

CUANTIFICACIÓN DE MIRNAS ANTIINFLAMATORIOS EN MICROGLIAS Y ASTROCITOS PURIFICADOS, Y SU CONTRASTE CON EL ESTADO HEPÁTICO EN RATONES QUE CONSUMIERON ALCOHOL DE FORMA VOLUNTARIA Y CRÓNICA

Belén Herreros Richard^{a*}

Luis Sepúlveda Mansilla^a

Ignacio Montenegro Silva^a

Jesús Carine Leiva^a

Pablo Berrios Cárcamo^b

^aEstudiante de Tecnología Médica, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

^bInvestigador Tutor del ICIM, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 09 de julio, 2023. Aceptado en versión corregida el 18 de diciembre, 2023.

RESUMEN

Introducción: El alcohol es una sustancia psicoactiva que afecta al hígado y al cerebro. El alcohol se metaboliza en sustancias tóxicas y radicales libres que dañan los tejidos hepáticos y pueden causar hepatitis alcohólica y cirrosis hepática. El alcohol también produce inflamación en el cerebro, que implica la activación de las células gliales y la liberación de sustancias que causan daño cerebral. Los microRNA son moléculas pequeñas que regulan la expresión génica y pueden tener efectos antiinflamatorios o proinflamatorios. **Objetivo:** En este estudio se midieron los niveles de varios microRNA en ratones que consumían o no alcohol, y se confirmó el consumo de alcohol y el daño hepático con pruebas de sangre y tejido. **Metodología:** Se extrajo parte del estriado e hipocampo de cada ratón, y en ambas áreas se purificaron astrocitos y microglías. La medición de los niveles de miRNAs se realizó a través de qPCR. **Resultado:** Desafortunadamente, no se encontraron diferencias significativas.

Palabras clave: Astrocitos, Microglía, Ratones, Reacción en cadena de la polimerasa, Alcoholismo.

INTRODUCCIÓN

El alcoholismo es un problema de salud pública en Chile, responsable de más de 7600 muertes al año¹. El consumo excesivo de alcohol genera una respuesta inflamatoria en el hígado que puede conllevar a una esteatosis hepática alcohólica y posteriormente a una cirrosis hepática. Además, el consumo excesivo de alcohol produce mediadores inflamatorios en el cerebro, activando vías de señalización asociadas a la neuroinflamación^{2,3}.

La neuroinflamación es particularmente perjudicial debido a que las células gliales son más sensibles a estímulos inflamatorios que otros tejidos, y su activación conduce a daño cerebral y neurodegeneración^{5,6}. La neuroinflamación es una de las causas principales en la patogénesis de muchos trastornos del SNC⁶ y también se ha observado su participación en adicciones, como a la cocaína² y opioides³. Se ha comprobado que daños producidos en órganos periféricos pueden participar en el desarrollo de patologías cerebrales⁴.

El hígado y el cerebro se comunican estrechamente^{5,6} y el alcoholismo puede alterar sus funciones. El alcohol también interfiere con los mecanismos de reparación celular⁷ y favorece la muerte celular por autofagia y apoptosis^{8,9}.

Los miRNAs son moléculas que regulan la expresión génica^{10,11} y son importantes en diversos procesos cerebrales^{12,13}. Los miRNAs se alteran en diversas patologías del SNC¹⁴ y se liberan por la microglía activada¹⁵. La microglía puede adoptar un fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio¹⁶ y el miR-

125a-5p modula este proceso¹⁷.

Además, según Aziguli K. et al. que investiga el papel de miR-125a-5p en la neuropatía periférica diabética (NPD) en ratones con diabetes tipo 2, observó que, el miR-125a-5p se expresa en vesículas extracelulares derivadas de astrocitos y podría reprimir la activación astrocítica y la inflamación mediante la inhibición de la vía de señalización del factor de asociación de receptor TNF 6 y c-Jun N-terminal (TRAF6/JNK) en ratones diabéticos. Sin embargo, no hay estudios que indiquen que tenga el mismo efecto en el sistema nervioso central o en situación de consumo de alcohol crónico¹⁸.

Curiosamente, la expresión de miR-125b-5p, que tiene la misma secuencia central que miR-125a-5p, está modulada por la señalización de NF- κ B mediada por mTOR¹⁹. miR-125b-5p se une a la región 3'UTR del gen TNF- β para regular negativamente la respuesta inflamatoria²⁰. Los niveles de expresión de miR-125b-5p están regulados negativamente por la activación de Akt1 inducida por LPS²¹.

