



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATECO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Perfil de expresión de miRNAs circulantes en
pacientes con ataxia espinocerebelosa tipo 7
(SCA7)”

TESIS

Que presenta:

M. en C. CLAUDIA VALDEZ VARGAS

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de tesis:

DR. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE

DR. BULMARO CISNEROS VEGA

CIUDAD DE MÉXICO

MAYO DEL 2019

AGRADECIMIENTOS:



Agradezco de manera particular al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante la estancia de Doctorado con el número 364305 y por el financiamiento del proyecto registrado como CB-2015-01-258043 a cargo del Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre.



Al Dr. Jonathan Javier Magaña Aguirre quien me permitió realizar este trabajo en el Laboratorio de Medicina Genómica del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y quien además me guio durante el arduo camino de la investigación.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega quien me aceptó como parte del laboratorio 12 del CINVESTAV, por la paciencia que tuvo en el trayecto de la investigación, por las enseñanzas otorgadas y por ser siempre un excelente investigador.

A mis asesores los Dres.: Oscar Hernández Hernández del INR, Alfredo Hidalgo Miranda del INMEGEN, José Efraín Garrido Guerrero del CINVESTAV y Luis Yoshio Kameyama Kawabe del CINVESTAV agradezco sus comentarios, sus consejos y sus aportaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. Sandra Romero y la M. en C. Verónica Borgonio cuya colaboración permitió que este trabajo se llevara a cabo y por compartir su conocimiento.

A la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez quien me enseñó los muchos caminos de la investigación, por su paciencia y sus enseñanzas.

A mis compañeros de laboratorio el M. en C. Daniel Sánchez Célis, la Q.B.P. Mireya Murillo Melo y la I.B.T. Fabiola Borbolla cuyo compañerismo permitió que la realización de este trabajo fuese más fácil y divertido.

A los trabajadores del INR la M. en C. Yesica Tapia y María de la Luz Méndez quienes permitieron y otorgaron todos los medios necesarios para que este trabajo se llevara a cabo.

A mis compañeros de generación quienes han demostrado ser amigos leales, excelentes investigadores y por enseñarme que el conocimiento es compartido.

A mis entrañables amigos Rosa, Daniel, Irlanda, Ángel y Darío.

A mi abuelita Josefina Vargas cuyas oraciones me han mantenido a flote y porque sé que nunca dejará de pedir a Dios por mí.

A mis hermanos Fernando y América quienes me han enseñado siempre más de lo que imaginan, quienes me sorprenden siempre que quiero un consejo aun siendo la hermana mayor y quienes me han dado los mejores regalos de la vida. Este camino ha sido fácil con su compañía y sé que en cualquier circunstancia puedo contar con ellos.

A mi madre, esa incansable guerrera que nunca se da por vencida y que todos los días me enseña y me da fortaleza para ser siempre quien soy. Agradezco que siempre haya creído en mí y que aun cuando pueda decepcionarla ella siempre espera lo mejor de mí...gracias amada Madre.

Un agradecimiento especial a los pacientes con SCA7 quienes voluntariamente participaron en este proyecto y nos animan a seguir investigando.

Dichoso es quien haya la sabiduría, y que obtiene la inteligencia y el conocimiento; porque su valor es mejor que la plata y sus frutos más que el oro fino. Mas preciosa es que cualquier piedra preciosa; y todo lo que puedes desear aún no se puede comparar con ella. Ella es vida para los que recurren a ella y dichosos son los que la buscan. Proverbios 3: 13-15 y 18.

DEDICATORIA

A mi padre, Fernando Valdez Carmona quien se
fue a prepararnos un lugar en el cielo.

He peleado la buena batalla, he acabado la carrera,
he guardado la fe. 2da Timoteo 4:7.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Ataxia Espinocerebelosa tipo 7	3
3.1.1 Características clínicas.....	5
3.1.2 Neuropatología.....	7
3.1.3 Del gen <i>ATXN7</i> a la proteína Ataxina-7	9
3.1.4 Mecanismos moleculares de neurodegeneración en SCA7	11
3.1.5 Marcadores moleculares de neurodegeneración	15
3.2 microRNAs y su biogénesis.....	17
3.2.1 miRNAs y neurodegeneración poliQ.....	20
3.3. miRNAs circulantes.....	21
3.3.4 miRNAs circulantes en SNC	23
4. ANTECEDENTES DIRECTOS	24
5. JUSTIFICACIÓN	28
6. HIPÓTESIS.....	29
7. OBJETIVOS	29
7.1 Objetivo General:	29
7.2 Objetivos Particulares:.....	29
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
9. MATERIALES Y MÉTODOS	31
9.1. Características del estudio	31
9.1.1 Sujetos de Estudio.....	31
9.1.2 Diagnóstico molecular de SCA7.....	32

