Aranda, C. J., Martínez-Moya, P., ... Martínez-Augustín, O. (2018). miR-146a regulates the crosstalk between intestinal epithelial cells, microbial components and inflammatory stimuli. *Scientific Reports* *2018 8:1*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35338-y>
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., ... Schwartz, D. A. (2000). TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, *25*(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/76048>
- Asano, Y., Hiramoto, T., Nishino, R., Aiba, Y., Kimura, T., Yoshihara, K., ... Sudo, N. (2012). Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *303*(11), 1288–1295.

<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00341.2012>

- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Gou, Y. K., Nagy, A., ... Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15718–15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., ... Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe*, *12*(5), 611–622. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2012.10.012>
- Bala, S., Marcos, M., Kodys, K., Csak, T., Catalano, D., Mandrekar, P., & Szabo, G. (2011). Up-regulation of MicroRNA-155 in Macrophages Contributes to Increased Tumor Necrosis Factor α (TNF α) Production via Increased mRNA Half-life in Alcoholic Liver Disease. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(2), 1436–1444. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.145870>
- Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., ... Szabo, G. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *56*(5), 1946–1957. <https://doi.org/10.1002/HEP.25873>
- Bar-Am, O., Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M. B. H., & Youdim, M. B. H. (2005). Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *The FASEB Journal*, *19*(13), 1899–1901. <https://doi.org/10.1096/FJ.05-3794FJE>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, *173*(1), 20. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.03.006>
- Basnet, P., & Skalko-Basnet, N. (2011). Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules 2011, Vol. 16, Pages 4567-4598*, *16*(6), 4567–4598. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES16064567>
- Battista, K., & Leatherdale, S. T. (2017). Estimating how extra calories from alcohol consumption are likely an overlooked contributor to youth obesity. *Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada : Research, Policy and Practice*, *37*(6), 194. <https://doi.org/10.24095/HPCDP.37.6.03>
- Belcheva, A. (2017). MicroRNAs at the epicenter of intestinal homeostasis. *BioEssays*, *39*(3), 1600200. <https://doi.org/10.1002/BIES.201600200>
- Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*, *46*(4), 562–576. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.04.008>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X>
- Bennet, D., & Kim, S. (2014). Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. <https://doi.org/10.5772/58422>
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., ... Collins, S. M. (2011). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology*, *141*(2), 599–609.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.052>
- Besedovsky, H., Sorkin, E., Keller, M., & Muller, J. (1975). Changes in Blood Hormone Levels during the Immune Response. *Experimental Biology and Medicine*, *150*(2), 466–470. <https://doi.org/10.3181/00379727-150-39057>
- Betrapally, N. S., Gillevet, P. M., & Bajaj, J. S. (2016). Changes in the Intestinal Microbiome and Alcoholic and Nonalcoholic Liver Diseases: Causes or Effects? *Gastroenterology*, *150*(8), 1745–1755.e3. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2016.02.073>
- Bi, K., Zhang, X., Chen, W., & Diao, H. (2020). MicroRNAs Regulate Intestinal Immunity and Gut Microbiota for Gastrointestinal Health: A Comprehensive Review. *Genes*, *11*(9), 1–17. <https://doi.org/10.3390/GENES11091075>
- Binda, C., Lopetuso, L. R., Rizzatti, G., Gibiino, G., Cennamo, V., & Gasbarrini, A. (2018). Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *50*(5), 421–428. <https://doi.org/10.1016/J.DLD.2018.02.012>
- Bishehsari, F., Magno, E., Swanson, G., Desai, V., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2017). Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Research : Current Reviews*, *38*(2), 163. Retrieved from [/pmc/articles/PMC3513683/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3513683/)
- Biswas, S. K. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant

Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>

- Bjørkhaug, S. T., Aanes, H., Neupane, S. P., Bramness, J. G., Malvik, S., Henriksen, C., ... Valeur, J. (2019). Characterization of gut microbiota composition and functions in patients with chronic alcohol overconsumption. *https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1580097*, 10(6), 663–675. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1580097>
- Blander, J. M., Longman, R. S., Iliiev, I. D., Sonnenberg, G. F., & Artis, D. (2017). Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nature Immunology*, 18(8), 851. <https://doi.org/10.1038/NI.3780>
- Bluthé, R. M., Michaud, B., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (1996). Vagotomy blocks behavioural effects of interleukin-1 injected via the intraperitoneal route but not via other systemic routes. *NeuroReport*, 7(15–17), 2823–2827. <https://doi.org/10.1097/00001756-199611040-00083>
- Bode, C., & Bode, J. C. (2003). Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 17(4), 575–592. [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00034-9)
- Boehme, M., Guzzetta, K. E., Bastiaanssen, T. F. S., van de Wouw, M., Moloney, G. M., Gual-Grau, A., ... Cryan, J. F. (2021). Microbiota from young mice counteracts selective age-associated behavioral deficits. *Nature Aging 2021 1:8*, 1(8), 666–676. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00093-9>
- Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C. L., Martens, L., ... Guillemins, M. (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity*, 51(4), 638. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.08.017>
- Boudreau, R. L., Jiang, P., Gilmore, B. L., Spengler, R. M., Tirabassi, R., Nelson, J. A., ... Davidson, B. L. (2014). Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain. *Neuron*, 81(2), 294–305. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2013.10.062>
- Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Kett, K., Krajči, P., Kvale, D., Rognum, T. O., ... Sollid, L. M. (1989). Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)90406-X](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)90406-X)
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., ... Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263), 263ra158–263ra158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Bravo, J. A., Forsythe, P., Chew, M. V., Escaravage, E., Savignac, H. M., Dinan, T. G., ... Cryan, J. F. (2011). Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), 16050–16055. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108>
- Breit, S., Kupferberg, A., Rogler, G., & Hasler, G. (2018, March 13). Vagus nerve as modulator of the brain-gut axis in psychiatric and inflammatory disorders. *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00044>
- Brioschi, S., Zhou, Y., & Colonna, M. (2020). Brain Parenchymal and Extraparenchymal Macrophages in Development, Homeostasis, and Disease. *The Journal of Immunology*, 204(2), 294–305. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1900821>
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual Review of Immunology*, 33, 257–290. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112240>
- Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., ... Waisman, A. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*, 43(1), 92–106. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2015.06.012>
- Bull-Otterson, L., Feng, W., Kirpich, I., Wang, Y., Qin, X., Liu, Y., ... Barve, S. (2013). Metagenomic analyses of alcohol induced pathogenic alterations in the intestinal microbiome and the effect of Lactobacillus rhamnosus GG treatment. *PLoS One*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0053028>
- Burgueño, J. F., & Abreu, M. T. (2020). Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020 17:5, 17(5), 263–278. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4>
- Butchi, N. B., Du, M., & Peterson, K. E. (2010). Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia. *Glia*, 58(6), 650–664. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20952>

- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D., & Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metabolism*, 22(4), 658. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.07.026>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal* 2017 11:12, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Canani, R. B., Costanzo, M. Di, Leone, L., Pedata, M., Meli, R., & Calignano, A. (2011). Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 17(12), 1519–1528. <https://doi.org/10.3748/WJG.V17.I12.1519>
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/DB06-1491>
- Cantó, C., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2015). NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metabolism*, 22(1), 31–53. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.05.023>
- Cao, D. D., Li, L., & Chan, W. Y. (2016). MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/IJMS17060842>
- Capaldo, C. T., & Nusrat, A. (2009). Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), 864–871. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2008.08.027>
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., & Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26(0). <https://doi.org/10.3402/MEHD.V26.26191>
- Cardoso, A. L., Guedes, J. R., & De Lima, M. C. P. (2016). Role of microRNAs in the regulation of innate immune cells under neuroinflammatory conditions. *Current Opinion in Pharmacology*, 26, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2015.09.001>
- Cario, E., & Podolsky, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 68(12), 7010–7017. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.7010-7017.2000>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS17101712>
- Chamarande, J., Cunat, L., Caillet, C., Mathieu, L., Duval, J. F. L., Lozniewski, A., ... Cailliez-grimal, C. (2021). Surface Properties of Parabacteroides distasonis and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 1602, 9(8), 1602. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9081602>
- Chawla, G., Deosthale, P., Childress, S., Wu, Y. C., & Sokol, N. S. (2016). A let-7-to-miR-125 MicroRNA Switch Regulates Neuronal Integrity and Lifespan in Drosophila. *PLOS Genetics*, 12(8), e1006247. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006247>
- Chen, H. P., Zhou, W., Kang, L. M., Yan, H., Zhang, L., Xu, B. H., & Cai, W. H. (2014). Intrathecal miR-96 inhibits Nav1.3 expression and alleviates neuropathic pain in rat following chronic constriction injury. *Neurochemical Research*, 39(1), 76–83. <https://doi.org/10.1007/S11064-013-1192-Z>
- Chen, J., Liu, Z., & Yang, Y. (2014). In vitro screening of LPS-induced miRNAs in leukocytes derived from cord blood and their possible roles in regulating TLR signals. *Pediatric Research* 2014 75:5, 75(5), 595–602. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.18>
- Chen, L., Dong, R., Lu, Y., Zhou, Y., Li, K., Zhang, Z., & Peng, M. (2019). MicroRNA-146a protects against cognitive decline induced by surgical trauma by suppressing hippocampal neuroinflammation in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 78, 188–201. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2019.01.020>
- Chen, Yanfei, Yang, F., Lu, H., Wang, B., Chen, Y., Lei, D., ... Li, L. (2011). Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(2), 562–572. <https://doi.org/10.1002/HEP.24423>
- Chen, Yuhan, Zeng, Z., Shen, X., Wu, Z., Dong, Y., & Cheng, J. C. H. (2016). MicroRNA-146a-5p Negatively Regulates Pro-Inflammatory Cytokine Secretion and Cell Activation in Lipopolysaccharide Stimulated Human Hepatic Stellate Cells through Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS17071076>