Otros datos recientes han demostrado que miR-125b-5p puede dirigirse directamente e inhibir la expresión de un gen que codifica la 5-lipoxigenasa, una enzima clave en la biosíntesis de leucotrienos esenciales tanto para las respuestas inmunitarias innatas como para los procesos inflamatorios²², implicando un rol antiinflamatorio.

Mir 23a-3p se ha relacionado con la promoción y progresión de enfermedades hepáticas como hígado graso no alcohólico (NAFLD), a través del aumento

*Correspondencia: bherrerosr@udd.cl
2023, Revista Confluencia, 6(2), 54-59



en acumulación de lípidos, daño mitocondrial, estrés oxidativo e inflamación del hígado, pudiendo desencadenar enfermedades de mayor gravedad como cirrosis, esteatohepatitis y/o hepatocarcinoma²³.

La familia miR-23a se compone de dos cadenas complementarias (miR 23a-3p y miR 23a-5p) las cuales se encuentran encargadas de regular procesos intracelulares relacionados con la proliferación celular, regulación de la respuesta a factores inflamatorios, regulación de la apoptosis y regulación de procesos metabólicos²³⁻²⁵. Se ha observado en modelos de daño por inflamación inducidos por LPS que el miR-23a-3p atenúa la apoptosis inducida por macrófagos en tejido hepático y cerebral al dirigirse al gen HMGB1, inhibiendo su expresión y neutralizando su acción proinflamatoria^{23,26}. El miR-23a-3p se ha relacionado directamente con procesos antiinflamatorios, siendo un regulador positivo de la vía de PI3K/AKT/mTOR al inhibir la expresión de PTEN, permitiendo que AKT sobre active a mTOR. Además, se ha observado que miR-23a-3p se encuentra en diferentes procesos patológicos asociados a una respuesta inflamatoria, liberación de ROS, estrés celular e isquemia, como se ha observado en la lesión cerebral isquémica y esteatosis hepática no alcohólica, en donde se ha encontrado que los niveles del miR-23a-3p aumentaron considerablemente en ambos fenómenos patológicos, mientras que los niveles de PTEN disminuyeron, y en consecuencia aumentó la expresión y activación de mTOR, por lo que se ha considerado que el miR-23a-3p ejerce funciones antiinflamatorias y pro proliferativas/regenerativas en lesiones asociadas a procesos inflamatorios^{23,27-29}.

Cabe mencionar que el miR-23a no se han estudiado anteriormente en modelos de adicción, y considerando que producto de la neuroinflamación generada por el consumo de alcohol las microglías y astrocitos de la corteza, hipocampo y estriado del cerebro se ven afectadas por la liberación de ROS y producción de ER, fenómenos muy similares a los que ocurren en enfermedades inflamatorias en las que se ha observado la expresión del miR-23a-3p, lo cual podría dar lugar a que este miR se encuentre implicado en procesos asociados a la neuroinflamación ocasionada por el consumo de alcohol.

Problema de investigación

El consumo de alcohol tiene efectos nocivos en la salud, que aumentan el riesgo de desencadenar patologías crónicas que afectan el hígado y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, digestivas y cáncer²⁷. A nivel molecular, aunque se ha establecido el rol de algunos microRNAs en los procesos de neuroinflamación, no se comprende completamente el daño producido por estos microRNAs. Además, aún no existen estudios

que relacionen las vías de respuesta al daño por inflamación y el efecto de los microRNAs sobre la misma.

Hipótesis

El consumo de alcohol de forma voluntaria y crónica desfavorece la expresión de miRNAs antiinflamatorios en astrocitos y microglías provenientes del hipocampo y estriado, y se correlaciona con un estado hepático proinflamatorio en ratones C57BL/6.

Objetivo General

Evaluar la expresión de miRNAs antiinflamatorios en astrocitos y microglías de estriado e hipocampo, y evaluar el estado inflamatorio hepático de ratones C57BL/6 que consumieron alcohol en forma voluntaria y crónica.

Objetivos Específicos

1. Determinar histológicamente la inflamación en hígado de ratones alcohólicos y no alcohólicos.
2. Valorar los niveles de miRNA antiinflamatorios en astrocitos y microglías de ratones C57BL/6.
3. Relacionar la expresión de miRNA antiinflamatorios con el nivel inflamatorio hepático.