9.2 Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con SCA7.....	34
9.2.1 Extracción de miRNAs	34
9.2.2 Síntesis de cDNA.....	35
9.2.3 Pre- Amplificación.....	35
9.2.4 Sistema TaqMan Low Density Array (TLDA).....	36
9.2.5 Análisis bioinformático y procesamiento de datos de ensayos TLDA. .	37
9.2.6 Análisis de Enriquecimiento.....	38
9.3 Selección y validación de miRNAs por qRT-PCR.....	39
9.3.1 Validación independiente con ensayos TaqMan	41
9.3.2 Procesamiento de datos.....	41
9.3.3 Análisis Univariado y curvas ROC.....	42
9.3.4 Análisis de prognosis	42
9.3.5 Análisis estadístico	42
10. RESULTADOS.....	44
10.1 Perfil de miRNAs circulantes en pacientes con SCA7	44
10.1.2 Ontología de miRNAs circulantes alterados en pacientes con SCA7 .	47
10.2 Diferencial de expresión de miRNA circulantes con respecto al fenotipo del paciente.....	49
10.3 Validación de miRNAs circulantes alterados en pacientes con SCA7 en ambos fenotipos patológicos.	58
10.4 Identificación de miRNAs con valor diagnostico en SCA7	60
10.5 Análisis computacional para la identificación de miRNAs con valor pronóstico.	63
11. DISCUSIÓN	66

12. CONCLUSIONES	72
13. PERSPECTIVAS	73
14. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	74
15. ANEXOS.....	86
15.1 Carta de consentimiento informado.....	86
15.2. Escala de evaluación de síntomas atáxicos (SARA)	87
15.3 Escala de evaluación de síntomas extracerebelares (INAS).....	89

1. RESUMEN

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por ataxia cerebelosa y degeneración retinal. Es causado por la expansión anormal del repetido CAG en la región codificante del gen *ATXN7*. Se ha reportado que el inicio y la progresión de la enfermedad varía entre pacientes con el mismo número de repetidos, por lo que, es necesario identificar biomarcadores con alta sensibilidad y especificidad que permitan monitorear la historia natural de la enfermedad y predecir la severidad de esta. Dentro de estos, los miRNAs circulantes son excelentes biomarcadores candidatos para SCA7, debido a su participación en el desarrollo de diferentes enfermedades neurológicas. En este trabajo, se describió el perfil de expresión de miRNAs circulantes en los pacientes con SCA7, usando un arreglo de baja densidad basado en ensayos TaqMan (TLDA). Se identificaron 71 miRNAs circulantes expresados diferencialmente en el plasma de pacientes con SCA7, en comparación con sujetos controles. Los resultados se validaron mediante ensayos de qRT-PCR en una nueva cohorte de pacientes independiente. Mediante análisis de regresión lineal y Random Forest identificamos cuatro miRNAs circulantes (let-7a-5p, let-7e-5p, miR-18a-5p y miR-30b-5p) con valor diagnóstico que permite discriminar entre pacientes y sujetos controles. El análisis de enriquecimiento de estos 4 miRNAs circulantes mostró que sus genes blancos participan en procesos relevantes del sistema nervioso central incluyendo la muerte celular mediado por el ligando de muerte FAS, la biosíntesis de heparán sulfato y el transporte vesicular mediado por las proteínas SNARE. Mediante análisis bioinformáticos identificamos 4 miRNAs circulantes asociados con la progresión y severidad de SCA7.

Los miRNAs circulantes pueden ser utilizados como excelentes biomarcadores para auxiliar en el diagnóstico y monitoreo de la progresión de la enfermedad, así como para identificar procesos celulares novedosos involucrados en SCA7.

2. ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7), a neurodegenerative disease characterized by cerebellar ataxia and retinal degeneration, is caused by an abnormal CAG repeat expansion in the *ATXN7* gene coding region. Disease onset and progression is highly variable between patients with the same number of CAG repeats, thus identification of specific/sensitive biomarkers that can improve the monitoring of disease progression is an immediate need. Because altered expression of circulating microRNAs (miRNAs) has been shown in various neurological diseases, they could be useful biomarkers for SCA7. In this study, we showed the expression profile of circulating miRNAs in SCA7. Using the TaqMan Profiling Low Density Array (TLDA), we found 71 differentially expressed miRNAs in the plasma of SCA7 patients, compared with healthy controls. The reliability of TLDA data was validated independently by quantitative real time-polymerase chain reaction in an independent cohort of patients and controls. We identified four validated miRNAs that discriminate between early onset and adult onset and possesses the diagnostic value to discriminate between healthy controls and patients (hsa-let-7a-5p, hsa-let7e-5p, hsa-miR-18a-5p and hsa-miR-30b-5p). The target genes of these four miRNAs were significantly enriched in cellular processes that are relevant to Central Nervous System function, including Fas-mediated cell-death, heparan sulfate biosynthesis and SNARE interactions in vesicle transport. Finally, we identify a signature of four miRNAs associated with disease severity, highlighting their potential utility to surveillance disease progression.

In summary, circulating miRNAs might provide accessible biomarkers for disease stage and progression and help to identify novel cellular processes involved in SCA7.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Ataxia Espinocerebelosa tipo 7

La ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7) es un desorden neurodegenerativo con herencia autosómica dominante; cuya característica principal es la ataxia cerebelosa progresiva (perdida de coordinación motora). Además, presenta una amplia variedad de síntomas extracerebelares asociados con la degeneración celular localizada en la corteza cerebelar, tronco cerebeloso, tracto espinocerebeloso y sus conexiones aferentes y eferentes (Subramony, 2012).

SCA7 tiene una amplia distribución geográfica (Johansson et al., 1998, Jonasson et al., 2000, Greenberg et al., 2006, Atadzhanov et al., 2017) y actualmente está clasificada en el quinto lugar de las ataxias autosómico dominantes con mayor relevancia. De acuerdo con los datos reportados en la literatura se estima que presenta una prevalencia en la población general de $<1/100,000$ habitantes. Cabe destacar que este dato puede variar dependiendo de la región geográfica y grupo étnico. Se han reportado diversos casos en países europeos como Francia, Finlandia y Noruega, así como en países africanos como Sudáfrica y Zambia (David et al., 1997, Jonasson et al., 2000, Watson et al., 2016, Atadzhanov et al., 2017). Recientemente, se han descrito casos en países de América Latina como México o Brasil (Magana et al., 2013, Azevedo et al., 2019).

Interesantemente, México posee probablemente la población más grande de pacientes con SCA7 a nivel mundial, ubicada en cinco regiones del estado de Veracruz donde la prevalencia es de $10.63/100,000$ habitantes (Fig. 1). Cabe destacar que existen comunidades con una prevalencia que alcanza hasta los $817.14/100,000$, lo que está muy por encima de la incidencia reportada a nivel mundial (Magana et al., 2014a, Velazquez-Perez et al., 2015).