- Cheng, H.-Y., Ning, M.-X., Chen, D.-K., & Ma, W.-T. (2019). Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens. *Frontiers in Immunology*, 0(MAR), 607. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00607>
- Cheng, R., Meng, F., Ma, S., Xu, H., Liu, H., Jing, X., & Zhong, Z. (2011). Reduction and temperature dual-responsive crosslinked polymersomes for targeted intracellular protein delivery. *Journal of Materials Chemistry*, 21(47), 19013–19020. <https://doi.org/10.1039/C1JM13536H>
- Chin, J. H., Parsons, L. M., & Goldstein, D. B. (1978). Increased cholesterol content of erythrocyte and brain membranes in ethanol-tolerant mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 513(3), 358–363. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90204-3)
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1987.9999>
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol*, 5(2), 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>
- Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2020). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2020 78:4, 78(4), 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03656-Y>
- Clarke, G., Stilling, R. M., Kennedy, P. J., Stanton, C., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2014, August 1). Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Molecular Endocrinology*. Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>
- Coleman, L. G., Zou, J., & Crews, F. T. (2017). Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12974-017-0799-4>
- Córdoba-David, G., Duro-Castano, A., Castelo-Branco, R. C., González-Guerrero, C., Cannata, P., Sanz, A. B., ... Ramos, A. M. (2020). Effective Nephroprotection Against Acute Kidney Injury with a Star-Shaped Polyglutamate-Curcuminoid Conjugate. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58974-9>
- Cossart, P., & Sansonetti, P. J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5668), 242–248. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090124>
- Crites, K. S. M., Morin, G., Orlando, V., Patey, N., Cantin, C., Martel, J., ... Mailhot, G. (2015). CFTR Knockdown induces proinflammatory changes in intestinal epithelial cells. *Journal of Inflammation (London, England)*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S12950-015-0107-Y>
- Croswell, A., Amir, E., Teggatz, P., Barman, M., & Salzman, N. H. (2009). Prolonged Impact of Antibiotics on Intestinal Microbial Ecology and Susceptibility to Enteric Salmonella Infection. *Infection and Immunity*, 77(7), 2741. <https://doi.org/10.1128/IAI.00006-09>
- Cryan, J. F., O’riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., ... Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Cuesta, C. M., Ibañez, F., Lopez-Hidalgo, R., Ureña, J., Duro-Castano, A., Armiñán, A., ... Guerri, C. (2021). A targeted polypeptide-based nanoconjugate as a nanotherapeutic for alcohol-induced neuroinflammation. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 34. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2021.102376>
- Cuffaro, B., Assouhoun, A. L. W., Boutillier, D., Súkeníková, L., Desramaut, J., Boudebouze, S., ... Grangette, C. (2020). In Vitro Characterization of Gut Microbiota-Derived Commensal Strains: Selection of Parabacteroides distasonis Strains Alleviating TNBS-Induced Colitis in Mice. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/CELLS9092104>
- d’Hennezel, E., Abubucker, S., Murphy, L. O., & Cullen, T. W. (2017). Total Lipopolysaccharide from the Human Gut Microbiome Silences Toll-Like Receptor Signaling. *MSystems*, 2(6). https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00046-17/SUPPL_FILE/SYS006172148SF3.TIF
- Dai, R., Zhang, Y., Khan, D., Heid, B., Caudell, D., Crasta, O., & Ansar Ahmed, S. (2010). Identification of a Common Lupus Disease-Associated microRNA Expression Pattern in Three Different Murine Models of Lupus. *PLOS ONE*, 5(12), e14302. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0014302>
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019 16:8, 16(8), 461–478.

<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>

- Dalmaso, G., Nguyen, H. T. T., Yan, Y., Laroui, H., Charania, M. A., Ayyadurai, S., ... Merlin, D. (2011). Microbiota Modulate Host Gene Expression via MicroRNAs. *PLOS ONE*, 6(4), e19293. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0019293>
- Dambal, S., Shah, M., Mihelich, B., & Nonn, L. (2015). The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic Acids Research*, 43(15), 7173–7188. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV703>
- Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 933, pp. 222–234). New York Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05827.x>
- Dantzer, R. (2018, January 1). Neuroimmune interactions: From the brain to the immune system and vice versa. *Physiological Reviews*. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2016>
- Das, S., Ge, X., Han, H., Desert, R., Song, Z., Athavale, D., ... Nieto, N. (2022). The Integrated “Multiomics” Landscape at Peak Injury and Resolution From Alcohol-Associated Liver Disease. *Hepatology Communications*, 6(1), 133–160. <https://doi.org/10.1002/HEP4.1793>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., ... Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/NATURE12820>
- De Lisle, R. C., & Borowitz, D. (2013). The cystic fibrosis intestine. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A009753>
- De Vadder, F., Grasset, E., Holm, L. M., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E., & Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25), 6458–6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
- Deitrich, R., Zimatkin, S., & Pronko, S. (2006). Oxidation of Ethanol in the Brain and Its Consequences. *Alcohol Research & Health*, 29(4), 266. Retrieved from /pmc/articles/PMC6527035/
- del Rey, A., Besedovsky, H., & Sorkin, E. (1984). Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. *The Journal of Immunology*, 133(2).
- Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Kiely, B., Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2010). Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*, 170(4), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005>
- Devall, M., Jennelle, L. T., Bryant, J., Bien, S., Peters, U., Powell, S., & Casey, G. (2020). Modeling the effect of prolonged ethanol exposure on global gene expression and chromatin accessibility in normal 3D colon organoids. *PLOS ONE*, 15(1), e0227116. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0227116>
- Dheer, R., Santaolalla, R., Davies, J. M., Lang, J. K., Phillips, M. C., Pastorini, C., ... Abreu, M. T. (2016). Intestinal epithelial Toll-like receptor 4 signaling affects epithelial function and colonic microbiota and promotes a risk for transmissible colitis. *Infection and Immunity*, 84(3), 798–810. https://doi.org/10.1128/IAI.01374-15/SUPPL_FILE/ZII999091620SO6.XLSX
- Dieterich, W., Schink, M., & Zopf, Y. (2018). Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Medical Sciences*, 6(4), 116. <https://doi.org/10.3390/medsci6040116>
- do Carmo Carreiras, M., Ismaili, L., & Marco-Contelles, J. (2020). Propargylamine-derived multi-target directed ligands for Alzheimer’s disease therapy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30(3), 126880. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2019.126880>
- Dolganiuc, A., Petrasek, J., Kodys, K., Catalano, D., Mandrekar, P., Velayudham, A., & Szabo, G. (2009). MicroRNA Expression Profile in Lieber-DeCarli Diet-Induced Alcoholic and Methionine Choline Deficient Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Models in Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(10), 1704–1710. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2009.01007.X>
- Dominguez-Bello, M. G., Blaser, M. J., Ley, R. E., & Knight, R. (2011). Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology*, 140(6), 1713–1719. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.011>
- Duro-Castano, A., Moreira Leite, D., Forth, J., Deng, Y., Matias, D., Noble Jesus, C., & Battaglia, G. (2020). Designing peptide nanoparticles for efficient brain delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 160, 52–77. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.10.001>