METODOLOGÍA

Tipo de Estudio

Los experimentos actuales son un estudio preclínico in vivo de correlación para evaluar si las expresiones de los miRs son correlacionables con el consumo crónico y voluntario de alcohol, conociendo previamente sus funciones pro y antiinflamatorias en neuroinflamación no alcohólica, antes de que se realice el mismo experimento en humanos.

Población y muestra

Para el estudio se utilizaron 14 de ratones C57BL/6, de los cuales 7 se les dio la opción de consumir dos dispensadores diferentes, una con alcohol (etanol al 15% en agua), y otra con agua, correspondiente al control negativo. Para calcular el tamaño muestral se utilizó la fórmula del estudio de Charan y Kantharia del 2013 (87). Cuya fórmula es la siguiente: $2 * SD^2 ((Za/2 + Zb)^2)/(d^2)$.

Dónde SD significa "Desviación estándar, $Za/2$ es el valor Z para error tipo 1 que corresponde a un 1,96 para el 5%; Zb es el valor Z para poder estadístico, que corresponde al 0,842 para el 80% y d sería la diferencia entre medias.

Los ratones del grupo control ($n = 7$) solo pudieron consumir agua. El periodo de exposición consistió en 70 días, durante los cuales el alcohol estuvo presente día por medio. Posteriormente, los ratones fueron eutanasiados y se les extrajo parte de la corteza, el estriado e hipocampo del cerebro de cada uno, donde además se obtuvieron microglías y astrocitos, purificadas de las tres áreas del cerebro



mencionadas mediante citometría de flujo. Todas las muestras fueron congeladas a -80°C para su posterior análisis. De todas las muestras se extrajo RNA total para la determinación de miRNAs.

Para el estudio, se incluyeron ratones C57BL/6 de una edad de 2 meses, con un consumo crónico sobre los 70 días (2.5 meses de consumo), todos consumieron sobre 10 g de alcohol/kg de peso. Respecto a la exclusión, se esperó dejar fuera del estudio aquellos ratones que no cumplieron con los requisitos de edad y consumo esperado (ningún ratón fue excluido en este estudio).

Obtención de Muestras

La disponibilidad del alcohol en el grupo de estudio fue de día por medio. De forma diaria por 30 días se midió la cantidad de alcohol consumido por kilogramo. Luego de eutanasiar a los ratones, se extrajo parte del estriado e hipocampo del cerebro de cada uno. De cada una de estas áreas cerebrales extraídas, se obtuvo muestras de microglías y astrocitos utilizando Neural Tissue Dissociation kits (Miltenyi Biotec) y se purificaron mediante citometría de flujo mediante el equipo Citómetro Cell Sorter y fue realizado en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

miqPCR

Para cuantificar los miRNAs estudiados, se empleó la técnica de miqPCR (Benes, 2015. Scientific Reports). Se prepararon alícuotas que representan a todas las muestras a estudiar para determinar si cada miRNA era detectable en las áreas y células cerebrales a estudiar. Se definieron miRNAs de interés a aquellos que tuvieran un ciclo de amplificación umbral Ct menor a 33. Se prepararon mezclas de reacción para cada muestra, en duplicados o simplificados para cada miRNA a medir.

La amplificación se realizó mediante ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos y una etapa de hibridación y elongación a 60°C durante 35 segundos. Para evaluar la especificidad del ensayo, se realizaron las curvas de melting propias del equipo. Se recopilaron los datos de fluorescencia en cada ciclo de PCR. Los datos de fluorescencia se analizaron utilizando el software StepOne v2.2.2 especializado para determinar el umbral de detección y el ciclo umbral (Ct) de cada muestra. El RNA nucleolar pequeño RNU6b se usó como gen Housekeeping para la cuantificación relativa y para el análisis de resultados de los qPCR se utilizó el método delta delta CT ($\Delta\Delta\text{Ct}$).

Histología

Además, los hígados fueron fijados en formaldehído y procesadas en histoprocador de tejidos Kinco Green Series siguiendo protocolo de rutina. Se obtuvieron cortes de 3-5 μm utilizando un microtomo rotatorio Leica y se realizó

desparafinación en baños sucesivos de HistoClear y alcoholes graduados hasta el agua corriente. Se hizo una tinción nuclear con Hematoxilina de Harris durante 2 a 3 minutos y viraje con borato durante 30 segundos. Posteriormente se realizó un lavado en agua destilada seguido por tinción con eosina por 3 minutos. Por último, la deshidratación con alcoholes de 75° , 95° y 100° por lavado cada uno, además de 3 cambios por 3 minutos de xilol para realizar el montaje de la lámina con entellan. El análisis histológico se realizó por todos los integrantes del equipo y un médico patólogo del Centro médico integral CEMESI.