- Duro-Castano, A., Nebot, V. J., Niño-Pariente, A., Armiñán, A., Arroyo-Crespo, J. J., Paul, A., ... Vicent, M. J. (2017). Capturing “Extraordinary” Soft-Assembled Charge-Like Polypeptides as a Strategy for Nanocarrier Design. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 29(39). <https://doi.org/10.1002/ADMA.201702888>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... Relman, D. A. (2005). Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Edeki, C. (2012). International Journal of Computer Science and Mobile Computing Comparative Study of Microarray and Next Generation Sequencing Technologies. *IJCSMC*, 1(1), 15–20. Retrieved from www.ijcsmc.com
- Elamin, E. E., Masclee, A. A., & Jonkers, D. M. (2016). Effects of Acetaldehyde on Intestinal Barrier Function. *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition: A Volume in the Molecular Nutrition Series*, 171–186. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800773-0.00014-8>
- Elshagabee, F. M. F., Bockelmann, W., Meske, D., Vrese, M. de, Walte, H. G., Schrezenmeir, J., & Heller, K. J. (2016). Ethanol Production by Selected Intestinal Microorganisms and Lactic Acid Bacteria Growing under Different Nutritional Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 47. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00047>
- Endres, K., & Schäfer, K. H. (2018). Influence of Commensal Microbiota on the Enteric Nervous System and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Innate Immunity*, 10(3), 172–180. <https://doi.org/10.1159/000488629>
- Engen, P. A., Green, S. J., Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2015). The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Research : Current Reviews*, 37(2), 223. Retrieved from <http://pmc/articles/PMC4590619/>
- Enomoto, N., Yamashina, S., Kono, H., Schemmer, P., Rivera, C. A., Enomoto, A., ... Thurman, R. G. (1999). Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 29(6), 1680–1689. <https://doi.org/10.1002/HEP.510290633>
- Fan, X., Jin, Y., Chen, G., Ma, X., & Zhang, L. (2021). Gut Microbiota Dysbiosis Drives the Development of Colorectal Cancer. *Digestion*, 102(4), 508–515. <https://doi.org/10.1159/000508328>
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., & Guerri, C. (2009). Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(7), 4733–4744. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0803590>
- Ferrier, L., Bérard, F., Debrauwer, L., Chabo, C., Langella, P., Buéno, L., & Fioramonti, J. (2006). Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents. *The American Journal of Pathology*, 168(4), 1148–1154. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2006.050617>
- Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., & de Oliveira, A. C. P. (2018). Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00329>
- Fontana, A., Gast, H., Reith, W., Recher, M., Birchler, T., & Bassetti, C. L. (2010). Narcolepsy: autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss? *Brain : A Journal of Neurology*, 133(Pt 5), 1300–1311. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWQ086>
- Forbes, J. D., Van Domselaar, G., & Bernstein, C. N. (2016). The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUL), 1081. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01081/BIBTEX>
- Fore, F., Indriputri, C., Mamutse, J., & Nugraha, J. (2020). TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics. *Immune Network*, 20(3). <https://doi.org/10.4110/IN.2020.20.E21>
- Forsythe, P., Bienenstock, J., & Kunze, W. A. (2014). Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 115–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_5
- Fortuni, B., Inose, T., Ricci, M., Fujita, Y., Van Zundert, I., Masuhara, A., ... Uji-i, H. (2019). Polymeric Engineering of Nanoparticles for Highly Efficient Multifunctional Drug Delivery Systems. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39107-3>
- Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G. M., Peng, B., Uwagawa, T., ... Chiao, P. J. (2004). NF- κ B and AP-1 Connection: Mechanism of NF- κ B-Dependent Regulation of AP-1 Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7806. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004>

- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A. S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., ... Abreu, M. T. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*, *133*(6), 1869–1881. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.09.008>
- Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, *20*(2), 145–155. <https://doi.org/10.1038/NN.4476>
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., ... Van Immerseel, F. (2006). Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 946–949. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.946-949.2006>
- Gao, R., Tian, S., Wang, J., & Zhu, W. (2021). Galacto-oligosaccharides improve barrier function and relieve colonic inflammation via modulating mucosa-associated microbiota composition in lipopolysaccharides-challenged piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S40104-021-00612-Z>
- Gao, Y., Wang, C., Sun, M., Wang, X., Yu, A., Li, A., & Zhai, G. (2012). In vivo evaluation of curcumin loaded nanosuspensions by oral administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *8*(4), 659–668. <https://doi.org/10.1166/JBN.2012.1425>
- Garay-Malpartida, H. M., Mourão, R. F., Mantovani, M., Santos, I. A., Sogayar, M. C., & Goldberg, A. C. (2011). Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunology*, *12*, 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-18>
- Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2018). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2018 20:1*, *20*(1), 21–37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Ghorbani, S., Talebi, F., Chan, W. F., Masoumi, F., Vojgani, M., Power, C., & Noorbakhsh, F. (2017). MicroRNA-181 Variants Regulate T Cell Phenotype in the Context of Autoimmune Neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, *8*(JUL). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00758>
- Ghorbani, S., Talebi, F., Ghasemi, S., Abad, A. J. J., Vojgani, M., & Noorbakhsh, F. (2017). miR-181 interacts with signaling adaptor molecule DENN/MADD and enhances TNF-induced cell death. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174368. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174368>
- Goel, A., Boland, C. R., & Chauhan, D. P. (2001). Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Letters*, *172*(2), 111–118. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00655-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00655-3)
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., ... Prinz, M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*, *17*(7), 797–805. <https://doi.org/10.1038/NI.3423>
- Gong, L., Cao, W., Chi, H., Wang, J., Zhang, H., Liu, J., & Sun, B. (2018). Whole cereal grains and potential health effects: Involvement of the gut microbiota. *Food Research International*, *103*, 84–102. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.10.025>
- González, A., Pariente, J. A., & Salido, G. M. (2007). Ethanol stimulates ROS generation by mitochondria through Ca²⁺ mobilization and increases GFAP content in rat hippocampal astrocytes. *Brain Research*, *1178*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2007.08.040>
- Gorina, R., Font-Nieves, M., Márquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., & Planas, A. M. (2011). Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*, *59*(2), 242–255. <https://doi.org/10.1002/GLIA.21094>
- Gorini, G., Nunez, Y. O., & Mayfield, R. D. (2013). Integration of miRNA and Protein Profiling Reveals Coordinated Neuroadaptations in the Alcohol-Dependent Mouse Brain. *PLOS ONE*, *8*(12), e82565. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0082565>
- Griffioen, K., Mattson, M. P., & Okun, E. (2018). Deficiency of Toll-like receptors 2, 3 or 4 extends life expectancy in Huntington's disease mice. *Heliyon*, *4*(1), e00508. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2018.E00508>
- Guerri, C., & Pascual, M. (2019). Role of neuroinflammation in ethanol neurotoxicity, *3*, 259–294. <https://doi.org/10.1016/BS.ANT.2018.10.009>
- Guilliams, M., & Scott, C. L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature Reviews Immunology*, *17*(7), 451–460. <https://doi.org/10.1038/NRI.2017.42>
- Guo, Y., Chen, Y., Carreon, S., & Qiang, M. (2012). Chronic Intermittent Ethanol Exposure and Its Removal Induce a Different miRNA Expression Pattern in Primary Cortical Neuronal Cultures. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *36*(6), 1058–1066. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2011.01689.X>

- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2020, January 1). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>
- Gustafsson, B. E., Midtvedt, T., & Strandberg, K. (1970). Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germfree rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 5(4), 309–314. <https://doi.org/10.1080/00365521.1970.12096595>
- Gutiérrez, N., & Garrido, D. (2019). Species Deletions from Microbiome Consortia Reveal Key Metabolic Interactions between Gut Microbes. *MSystems*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00185-19/ASSET/8A1799E1-49BA-4BC5-BEE8-4311F2429F92/ASSETS/GRAPHIC/MSYSTEMS.00185-19-F0009.JPEG>
- Hamberg, M., Backes, C., Fehlmann, T., Hart, M., Meder, B., Meese, E., & Keller, A. (2016). MiRTargetLink--miRNAs, Genes and Interaction Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS17040564>
- Hammani, R., Fernandez, B., Lacroix, C., & Fliss, I. (2013, August). Anti-infective properties of bacteriocins: An update. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Cell Mol Life Sci. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1202-3>
- Han, H., Li, Y., Fang, J., Liu, G., Yin, J., Li, T., & Yin, Y. (2018, April 1). Gut microbiota and type 1 diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19040995>
- Haorah, J., Knipe, B., Gorantla, S., Zheng, J., & Persidsky, Y. (2007). Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. *Journal of Neurochemistry*, 100(2), 324–336. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.04245.X>
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90516-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90516-8)
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spöttl, T., Andus, T., ... Rogler, G. (2002). Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 122(7), 1987–2000. <https://doi.org/10.1053/GAST.2002.33662>
- Heilig, M., Egli, M., Crabbe, J. C., & Becker, H. C. (2010). Acute withdrawal, protracted abstinence and negative affect in alcoholism: are they linked? *Addiction Biology*, 15(2), 169–184. <https://doi.org/10.1111/J.1369-1600.2009.00194.X>
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: A linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in Human Neuroscience*, 3(NOV), 31. <https://doi.org/10.3389/NEURO.09.031.2009/BIBTEX>
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health. *Foods*, 6(10). <https://doi.org/10.3390/FOODS6100092>
- Hines, D. J., Choi, H. B., Hines, R. M., Phillips, A. G., & MacVicar, B. A. (2013). Prevention of LPS-Induced Microglia Activation, Cytokine Production and Sickness Behavior with TLR4 Receptor Interfering Peptides. *PLOS ONE*, 8(3), e60388. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060388>
- Holmes, Z. C., Silverman, J. D., Dressman, H. K., Wei, Z., Dallow, E. P., Armstrong, S. C., ... David, L. A. (2020). Short-chain fatty acid production by gut microbiota from children with obesity differs according to probiotic choice and bacterial community composition. *MBio*, 11(4), 1–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00914-20>
- Hooper, L. V., & MacPherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159–169. <https://doi.org/10.1038/NRI2710>
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*. Annu Rev Nutr. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:2, 12(2), 99–110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Ichiyama, K., Gonzalez-Martin, A., Kim, B. S., Jin, H. Y., Jin, W., Xu, W., ... Dong, C. (2016). The microRNA-183-96-182 cluster promotes T helper 17 cell pathogenicity by negatively regulating transcription factor Foxo1 expression. *Immunity*, 44(6), 1284. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2016.05.015>
- Im, E., Riegler, F. M., Pothoulakis, C., & Rhee, S. H. (2012). Elevated lipopolysaccharide in the colon evokes intestinal inflammation, aggravated in immune modulator-impaired mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303(4), G490. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00120.2012>

- Imaoka, A., Matsumoto, S., Setoyama, H., Okada, Y., & Umesaki, Y. (1996). Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. *European Journal of Immunology*, 26(4), 945–948. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260434>
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 21(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I29.8787>
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54 Pt 1(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003>
- Ji, Z., He, L., Regev, A., & Struhl, K. (2019). Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9453–9462. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1821068116/-DCSUPPLEMENTAL>
- Johnson, R. A., Noll, E. C., & Rodney, W. M. (1982). SURVIVAL AFTER A SERUM ETHANOL CONCENTRATION OF 11/2%. *The Lancet*, 320(8312), 1394. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91285-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91285-5)
- Kaakoush, N. O. (2015). Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(NOV), 84. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2015.00084>
- Kabekkodu, S. P., Shukla, V., Varghese, V. K., D'Souza, J., Chakrabarty, S., & Satyamoorthy, K. (2018). Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews*, 93(4), 1955–1986. <https://doi.org/10.1111/BRV.12428>
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., & Núñez, G. (2013, July). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/ni.2608>
- Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 2013 13:5, 13(5), 321–335. <https://doi.org/10.1038/nri3430>
- Kamal, H., Tan, G. C., Ibrahim, S. F., Shaikh, M. F., Mohamed, I. N., Mohamed, R. M. P., ... Kumar, J. (2020). Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay Between Oxidative Stress, Neuroimmune Response and Excitotoxicity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 282. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00282/BIBTEX>
- Kapitan, M., Niemiec, M. J., Steimle, A., Frick, J. S., & Jacobsen, I. D. (2019). Fungi as part of the microbiota and interactions with intestinal Bacteria. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 422, pp. 265–301). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/82_2018_117
- Karin, N. (2010). The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 α) in the regulation of immunity during health and disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(3), 463–473. <https://doi.org/10.1189/JLB.0909602>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death & Differentiation* 2006 13:5, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 461. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00461/BIBTEX>
- Kellum, J. A., Song, M., & Li, J. (2004). Science review: Extracellular acidosis and the immune response: Clinical and physiologic implications. *Critical Care*, 8(5), 331–336. <https://doi.org/10.1186/cc2900>
- Keshavarzian, A., Farhadi, A., Forsyth, C. B., Rangan, J., Jakate, S., Shaikh, M., ... Fields, J. Z. (2009). Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats. *Journal of Hepatology*, 50(3), 538–547. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2008.10.028>
- Kho, Z. Y., & Lal, S. K. (2018). The human gut microbiome - A potential controller of wellness and disease. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1835. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01835/BIBTEX>
- Kim, D., Perteza, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., & Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 14(4), 1–13. <https://doi.org/10.1186/GB-2013-14-4-R36/FIGURES/6>
- Kim, T. H., Jiang, H. H., Youn, Y. S., Park, C. W., Tak, K. K., Lee, S., ... Lee, K. C. (2011). Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity.

- International Journal of Pharmaceutics*, 403(1–2), 285–291. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2010.10.041>
- Kinashi, Y., & Hase, K. (2021). Partners in Leaky Gut Syndrome: Intestinal Dysbiosis and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.673708>
- Koboldt, D. C., Chen, K., Wylie, T., Larson, D. E., McLellan, M. D., Mardis, E. R., ... Ding, L. (2009). VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*, 25(17), 2283–2285. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP373>
- Kosnicki, K. L., Penprase, J. C., Cintora, P., Torres, P. J., Harris, G. L., Brasser, S. M., & Kelley, S. T. (2019). Effects of moderate, voluntary ethanol consumption on the rat and human gut microbiome. *Addiction Biology*, 24(4), 617–630. <https://doi.org/10.1111/ADB.12626>
- Kreisberg, R. A., Owen, W. C., & Siegal, A. M. (1971). Ethanol-induced hyperlactacidemia: inhibition of lactate utilization. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(1), 166–174. <https://doi.org/10.1172/JCI106470>
- Kriss, M., Hazleton, K. Z., Nusbacher, N. M., Martin, C. G., & Lozupone, C. A. (2018). Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. *Current Opinion in Microbiology*, 44, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2018.07.003>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 30(1), 16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Kuptniratsaikul, V., Dajpratham, P., Taechaarpornkul, W., Buntragulpoontawe, M., Lukkanapichonchut, P., Chootip, C., ... Laongpech, S. (2014). Efficacy and safety of Curcuma domestica extracts compared with ibuprofen in patients with knee osteoarthritis: a multicenter study. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 451–458. <https://doi.org/10.2147/CIA.S58535>
- Kye, M. J. eon., Niederst, E. D., Wertz, M. H., Gonçalves, I. do C. G., Akten, B., Dover, K. Z., ... Sahin, M. (2014). SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway. *Human Molecular Genetics*, 23(23), 6318–6331. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU350>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3), 1–10. <https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-3-R25/TABLES/5>
- Lao, C. D., Ruffin IV, M. T., Normolle, D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., ... Brenner, D. E. (2006). Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-10>
- Larochelle, C., Alvarez, J. I., & Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Letters*, 585(23), 3770–3780. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2011.04.066>
- Leatham, M. P., Banerjee, S., Autieri, S. M., Mercado-Lubo, R., Conway, T., & Cohen, P. S. (2009). Precolonized human commensal Escherichia coli strains serve as a barrier to E. coli O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine. *Infection and Immunity*, 77(7), 2876–2886. <https://doi.org/10.1128/IAI.00059-09>
- Leclercq, S., Cani, P. D., Neyrinck, A. M., Stärkel, P., Jamar, F., Mikolajczak, M., ... De Timary, P. (2012). Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(6), 911–918. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2012.04.001>
- Lee, H. M., Kim, T. S., & Jo, E. K. (2016). MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB Reports*, 49(6), 311–318. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2016.49.6.056>
- Lee, J. Y., Lee, J. D., Phipps, S., Noakes, P. G., & Woodruff, T. M. (2015). Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) extends survival in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12974-015-0310-Z/COMMENTS>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Young, P. M., Traini, D., Mason, R. S., & Rohanizadeh, R. (2014). Recent advances in curcumin nanoformulation for cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(8), 1183–1201. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.916686>
- Lewohl, J. M., Nunez, Y. O., Dodd, P. R., Tiwari, G. R., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2011). Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 35(11), 1928–

1937. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2011.01544.X>

- Li, S., Lv, J., Li, J., Zhao, Z., Guo, H., Zhang, Y., ... Li, Z. (2018). Intestinal microbiota impact sepsis associated encephalopathy via the vagus nerve. *Neuroscience Letters*, *662*, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.10.008>
- Lippai, D., Bala, S., Catalano, D., Kody, K., & Szabo, G. (2014). Micro-RNA-155 deficiency prevents alcohol-induced serum endotoxin increase and small bowel inflammation in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *38*(8), 2217–2224. <https://doi.org/10.1111/ACER.12483>
- Lippai, D., Bala, S., Csak, T., Kurt-Jones, E. A., & Szabo, G. (2013). Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. *PLoS One*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0070945>
- Literat, A., Su, F., Norwicki, M., Durand, M., Ramanathan, R., Jones, C. A., ... Kwong, K. Y. (2001). Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease (HMD). *Life Sciences*, *70*(3), 253–267. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01398-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01398-4)
- Liu, J., Johnson, R., Dillon, S., Kroehl, M., Frank, D. N., Tuncil, Y. E., ... Erlandson, K. M. (2019). Among older adults, age-related changes in the stool microbiome differ by HIV-1 serostatus. *EBioMedicine*, *40*, 583–594. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.01.033/ATTACHMENT/0159B876-FC96-4F5C-BEF3-1C5EF18C75AD/MMC1.PDF>
- Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., ... Weiner, H. L. (2016). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host & Microbe*, *19*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2015.12.005>
- Liu, Y., He, X., Li, Y., & Wang, T. (2018). Cerebrospinal fluid CD4+ T lymphocyte-derived miRNA-let-7b can enhance the diagnostic performance of Alzheimer's disease biomarkers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(1), 1144–1150. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.11.122>
- Lobionda, S., Sittipo, P., Kwon, H. Y., & Lee, Y. K. (2019). The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. *Microorganisms*, *7*(8). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7080271>
- Lodygin, D., Odoardi, F., Schläger, C., Körner, H., Kitz, A., Nosov, M., ... Flügel, A. (2013). A combination of fluorescent NFAT and H2B sensors uncovers dynamics of T cell activation in real time during CNS autoimmunity. *Nature Medicine*, *19*(6), 784–790. <https://doi.org/10.1038/NM.3182>
- Lok, K., Zhao, H., Shen, H., Wang, Z., Gao, X., Zhao, W., & Yin, M. (2013). Characterization of the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease in senescence accelerated background. *Neuroscience Letters*, *557 Pt B*(PB), 84–89. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2013.10.051>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2008.01.006>
- Lumayag, S., Haldin, C. E., Corbett, N. J., Wahlin, K. J., Cowan, C., Turturro, S., ... Xu, S. (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(6), E507–E516. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1212655110/-/DCSUPPLEMENTAL/SM02.AVI>
- Lyte, M., Varcoe, J. J., & Bailey, M. T. (1998). Anxiogenic effect of subclinical bacterial infection in mice in the absence of overt immune activation. *Physiology and Behavior*, *65*(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00145-0)
- Ma, J., & Li, H. (2018, September 25). The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01082>
- Ma, L., Ni, Y., Wang, Z., Tu, W., Ni, L., Zhuge, F., ... Fu, Z. (2020). Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice. *Gut Microbes*, *12*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1832857>
- Ma, T. Y., Nguyen, D., Bui, V., Nguyen, H., & Hoa, N. (1999). Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *276*(4 39-4). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1999.276.4.G965/ASSET/IMAGES/LARGE/AGIJ30428010X.JPEG>
- Maccioni, L., Gao, B., Leclercq, S., Pirlot, B., Horsmans, Y., De Timary, P., ... Stärkel, P. (2020). Intestinal permeability, microbial translocation, changes in duodenal and fecal microbiota, and their associations with alcoholic liver disease progression in humans. *Gut Microbes*, *12*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1782157/SUPPL_FILE/KGMI_A_1782157_SM1048.PDF