RESULTADOS

Expresión de miRs antiinflamatorios en células de estriado de ratón. En la evaluación de la expresión de los miR-23a-3p, miR-125a-5p y miR-125b-5p en astrocitos de estriado (STA) y en microglías (STM) por medio de miqPCR, se observó que tanto ratones del grupo control como del grupo experimental expresaban estos miRs antiinflamatorios. Al comparar los resultados de ambos grupos en STA (Figura 1.a, 1.b y 1.c), se pudo observar que no hubo diferencias significativas en ninguno de los 3 miRNAs medidos. Asimismo, en el caso de STM (Figura 1.d, 1.e y 1.f), también se observó que no hubo diferencias significativas en ningún miRNA, sin embargo, cabe destacar que en el caso del miR-125a-5p se observó una tendencia al aumento en la expresión en el grupo experimental en relación al grupo control ($p = 0,0825$).

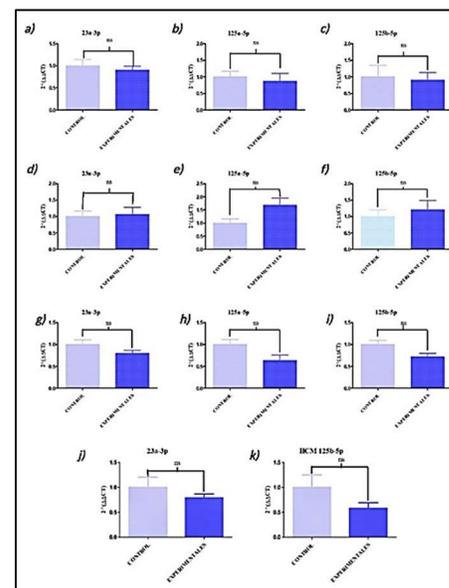


Figura 1. Resultados miqPCR de los miR-125a-5p, miR-125b-5p y miR-23a-3p en astrocitos y microglías de Estriado e Hipocampo.

Conjunto de gráficos de experimentos independientes en la expresión de miRs antiinflamatorios en Astrocitos en Estriado (a-c), Microglías en Estriado (d-f), Astrocitos en Hipocampo (g-i) y Microglías en Hipocampo (j,k), en la que en cada gráfico se expresa la media y el error estándar, donde a) corresponde a los niveles de miR-23a-3p ($p = 0,5336$), b) corresponde a los niveles de miR-125a-5p ($p = 0,2914$), c) corresponde a los niveles del miR-125b-5p ($p = 0,5756$), d) corresponde a los niveles de miR-23a-3p ($p = 0,8237$), e) corresponde a los niveles de miR-125a-5p ($p = 0,0825$), f) corresponde a los niveles del miR-125b-5p ($p = 0,6564$), g) corresponde a los niveles de miR-23a-3p ($p = 0,1336$), h) corresponde a los niveles de miR-125a-5p ($p = 0,0651$), i) corresponde a los niveles del miR-125b-5p ($p = 0,0590$). Y finalmente, j) corresponde a los niveles de miR-23a-3p ($p = 0,3123$), k) corresponde a los niveles de miR-125b-5p ($p = 0,1191$).



Expresión de miRs antiinflamatorios en hipocampo de ratón

Al evaluar la expresión de los mismos miRNAs en hipocampo, se observó que los tres miRNAs estaban expresados en ambos grupos en el caso de astrocitos de hipocampo (HCA). Por otra parte, en el caso de HCM sólo se pudo analizar miR-23a-3p y miR-125b-5p debido a que miR-125a-5p no se halló en cantidades medibles. Al comparar ambos grupos en HCA (Figura 1.g, 1.h y 1.i).

Se halló que en ningún miRNA se observaron diferencias significativas. Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución en la expresión de los miR-125a-5p ($p = 0,0651$) y miR-125b-5p ($p = 0,0590$). Por otra parte, al observar los resultados en HCM (Figura 1.j y 1.k) no se observaron diferencias significativas ni tendencias en ningún miRNA.

Análisis histológico de hígados de ratón.

El análisis histológico (Figura 2) reveló que la mayoría de los hígados presentaban cambios atribuibles a una esteatosis hepática difusa con presencia de infiltrado inflamatorio abundante en el tejido.

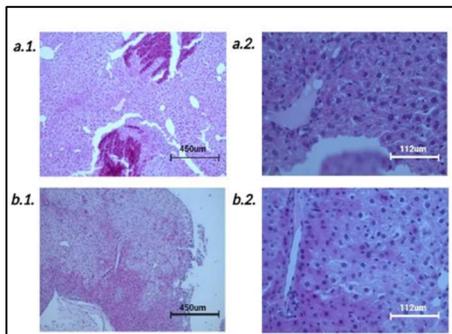


Figura 2. Imágenes Histológicas de hígado de los ratones 13 y 12 en 10x y 40x

Imagen representativa del grupo experimental (a) y grupo control (b), en las que ambos ratones son seleccionados por tener el puntaje más alto o el más bajo. En la figura se visualiza los en aumento 10x (a.1. y b.1) y en aumento 40x (a.2. y b.2.).

En todas las muestras se observó vacuolización intracitoplasmática, pérdida parcial de los límites citoplasmáticos, núcleos basófilos e infiltrado leucocitario. En ninguno de los ratones se observaron cuerpos de mallory, necrosis o fibrosis. En algunos ratones se observó una disminución de tamaño de los hepatocitos y binucleaciones. Estos resultados histológicos no sugieren una patología causada por el alcohol.

DISCUSIÓN

Estudios anteriores demostraron que el miR-125a5p y miR-125b-5p aumentan producto del consumo del alcohol y en modelos de dependencia a metanfetaminas, además de participar en la respuesta neuro adaptativa del organismo para disminuir la respuesta inflamatoria^{24,28}.

Por otra parte, estudios han demostrado el rol del miR-23a-3p en procesos neuroinflamatorios

asociados a estrés, producción y liberación de ROS, además de estar relacionado con la neuroadaptación producto de daño y muerte celular, como un regulador negativo de los cambios degenerativos asociados al daño^{30,31}. Al evaluar los niveles de expresión de los miRNAs se observó una tendencia al aumento en la expresión del miR-125a-5p en STM, mientras que el miR125a-5p en HCA y el miR-125b-5p en HCA y HCM presentaron una tendencia a la disminución en su expresión.

Si bien estos resultados no presentan una diferencia estadísticamente significativa, se puede establecer que las respuestas celulares al estrés y daño generado por el consumo crónico de alcohol son variables dependiendo la región y tipo celular que se evalúe. En el hipocampo de ratones, la tendencia observada en astrocitos indica que responden al estrés y daño producto del consumo de alcohol de la manera esperada. Mientras tanto, en el cuerpo estriado, las microglías tienen un comportamiento que indicaría que no responden al daño desencadenado por la toxicidad generada por el consumo de alcohol o al menos no de la manera observada en la literatura.

CONCLUSIÓN

Se observaron tendencias en los Mir-125a-5p y Mir-125b-5p en astrocitos de hipocampo, por lo que la hipótesis planteada no se pudo demostrar, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio no fueron estadísticamente significativos, por lo que futuros estudios deberán ser realizados para determinar posibles funciones desconocidas en este tejido y tipo celular.

Si bien el estudio no proporciona una respuesta definitiva, proporciona información valiosa sobre las respuestas celulares al estrés y daño causado por el consumo crónico de alcohol en diferentes regiones y tipos celulares. Los resultados del estudio sugieren que las respuestas celulares al estrés y daño generado por el consumo crónico de alcohol son variables dependiendo de la región y tipo celular evaluado.