- MacFarlane, L.-A., & R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537–561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Magalhaes, J. G., Tattoli, I., & Girardin, S. E. (2007). The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in Immunology*, 19(2), 106–115. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2006.12.006>
- Malaguarnera, G., Giordano, M., Nunnari, G., Bertino, G., & Malaguarnera, M. (2014). Gut microbiota in alcoholic liver disease: pathogenetic role and therapeutic perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44), 16639–16648. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I44.16639>
- Maléth, J., Balázs, A., Pallagi, P., Balla, Z., Kui, B., Katona, M., ... Hegyi, P. (2015). Alcohol disrupts levels and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to promote development of pancreatitis. *Gastroenterology*, 148(2), 427–439.e16. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.11.002>
- Mamdani, M., Williamson, V., McMichael, G. O., Blevins, T., Aliev, F., Adkins, A., ... Reilly, M. (2015). Integrating mRNA and miRNA Weighted Gene Co-Expression Networks with eQTLs in the Nucleus Accumens of Subjects with Alcohol Dependence. *PLOS ONE*, 10(9), e0137671. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0137671>
- Manuel, C. R., Latuga, M. S., Ashby, C. R., & Reznik, S. E. (2019). Immune tolerance attenuates gut dysbiosis, dysregulated uterine gene expression and high-fat diet potentiated preterm birth in mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 220(6), 596.e1–596.e28. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2019.02.028>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Martinez, M., Rossetto, I. M. U., Arantes, R. M. S., Lizarte, F. S. N., Tirapelli, L. F., Tirapelli, D. P. C., ... Martinez, F. E. (2019). Serum miRNAs are differentially altered by ethanol and caffeine consumption in rats. *Toxicology Research*, 8(6), 842–849. <https://doi.org/10.1039/C9TX00069K>
- Marutha Ravindran, C. R., & Ticku, M. K. (2005). Role of CpG islands in the up-regulation of NMDA receptor NR2B gene expression following chronic ethanol treatment of cultured cortical neurons of mice. *Neurochemistry International*, 46(4), 313–327. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2004.10.004>
- Mayer, E. A. (2011, August). Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3071>
- Mazzolani, F., & Togni, S. (2013). Oral administration of a curcumin-phospholipid delivery system for the treatment of central serous chorioretinopathy: a 12-month follow-up study. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 7, 939–945. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S45820>
- McClain, C. J., Hill, D. B., Song, Z., Deaciuc, I., & Barve, S. (2002). Monocyte activation in alcoholic liver disease. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 27(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(02\)00212-4](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(02)00212-4)
- McElfresh, K. C., & McDonald, J. F. (1983). The effect of alcohol stress on nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) levels in *Drosophila*. *Biochemical Genetics*, 21(3–4), 365–374. <https://doi.org/10.1007/BF00499145>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997 388:6640, 388(6640), 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Mehdi, S. (2010, December 1). Antibiotic-induced psychosis: A link to d-alanine? *Medical Hypotheses*. Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.07.021>
- Melnyk, T., Đorđević, S., Conejos-Sánchez, I., & Vicent, M. J. (2020). Therapeutic potential of polypeptide-based conjugates: Rational design and analytical tools that can boost clinical translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 160, 136–169. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.10.007>
- Mercadante, A. A., & Tadi, P. (2021). Neuroanatomy, Gray Matter. *StatPearls*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553239/>
- Meroni, M., Longo, M., & Dongiovanni, P. (2019). Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS20184568>
- Miranda, R. C. (2014). MicroRNAs and ethanol toxicity. *International Review of Neurobiology*, 115, 245–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801311-3.00007-X>
- Miyake, K. (2007). Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 19(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2006.12.002>

- Mocin, S., Vaghari-Tabari, M., Qujeq, D., Majidinia, M., Nabavi, S. M., & Yousefi, B. (2019). MiRNAs and inflammatory bowel disease: An interesting new story. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 3277–3293. <https://doi.org/10.1002/JCP.27173>
- Mohanty, C., & Sahoo, S. K. (2010). The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials*, 31(25), 6597–6611. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.04.062>
- Montesinos, J., Alfonso-Loeches, S., & Guerri, C. (2016). Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 40(11), 2260–2270. <https://doi.org/10.1111/ACER.13208>
- Montesinos, J., Gil, A., & Guerri, C. (2017). Nalmefene Prevents Alcohol-Induced Neuroinflammation and Alcohol Drinking Preference in Adolescent Female Mice: Role of TLR4. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 41(7), 1257–1270. <https://doi.org/10.1111/ACER.13416>
- Moos, W. H., Faller, D. V., Harpp, D. N., Kanara, I., Pernokas, J., Powers, W. R., & Steliou, K. (2016, May 1). Microbiota and Neurological Disorders: A Gut Feeling. *BioResearch Open Access*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/biores.2016.0010>
- Most, D., Salem, N. A., Tiwari, G. R., Blednov, Y. A., Mayfield, R. D., & Harris, R. A. (2019). Silencing Synaptic MicroRNA-411 Reduces Voluntary Alcohol Consumption in Mice. *Addiction Biology*, 24(4), 604. <https://doi.org/10.1111/ADB.12625>
- Mutlu, E. A., Gillevet, P. M., Rangwala, H., Sikaroodi, M., Naqvi, A., Engen, P. A., ... Keshavarzian, A. (2012). Colonic microbiome is altered in alcoholism. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(9). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00380.2011>
- Nair, K. L., Thulasidasan, A. K. T., Deepa, G., Anto, R. J., & Kumar, G. S. V. (2012). Purely aqueous PLGA nanoparticulate formulations of curcumin exhibit enhanced anticancer activity with dependence on the combination of the carrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 425(1–2), 44–52. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2012.01.003>
- Narayan, A., Bommakanti, A., & Patel, A. A. (2015). High-throughput RNA profiling via up-front sample parallelization. *Nature Methods*, 12(4), 343–346. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3311>
- Ni, W. J., & Leng, X. M. (2015). Dynamic miRNA–mRNA paradigms: New faces of miRNAs. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4, 337–341. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2015.10.011>
- Nichols, R. G., & Davenport, E. R. (2020). The relationship between the gut microbiome and host gene expression: a review. *Human Genetics*, 140(5), 747–760. <https://doi.org/10.1007/S00439-020-02237-0>
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012, June 8). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Nikolich-Zugich, J. (2018). The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nature Immunology*, 19(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/S41590-017-0006-X>
- Nkamga, V. D., Henrissat, B., & Drancourt, M. (2017, March 1). Archaea: Essential inhabitants of the human digestive microbiota. *Human Microbiome Journal*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2016.11.005>
- Nunez, Y. O., & Mayfield, R. D. (2012). Understanding alcoholism through microRNA signatures in brains of human alcoholics. *Frontiers in Genetics*, 3(APR), 43. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2012.00043/BIBTEX>
- Nunez, Y. O., Truitt, J. M., Gorini, G., Ponomareva, O. N., Blednov, Y. A., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2013). Positively correlated miRNA–mRNA regulatory networks in mouse frontal cortex during early stages of alcohol dependence. *BMC Genomics*, 14(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-725/FIGURES/7>
- Orang, A. V., Safaralizadeh, R., & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *International Journal of Genomics*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/970607>
- Ortega-Ramírez, A., Vega, R., & Soto, E. (2017). Acid-Sensing Ion Channels as Potential Therapeutic Targets in Neurodegeneration and Neuroinflammation. *Mediators of Inflammation*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3728096>
- Osterndorff-Kahanek, E. A., Tiwari, G. R., Lopez, M. F., Becker, H. C., Adron Harris, R., & Dayne Mayfield, R. (2018). Long-term ethanol exposure: Temporal pattern of microRNA expression and associated mRNA gene networks in mouse brain. *PLOS ONE*, 13(1), e0190841. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190841>

- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, *5*(7), 1556–1573. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Panahi, Y., Alishiri, G. H., Parvin, S., & Sahebkar, A. (2016). Mitigation of Systemic Oxidative Stress by Curcuminoids in Osteoarthritis: Results of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Dietary Supplements*, *13*(2), 209–220. <https://doi.org/10.3109/19390211.2015.1008611>
- Panahi, Y., Hosseini, M. S., Khalili, N., Naimi, E., Simental-Mendía, L. E., Majeed, M., & Sahebkar, A. (2016). Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *82*, 578–582. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.05.037>
- Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental & Molecular Medicine* *2013 45:12*, *45*(12), e66–e66. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C. M., & Rodriguez-Palacios, A. (2020). The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in Immunology*, *11*, 906. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00906/BIBTEX>
- Parlesak, A., Schäfer, C., Schütz, T., Bode, J. C., & Bode, C. (2000). Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *Journal of Hepatology*, *32*(5), 742–747. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80242-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80242-1)
- Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., ... Gazzaruso, C. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine* *2018 61:3*, *61*(3), 357–371. <https://doi.org/10.1007/S12020-018-1605-5>
- Pascual-Lucas, M., Fernandez-Lizarbe, S., Montesinos, J., & Guerri, C. (2014). LPS or ethanol triggers clathrin- and rafts/caveolae-dependent endocytosis of TLR4 in cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *129*(3), 448–462. <https://doi.org/10.1111/JNC.12639>
- Pascual, Maria, Blanco, A. M., Cauli, O., Miñarro, J., & Guerri, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *The European Journal of Neuroscience*, *25*(2), 541–550. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2006.05298.X>
- Pascual, María, Calvo-Rodríguez, M., Núñez, L., Villalobos, C., Ureña, J., & Guerri, C. (2021). Toll-like receptors in neuroinflammation, neurodegeneration, and alcohol-induced brain damage. *IUBMB Life*, *73*(7), 900–915. <https://doi.org/10.1002/IUB.2510>
- Patel, S., Behara, R., Swanson, G. R., Forsyth, C. B., Voigt, R. M., & Keshavarzian, A. (2015). Alcohol and the Intestine. *Biomolecules* *2015, Vol. 5, Pages 2573-2588*, *5*(4), 2573–2588. <https://doi.org/10.3390/BIOM5042573>
- Pavlov, I. P., & Thompson, W. H. (1902). *The work of the digestive glands : lectures by Professor J. P. Pawlow / tr. into English by W. H. Thompson. The work of the digestive glands : lectures by Professor J. P. Pawlow / tr. into English by W. H. Thompson.* London : C. Griffin,. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.3784>
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2008). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact | 978-0-12-374244-5 | Elsevier. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 827–828. Retrieved from https://books.google.com/books/about/The_Mouse_Brain_in_Stereotaxic_Coordinat.html?hl=es&id=EHy1QN1xv0gC
- Peck, B. C. E., Mah, A. T., Pitman, W. A., Ding, S., Lund, P. K., & Sethupathy, P. (2017). Functional Transcriptomics in Diverse Intestinal Epithelial Cell Types Reveals Robust MicroRNA Sensitivity in Intestinal Stem Cells to Microbial Status. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(7), 2586–2600. <https://doi.org/10.1074/JBC.M116.770099>
- Perlmuter, L. S., Scott, S. A., Barrón, E., & Chui, H. C. (1992). MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions. *Journal of Neuroscience Research*, *33*(4), 549–558. <https://doi.org/10.1002/JNR.490330407>
- Peruzzotti-Jametti, L., Willis, C. M., Hamel, R., Krzak, G., & Pluchino, S. (2021). Metabolic Control of Smoldering Neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, *12*, 2340. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.705920/BIBTEX>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), E45. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45>
- Pla, A., Pascual, M., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (2014). TLR4 mediates the impairment of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways induced by ethanol treatment in brain. *Cell Death & Disease* *2014 5:2*, *5*(2), e1066–e1066. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.46>

- Ponomarev, I., Wang, S., Zhang, L., Adron Harris, R., & Dayne Mayfield, R. (2012). Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(5), 1884–1897. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3136-11.2012>
- Price, L. C., & Buescher, R. W. (1997). Kinetics of Alkaline Degradation of the Food Pigments Curcumin and Curcuminoids. *Journal of Food Science*, 62(2), 267–269. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1997.TB03982.X>
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(12), 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES191220091>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., ... Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/NATURE08821>
- Quinn, S. R., & O'Neill, L. A. (2011). A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *International Immunology*, 23(7), 421–425. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/DXR034>
- Rajput, S., Volk-Draper, L. D., & Ran, S. (2013). TLR4 is a novel determinant of the response to paclitaxel in breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1019>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.07.002>
- Ramakrishna, B. S. (2007). The Normal Bacterial Flora of the Human Intestine and Its Regulation. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 41(Supplement 1), S2–S6. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31802fba68>
- Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V. L., & Cohen, H. (2020). Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 731. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.572912/BIBTEX>
- Rao, M., & Gershon, M. D. (2016, September 1). The bowel and beyond: The enteric nervous system in neurological disorders. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.107>
- Reddy, R. C., Vatsala, P. G., Keshamouni, V. G., Padmanaban, G., & Rangarajan, P. N. (2005). Curcumin for malaria therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 326(2), 472–474. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2004.11.051>
- Rehli, M. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology*, 23(8), 375–378. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02259-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02259-7)
- Reigstad, C. S., Salmonson, C. E., Rainey, J. F., Szurszewski, J. H., Linden, D. R., Sonnenburg, J. L., ... Kashyap, P. C. (2015). Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *FASEB Journal*, 29(4), 1395–1403. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259598>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelli, A. E., Bettlinger, J. C., Rougvie, A. E., ... Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
- Requejo-Aguilar, R., Alastrue-Agudo, A., Cases-Villar, M., Lopez-Mocholi, E., England, R., Vicent, M. J., & Moreno-Manzano, V. (2017). Combined polymer-curcumin conjugate and ependymal progenitor/stem cell treatment enhances spinal cord injury functional recovery. *Biomaterials*, 113, 18–30. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.10.032>
- Resta-Lenert, S., & Barrett, K. E. (2003). Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52(7), 988–997. <https://doi.org/10.1136/GUT.52.7.988>
- Réu, P., Khosravi, A., Bernard, S., Mold, J. E., Salehpour, M., Alkass, K., ... Frisén, J. (2017). The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Reports*, 20(4), 779–784. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2017.07.004>
- Riccio, P., & Rossano, R. (2020). The human gut microbiota is neither an organ nor a commensal. *FEBS Letters*, 594(20), 3262–3271. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13946>
- Rigottier-Gois, L. (2013). Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *The ISME Journal* 2013 7:7, 7(7), 1256–1261. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.80>

- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggianno, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Roberts, G. P., Larraufie, P., Richards, P., Kay, R. G., Galvin, S. G., Miedzybrodzka, E. L., ... Gribble, F. M. (2019). Comparison of human and murine enteroendocrine cells by transcriptomic and peptidomic profiling. In *Diabetes* (Vol. 68, pp. 1062–1072). American Diabetes Association Inc. <https://doi.org/10.2337/db18-0883>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP616>
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3), 1–9. <https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-3-R25/FIGURES/3>
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Garrido-Mesa, J., Vezza, T., Utrilla, M. P., Chueca, N., ... Gálvez, J. (2017). Differential intestinal anti-inflammatory effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* in DSS mouse colitis: impact on microRNAs expression and microbiota composition. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(11), 1700144. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201700144>
- Rodriguez-Otormin, F., Duro-Castano, A., Conejos-Sánchez, I., & Vicent, M. J. (2019). Envisioning the future of polymer therapeutics for brain disorders. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(1), e1532. <https://doi.org/10.1002/WNAN.1532>
- Ron, D., & Barak, S. (2016). Molecular mechanisms underlying alcohol-drinking behaviours. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(9), 576–591. <https://doi.org/10.1038/NRN.2016.85>
- Rossetto, I. M. U., Cagnon, V. H. A., Lizarte, F. S. N., Tirapelli, L. F., Tirapelli, D. P. C., Arantes, R. M. S., ... Martinez, M. (2019). Ethanol and caffeine consumption modulates the expression of miRNAs in the cerebellum and plasma of UChB rats. *Life Sciences*, 229, 180–186. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.05.016>
- Rustenhoven, J., Drieu, A., Mamuladze, T., de Lima, K. A., Dykstra, T., Wall, M., ... Kipnis, J. (2021). Functional characterization of the dural sinuses as a neuroimmune interface. *Cell*, 184(4), 1000-1016.e27. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.12.040>
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12(9), 880–886. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2006.01461.X>
- Sahebkar, A. (2014). Are Curcuminoids Effective C-Reactive Protein-Lowering Agents in Clinical Practice? Evidence from a Meta-Analysis. *Phytotherapy Research*, 28(5), 633–642. <https://doi.org/10.1002/PTR.5045>
- Sahebkar, A., Serban, M. C., Ursoniu, S., & Banach, M. (2015). Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Functional Foods*, 18, 898–909. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.01.005>
- Said, H. M. (2011, August 1). Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochemical Journal*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1042/BJ20110326>
- Sakharkar, A. J., Zhang, H., Tang, L., Shi, G., & Pandey, S. C. (2012). Histone deacetylases (HDAC)-induced histone modifications in the amygdala: a role in rapid tolerance to the anxiolytic effects of ethanol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 36(1), 61–71. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2011.01581.X>
- Salami, M. (2021). Interplay of Good Bacteria and Central Nervous System: Cognitive Aspects and Mechanistic Considerations. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.613120>
- Salguero, M., Al-Obaide, M., Singh, R., Siepmann, T., & Vasylyeva, T. (2019). Dysbiosis of Gram-negative gut microbiota and the associated serum lipopolysaccharide exacerbates inflammation in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(5). <https://doi.org/10.3892/ETM.2019.7943>
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., ... Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(S1), S147–S171. <https://doi.org/10.1079/bjn19980108>
- Sampson, H. W., Chaput, C. D., Brannen, J., Probe, R. A., Guleria, R. S., Pan, J., ... van Buren, V. (2011). Alcohol induced epigenetic perturbations during the inflammatory stage of fracture healing: <https://doi.org/10.1258/Ebm.2011.011207>, 236(12), 1389–1401. <https://doi.org/10.1258/EBM.2011.011207>