Los resultados obtenidos son valiosos para dilucidar la posible relación que los miR-125a-5p y miR-125b-5p poseen en relación a la adicción al alcohol y a la neuroinflamación. Además, como se expuso anteriormente, el modelo utilizado no demostró cambios histológicos como los observados en la literatura previa, por lo que el presente estudio puede utilizarse como un antecedente para plantear cambios en el modelo de adicción al alcohol en futuras investigaciones relacionadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Res Health J Natl Inst Alcohol Abuse Alcohol. [Internet] 2006 [citado el 28 de junio de 2022];29(4):245–54. Disponible en:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6527027/>
2. Sil S, Niu F, Tom E, Liao K, Periyasamy P, Buch S. Cocaine Mediated Neuroinflammation: Role of Dysregulated Autophagy in Pericytes. *Mol Neurobiol.* [Internet] 2019 [citado el 28 de junio de 2022]; 56(5):3576–90. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6393223/#:~:text=Cocaine%20binds%20to%20the%20CF%83.lysosomes%2C%20resulting%20in%20dysregula%20autophagy.>
 3. Cahill CM, Taylor AM. Neuroinflammation—a co-occurring phenomenon linking chronic pain and opioid dependence. *Curr Opin Behav Sci.* february [Internet] 2017 [citado el 28 de junio de 2022];13:171–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28451629/>
 4. Ritz L, Coulbault L, Lannuzel C, Boudehent C, Segobin S, Eustache F, et al. Clinical and Biological Risk Factors for Neuropsychological Impairment in Alcohol Use Disorder. *PloS One.* [Internet] 2016 [citado el 28 de junio de 2022];11(9):e0159616. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0159616#:~:text=The%20present%20study%20enabled%20us.for%20neuropsychological%20impairments%20in%20AL.>
 5. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation.* 18 martius. [Internet] 2008 [citado el 28 de junio de 2022];5:10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18348728/>
 6. Lanquetin A, Leclercq S, de Timary P, Segobin S, Naveau M, Coulbault L, et al. Role of inflammation in alcohol-related brain abnormalities: a translational study. *Brain Commun.* [Internet] 2021 [citado el 28 de junio de 2022];3(3):fcab154. Disponible en: <https://academic.oup.com/braincomms/article/3/3/fcab154/6322989>
 7. Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Sood R, Mayer D, Bell R, McBride W, et al. Longitudinal brain magnetic resonance imaging study of the alcohol-preferring rat. Part II: effects of voluntary chronic alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* Iulius. [Internet] 2006 [citado el 28 de junio de 2022];30(7):1248–61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16792573/>
 8. Wang Y, Wang X, Li H, Xu M, Frank J, Luo J. Binge ethanol exposure induces endoplasmic reticulum stress in the brain of adult mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* October [Internet] 2018 [citado el 28 de junio de 2022];356:172–81. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30114398/#:~:text=Binge%20ethanol%20exposure%20caused%20neurodegeneration,memory%2C%20and%20spontaneous%20locomotor%20activity.>
 9. Xu H, Liu D, Chen J, Li H, Xu M, Wen W, et al. Effects of Chronic Voluntary Alcohol Drinking on Thiamine Concentrations, Endoplasmic Reticulum Stress, and Oxidative Stress in the Brain of Crossed High Alcohol Preferring Mice. *Neurotox Res.* November. [Internet] 2019 [citado el 28 de junio de 2022];36(4):777–87. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6786936/>
 10. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* PubMed[Internet] 2004 [citado el 28 de junio de 2022];116(2):281–97. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14744438/>
 11. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* PubMed [Internet] 201 [citado el 28 de junio de 2022]; 173(1):20–51. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29570994/>
 12. Truscott M, Islam ABMMK, Frolov MV. Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs. *PubMed.* [Internet] 2016 [citado el 28 de junio de 2022];22(1):129–38. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26554028/>
 13. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* [Internet] 2004 [citado el 28 de junio de 2022];23(20):4051–60. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524334/#:~:text=Our%20data%20demonstrate%20that%20miRNA,U4%2C%20and%20U5%20snRNA%20genes.>
 14. Ureña-Peralta JR, Alfonso-Loeches S, Cuesta-Díaz CM, García-García F, Guerri C. Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex. *Sci Rep.* [Internet] 2018 [citado el 28 de junio de 2022];8(1):15913. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-34277-y>
 15. Yu T, Huo L, Lei J, Sun J, Wang H. Modulation of Microglia M2 Polarization and Alleviation of Hippocampal Neuron Injury By MiR-106b-5p/RGMA in a Mouse Model of Status Epilepticus. *Inflammation.* [Internet] 2022 [citado el 28 de junio de 2022];45(6):2223–42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35789312/>
 16. Zhang M, Yang JK, Ma J. Regulation of the long noncoding RNA XIST on the inflammatory polarization of microglia in cerebral infarction. *Exp Ther Med.* 30 iunius [Internet] 2021 [citado el 28 de junio de 2022]; 22(3):924. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34306193/>
 17. Banerjee S, Cui H, Xie N, Tan Z, Yang S, Icyuz M, et al. miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *J Biol Chem.* [Internet] 2013 [citado el 28 de junio de 2022];288(49):35428–36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24151079/>
 18. Marangon D, Castro E Silva JH, Lecca D. Neuronal and Glial Communication via Non-Coding RNAs: Messages in Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci.* [Internet] 2022 [citado el 28 de junio de 2022]; 24(1):470. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36613914/>
 19. Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JPY, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF-κB is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev.* [Internet] 2008 [citado el 28 de junio de 2022]; 22(11):1490–500. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2418585/>
 20. Michaille JJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol Baltim Md 1950.* [Internet] 2007 [citado el 28 de junio de 2022]; 179(8):5082–9.