- Sánchez-Alcoholado, L., Ramos-Molina, B., Otero, A., Laborda-Illanes, A., Ordóñez, R., Medina, J. A., ... Queipo-Ortuño, M. I. (2020, June 1). The role of the gut microbiome in colorectal cancer development and therapy response. *Cancers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12061406>
- Sarkar, A., De, R., & Mukhopadhyay, A. K. (2016). Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(9), 2736–2748. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i9.2736>
- Sathyan, P., Golden, H. B., & Miranda, R. C. (2007). Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(32), 8546–8557. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1269-07.2007>
- Scarpellini, E., Ianiro, G., Attili, F., Bassanelli, C., De Santis, A., & Gasbarrini, A. (2015). The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*, *47*(12), 1007–1012. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.008>
- Schippa, S., & Conte, M. P. (2014). Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health. *Nutrients*, *6*(12), 5786. <https://doi.org/10.3390/NU6125786>
- Schisterman, E. F., & Vexler, A. (2008). To pool or not to pool, from whether to when: applications of pooling to biospecimens subject to a limit of detection. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, *22*(5), 486–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2008.00956.x>
- Schnoor, M. (2015). E-cadherin Is Important for the Maintenance of Intestinal Epithelial Homeostasis Under Basal and Inflammatory Conditions. *Digestive Diseases and Sciences*, *60*(4), 816–818. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3622-z>
- Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., Van den Heuvel, E. G. H. M., & Schrezenmeir, J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 73). American Society for Nutrition. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.459s>
- Schroeder, B. O., Birchenough, G. M. H., Pradhan, M., Nyström, E. E. L., Henricsson, M., Hansson, G. C., & Bäckhed, F. (2020). Obesity-associated microbiota contributes to mucus layer defects in genetically obese mice. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(46), 15712–15726. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015771/ATTACHMENT/9C5705C4-7C46-4C3B-9CA7-4756EB897025/MMC1.PDF>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, *14*(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Seo, B., Jeon, K., Moon, S., Lee, K., Kim, W. K., Jeong, H., ... Ko, G. P. (2020). Roseburia spp. Abundance Associates with Alcohol Consumption in Humans and Its Administration Ameliorates Alcoholic Fatty Liver in Mice. *Cell Host and Microbe*, *27*(1), 25–40.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.11.001/ATTACHMENT/2BABF153-70CA-4BA7-999F-C7EE41F8B6F1/MMC5.XLSX>
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, *41*(13), 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Shehzad, A., Rehman, G., & Lee, Y. S. (2013). Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors*, *39*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1002/BIOF.1066>
- Shen, Y., Qin, H., Chen, J., Mou, L., He, Y., Yan, Y., ... Zhou, Y. D. (2016). Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons. *The Journal of Cell Biology*, *215*(5), 719–734. <https://doi.org/10.1083/JCB.201605046>
- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Singh, J. C. I., Cruickshank, S. M., Newton, D. J., Wakenshaw, L., Graham, A., Lan, J., ... Carding, S. R. (2005). Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *288*(3). <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00377.2004>
- Singh, N., Shirdel, E. A., Waldron, L., Zhang, R. H., Jurisica, I., & Comelli, E. M. (2011). The murine caecal microRNA signature depends on the presence of the endogenous microbiota. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(2), 171–186. <https://doi.org/10.7150/IJBS.8.171>
- Smith, K., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2007, April 1). Use of axenic animals in studying the adaptation of

- mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in Immunology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.10.002>
- Smith, S. M., & Vale, W. W. (2006). *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress*. *Dialogues Clin Neurosci* (Vol. 8). Retrieved from www.dialogues-cns.org
- Sternini, C., Anselmi, L., & Rozengurt, E. (2008, February). Enteroendocrine cells: A site of “taste” in gastrointestinal chemosensing. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f43a73>
- Stewart, D. C., Berrie, D., Li, J., Liu, X., Rickerson, C., Mkoji, D., ... Simmons, C. S. (2018). Quantitative assessment of intestinal stiffness and associations with fibrosis in human inflammatory bowel disease. *PLOS ONE*, *13*(7), e0200377. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0200377>
- Strandberg, K., Sedvall, G., Midtvedt, T., & Gustafsson, B. (1966). Effect of Some Biologically Active Amines on the Cecum Wall of Germfree Rats. *Experimental Biology and Medicine*, *121*(3), 699–702. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30864>
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., & Doré, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(11), 4799–4807. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.11.4799-4807.1999>
- Sudo, N. (2016). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Gut Microbiota: A Target for Dietary Intervention? In *The Gut-Brain Axis Dietary, Probiotic, and Prebiotic Interventions on the Microbiota* (pp. 293–304). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802304-4.00013-X>
- Sudo, Nobuyuki, Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X. N., ... Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *Journal of Physiology*, *558*(1), 263–275. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>
- Szabo, G., Dolganiuc, A., Dai, Q., & Pruett, S. B. (2007). TLR4, Ethanol, and Lipid Rafts: A New Mechanism of Ethanol Action with Implications for other Receptor-Mediated Effects. *The Journal of Immunology*, *178*(3), 1243–1249. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.3.1243>
- Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E., & Testa, J. R. (1996). Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*, *32*(3), 486–488. <https://doi.org/10.1006/GENO.1996.0150>
- Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P., & Colombel, J. F. (2004, January). Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gut.53.1.1>
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological Reviews*, *249*(1), 158–175. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2012.01146.X>
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., ... Leclerc, M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, *11*(10), 2574–2584. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.01982.X>
- Tapocik, J. D., Solomon, M., Flanigan, M., Meinhardt, M., Barbier, E., Schank, J. R., ... Heilig, M. (2012). Coordinated dysregulation of mRNAs and microRNAs in the rat medial prefrontal cortex following a history of alcohol dependence. *The Pharmacogenomics Journal* *2013* *13*:3, *13*(3), 286–296. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.17>
- Tayyem, R. F., Heath, D. D., Al-Delaimy, W. K., & Rock, C. L. (2006). Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutrition and Cancer*, *55*(2), 126–131. https://doi.org/10.1207/S15327914NC5502_2
- Teng, G. gen, Wang, W. hong, Dai, Y., Wang, S. jun, Chu, Y. xiang, & Li, J. (2013). Let-7b is involved in the inflammation and immune responses associated with Helicobacter pylori infection by targeting Toll-like receptor 4. *PloS One*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0056709>
- Theodorakis, P. E., Müller, E. A., Craster, R. V., & Matar, O. K. (2017). Physical insights into the blood-brain barrier translocation mechanisms. *Physical Biology*, *14*(4). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/AA708A>
- Thevaranjan, N., Puchta, A., Schulz, C., Naidoo, A., Szamosi, J. C., Verschoor, C. P., ... Bowdish, D. M. E. (2017). Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host & Microbe*, *21*(4), 455. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2017.03.002>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, *474*(11), 1823.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>

- Tian, R., Wang, R. L., Xie, H., Jin, W., & Yu, K. L. (2013). Overexpressed miRNA-155 dysregulates intestinal epithelial apical junctional complex in severe acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(45), 8282–8291. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i45.8282>
- Tian, X., Leite, D. M., Scarpa, E., Nyberg, S., Fullstone, G., Forth, J., ... Battaglia, G. (2020). On the shuttling across the blood-brain barrier via tubule formation: Mechanism and cargo avidity bias. *Science Advances*, *6*(48). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABC4397>
- Tien, M.-T., Girardin, S. E., Regnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, M.-A., Coppée, J.-Y., ... Pédrón, T. (2006). Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *176*(2), 1228–1237. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.2.1228>
- Tillisch, K. (2014). The effects of gut microbiota on CNS function in humans. *Gut Microbes*, *5*(3), 404–410. <https://doi.org/10.4161/GMIC.29232>
- Tomren, M. A., Måsson, M., Loftsson, T., & Tønnesen, H. H. (2007). Studies on curcumin and curcuminoids XXXI. Symmetric and asymmetric curcuminoids: stability, activity and complexation with cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, *338*(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2007.01.013>
- Tønnesen, H. H., Måsson, M., & Loftsson, T. (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics*, *244*(1–2), 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00323-X)
- Trujillo, J., Chirino, Y. I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A. C., Tapia, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2013). Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology*, *1*(1), 448–456. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2013.09.003>
- Tsai, Y. M., Chien, C. F., Lin, L. C., & Tsai, T. H. (2011). Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, *416*(1), 331–338. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2011.06.030>
- Tsuruya, A., Kuwahara, A., Saito, Y., Yamaguchi, H., Tsubo, T., Suga, S., ... Nakayama, T. (2016). Ecophysiological consequences of alcoholism on human gut microbiota: implications for ethanol-related pathogenesis of colon cancer. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/SREP27923>
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, *3*(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2008.02.015>
- Ubhi, K., Rockenstein, E., Kragh, C., Inglis, C., Spencer, B., Michael, S., ... Masliah, E. (2014). Widespread microRNA dysregulation in multiple system atrophy - disease-related alteration in miR-96. *The European Journal of Neuroscience*, *39*(6), 1026–1041. <https://doi.org/10.1111/EJN.12444>
- Ureña-Peralta, J. R., Alfonso-Loeches, S., Cuesta-Diaz, C. M., García-García, F., & Guerri, C. (2018). Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-34277-Y>
- Ureña-Peralta, Juan R., Pérez-Moraga, R., García-García, F., & Guerri, C. (2020). Lack of TLR4 modifies the miRNAs profile and attenuates inflammatory signaling pathways. *PloS One*, *15*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0237066>
- Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., & Hooper, L. V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(52), 20858–20863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808723105>
- van Steenwyk, G., Janeczek, P., & Lewohl, J. M. (2013). Differential Effects of Chronic and Chronic-Intermittent Ethanol Treatment and Its Withdrawal on the Expression of miRNAs. *Brain Sciences*, *3*(2), 744–756. <https://doi.org/10.3390/BRAINS3020744>
- Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Frontiers in Immunology*, *5*(JUL). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00316>
- Vilpoux, C., Warnault, V., Pierrefiche, O., Daoust, M., & Naassila, M. (2009). Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *33*(6), 945–969. <https://doi.org/10.1111/J.1530-0277.2009.00916.X>
- Wahlström, B., & Blennow, G. (1978). A Study on the Fate of Curcumin in the Rat. *Acta Pharmacologica et*