- Disponibile en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17911593/>
21. Androulidaki A, Iliopoulos D, Arranz A, Doxaki C, Schworer S, Zacharioudaki V, et al. The Kinase Akt1 Controls Macrophage Response to Lipopolysaccharide by Regulating MicroRNAs. *Immunity*. [Internet] 2009 [citado el 28 de junio de 2022]; 31(2):220–31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19699171/>
 22. Busch S, Auth E, Scholl F, Huenecke S, Koehl U, Suess B, et al. 5-Lipoxygenase Is a Direct Target of miR-19a-3p and miR-125b-5p. *J Immunol*. [Internet] 2015 [citado el 28 de junio de 2022]; 194(4):1646–53. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25589070/>
 23. Ru L, Wang X mei, Niu J qi. The miR-23–27–24 cluster: an emerging target in NAFLD pathogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. [Internet] 2022 [citado el 28 de junio de 2022]; 43(5):1167–79. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34893685/>
 24. Cui M, Yao X, Lin Y, Zhang D, Cui R, Zhang X. Interactive functions of microRNAs in the miR-23a-27a-24-2 cluster and the potential for targeted therapy in cancer. *J Cell Physiol*. [Internet] 2020 [citado el 28 de junio de 2022]; 235(1):6–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31192453/>
 25. Liu J, Fan L, Yu H, Zhang J, He Y, Feng D, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Causes Liver Cancer Cells to Release Exosomal miR-23a-3p and Up-regulate Programmed Death Ligand 1 Expression in Macrophages. *Hepatology*. [Internet] 2019 [citado el 28 de junio de 2022]; 70(1):241–58. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30854665/>
 26. Sun Q, Wang B, Li M. MicroRNA-23a-3p targeting of HMGB1 inhibits LPS-induced inflammation in murine macrophages in vitro. *Exp Ther Med*. [Internet] 2022 [citado el 28 de junio de 2022]; 23(5):322. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35386623/>
 27. Li Z, Xu R, Zhu X, Li Y, Wang Y, Xu W. MicroRNA-23a-3p improves traumatic brain injury through modulating the neurological apoptosis and inflammation response in mice. *Cell Cycle*. [Internet] 2020 [citado el 28 de junio de 2022]; 19(1):24–38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6927724/>
 28. Chen J, Huang T, Liu R, Wang C, Jiang H, Sun H. Congenital microtia patients: the genetically engineered exosomes released from porous gelatin methacryloyl hydrogel for downstream small RNA profiling, functional modulation of microtia chondrocytes and tissue-engineered ear cartilage regeneration. *J Nanobiotechnology*. [Internet] 2022 [citado el 28 de junio de 2022]; 20(1):164. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35346221/>
 29. Zhao H, Tao Z, Wang R, Liu P, Yan F, Li J, et al. MicroRNA-23a-3p attenuates oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Res*. [Internet] 2014 [citado el 28 de junio de 2022]; 1592:65–72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25280466/>
 30. Li Z, Xu R, Zhu X, Li Y, Wang Y, Xu W. MicroRNA-23a-3p improves traumatic brain injury through modulating the neurological apoptosis and inflammation response in mice. *Cell Cycle*. [Internet] 2020 [citado el 28 de junio de 2022]; 19(1):24–38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6927724/#:~:text=PMID%3A%2031818176-.MicroRNA%2D23a%2D3p%20improves%20traumatic%20brain%20injury%20through%20modulating%20the.and%20inflammation%20response%20in%20mice>
 31. Ginckels P, Holvoet P. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Diseases and Cancer: Role of Non-coding RNAs. [Internet] 2019 [citado el 28 de junio de 2022]; 5(1):32-35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35370493/>