- Wang, G., Liu, Q., Guo, L., Zeng, H., Ding, C., Zhang, W., ... Pan, J. (2018). Gut microbiota and relevant metabolites analysis in alcohol dependent mice. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1874. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01874/BIBTEX>
- Wang, Q., Sun, A. Y., Simonyi, A., Jensen, M. D., Shelat, P. B., Rottinghaus, G. E., ... Sun, G. Y. (2005). Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *Journal of Neuroscience Research*, 82(1), 138–148. <https://doi.org/10.1002/JNR.20610>
- Wang, S., Su, R., Nie, S., Sun, M., Zhang, J., Wu, D., & Moustaid-Moussa, N. (2014). Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(4), 363–376. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2013.10.002>
- Wang, X., & Quinn, P. J. (2010). Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Sub-Cellular Biochemistry*, 53, 3–25. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_1
- Wendlandt, E. B., Graff, J. W., Gioannini, T. L., McCaffrey, A. P., & Wilson, M. E. (2012). The role of microRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF- κ B activation. *Innate Immunity*, 18(6), 846–855. <https://doi.org/10.1177/1753425912443903>
- Wesener, D. A., Wangkanont, K., McBride, R., Song, X., Kraft, M. B., Hodges, H. L., ... Kiessling, L. L. (2015). Recognition of microbial glycans by human intelectin-1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(8), 603–610. <https://doi.org/10.1038/NSMB.3053>
- Wright, L., Frye, J., Gorti, B., Timmermann, B., & Funk, J. (2013). Bioactivity of turmeric-derived curcuminoids and related metabolites in breast cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6218–6225. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340013>
- Wu, H. J., & Wu, E. (2012). The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, 3(1). <https://doi.org/10.4161/GMIC.19320>
- Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., ... He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*, 29(15), 2302–2308. <https://doi.org/10.1038/ONC.2010.34>
- Xia, Y., Chen, Y., Wang, G., Yang, Y., Song, X., Xiong, Z., ... Ai, L. (2020). *Lactobacillus plantarum* AR113 alleviates DSS-induced colitis by regulating the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway and gut microbiota composition. *Journal of Functional Foods*, 67, 103854. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103854>
- Xiao, L., Chen, B., Feng, D., Yang, T., Li, T., & Chen, J. (2019). TLR4 may be involved in the regulation of colonic mucosal microbiota by Vitamin A. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 268. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00268/BIBTEX>
- Xie, X., Tao, Q., Zou, Y., Zhang, F., Guo, M., Wang, Y., ... Yu, S. (2011). PLGA nanoparticles improve the oral bioavailability of curcumin in rats: characterizations and mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9280–9289. <https://doi.org/10.1021/JF202135J>
- Xie, Y., Chu, A., Feng, Y., Chen, L., Shao, Y., Luo, Q., ... Chen, Y. (2018). MicroRNA-146a: A Comprehensive Indicator of Inflammation and Oxidative Stress Status Induced in the Brain of Chronic T2DM Rats. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00478>
- Xu, C., Zhu, H., & Qiu, P. (2019). Aging progression of human gut microbiota. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12866-019-1616-2/FIGURES/4>
- Yadav, M., Verma, M. K., & Chauhan, N. S. (2018). A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition. *Archives of Microbiology*, 200(2), 203–217. <https://doi.org/10.1007/S00203-017-1459-X>
- Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2012). Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug Discovery Today*, 17(1–2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2011.09.009>
- Yamakura, T., Lewohl, J. M., & Harris, R. A. (2001). Differential effects of general anesthetics on G protein-coupled inwardly rectifying and other potassium channels. *Anesthesiology*, 95(1), 144–153. <https://doi.org/10.1097/00000542-200107000-00025>
- Yan, A. W., Fouts, D. E., Brandl, J., Stärkel, P., Torralba, M., Schott, E., ... Schnabl, B. (2011). Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 53(1), 96–105. <https://doi.org/10.1002/HEP.24018>
- Yang, X., Gao, X. C., Liu, J., & Ren, H. Y. (2017). Effect of EPEC endotoxin and bifidobacteria on intestinal barrier function through modulation of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in intestinal epithelial

- cell-18. *World Journal of Gastroenterology*, 23(26), 4744–4751. <https://doi.org/10.3748/WJG.V23.I26.4744>
- Yao, L., Kan, E. M., Lu, J., Hao, A., Dheen, S. T., Kaur, C., & Ling, E. A. (2013). Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: Role of TLR4 in hypoxic microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-23/FIGURES/12>
- Ye, E. A., & Steinle, J. J. (2016). miR-146a Attenuates Inflammatory Pathways Mediated by TLR4/NF- κ B and TNF α to Protect Primary Human Retinal Microvascular Endothelial Cells Grown in High Glucose. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3958453>
- Ye, L., Mueller, O., Bagwell, J., Bagnat, M., Liddle, R. A., & Rawls, J. F. (2019). High fat diet induces microbiota-dependent silencing of enteroendocrine cells. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.48479>
- Yin, H., Guo, Q., Li, X., Tang, T., Li, C., Wang, H., ... Peng, J. (2018). Curcumin Suppresses IL-1 β Secretion and Prevents Inflammation through Inhibition of the NLRP3 Inflammasome. *The Journal of Immunology*, 200(8), 2835–2846. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1701495/-DCSUPPLEMENTAL>
- Ying, W., Jing, T., Bing, C., Baifang, W., Dai, Z., & Bingyuan, W. (2014). Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Molecular Medicine Reports*, 9(6), 2352–2356. <https://doi.org/10.3892/MMR.2014.2126/HTML>
- Yu, H., Wang, C., Wang, X., Wang, H., Zhang, C., You, J., ... Zhang, G. (2017). Long-term exposure to ethanol downregulates tight junction proteins through the protein kinase C α signaling pathway in human cerebral microvascular endothelial cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), 4789–4796. <https://doi.org/10.3892/ETM.2017.5180/HTML>
- Yu, L., Wang, L., & Chen, S. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2592–2603. <https://doi.org/10.1111/J.1582-4934.2010.01127.X>
- Yu, Y., Yang, W., Li, Y., & Cong, Y. (2020). Enteroendocrine Cells: Sensing Gut Microbiota and Regulating Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(1), 11–20. <https://doi.org/10.1093/ibd/izz217>
- Yuan, C., Burns, M. B., Subramanian, S., & Blekhman, R. (2018). Interaction between Host MicroRNAs and the Gut Microbiota in Colorectal Cancer. *MSystems*, 3(3). https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00205-17/SUPPL_FILE/SYS003182230SF6.PDF
- Zhao, Y. xin, Sun, Y. yin, Huang, A. ling, Li, X. feng, Huang, C., Ma, T. tao, & Li, J. (2018). MicroRNA-200a induces apoptosis by targeting ZEB2 in alcoholic liver disease. *Cell Cycle*, 17(2), 250. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1417708>
- Zheng, C., Chen, J., Chu, F., Zhu, J., & Jin, T. (2020). Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 314. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00314/BIBTEX>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research* 2020 30:6, 30(6), 492–506. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0332-7>
- Zhou, G., Lu, Y., Zhang, H., Chen, Y., Yu, Y., Gao, J., ... Zhong, Y. (2013). A novel pulsed drug-delivery system: polyelectrolyte layer-by-layer coating of chitosan-alginate microgels. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 877–887. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38144>
- Zhu, H. tao, Bian, C., Yuan, J. chao, Chu, W. hua, Xiang, X., Chen, F., ... Lin, J. kai. (2014). Curcumin attenuates acute inflammatory injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 11. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-59>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., ... Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3731, 25(16), 3731. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25163731>
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Viaud, S., Vétizou, M., Daillère, R., Merad, M., & Kroemer, G. (2015). Cancer and the gut microbiota: An unexpected link. *Science Translational Medicine*, 7(271), 271ps1. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010473>