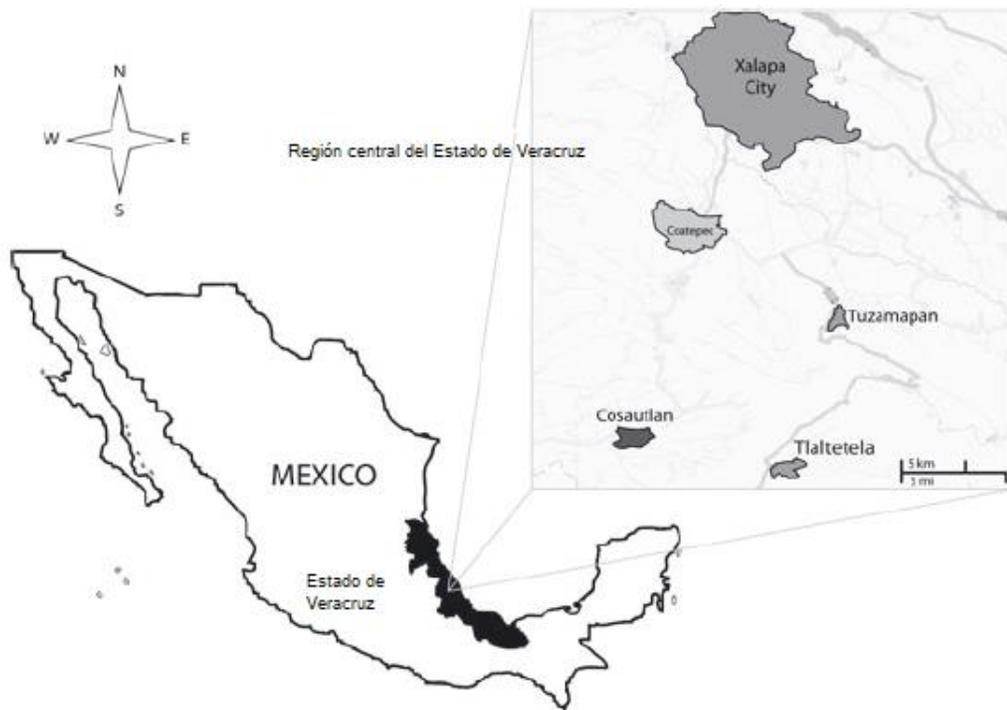


Fig. 1. Mapa geográfico de las regiones de Veracruz con SCA7. Se han identificado una gran cantidad de pacientes en cinco comunidades de la región central del estado de Veracruz, que comprende apenas 1200 km². (Modificado de Magana et al., 2014).

La causa de la enfermedad es una expansión de repetidos CAG en el gen *ATXN7*, el cual codifica para un tracto anormalmente largo de poliglutaminas en la proteína ataxina-7, lo que ubica a SCA7 dentro de las enfermedades denominadas poliglutaminopatías junto con la enfermedad de Huntington (HD), la atrofia muscular espinal bulbar (SBMA), la atrofia dentato-rubro-pálido luisiana (DRPLA) y cinco subtipos adicionales de SCAs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA17) (Paulson, 2009) (Figura 2). En las poliglutaminopatías, la expansión del tracto poliQ lleva a la acumulación de la proteína mutante en inclusiones nucleares (IN) y citoplásmicas (IC) dando lugar a una muerte neuronal selectiva en diversas regiones cerebrales.

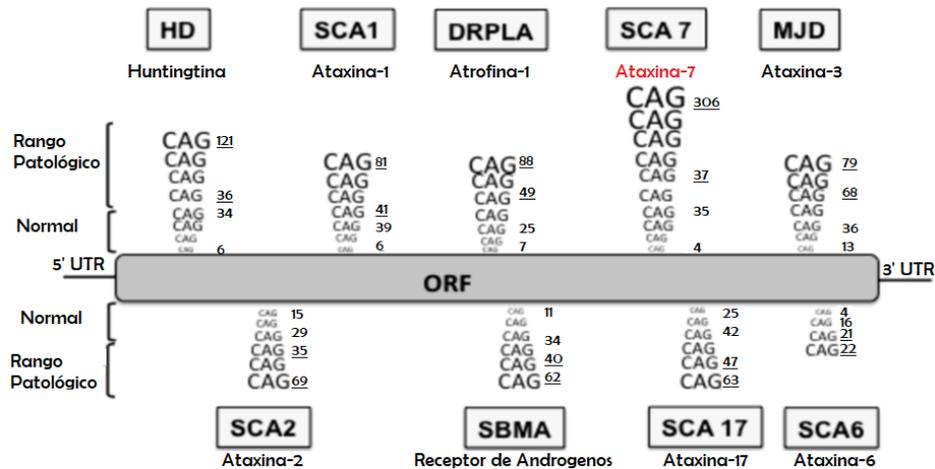


Fig. 2. Grupo de enfermedades poliglutámicas. En la figura se representan las enfermedades poliglutámicas y la ubicación de los repetidos CAG en los diferentes genes. Para cada patología se describe el rango de alelos normales y el rango de alelos patológicos reportados (números subrayados), el último número subrayado representa el número más largo de repetidos encontrado (Modificado de Ortega and Lucas et al., 2014).

3.1.1 Características clínicas de SCA7

SCA7 se caracteriza por atrofia cerebelosa progresiva asociada a la presencia de marcha atáxica, disartria, dismetría, disdiadococinesia, hiperreflexia, pérdida sensorial, tremor postural y es la única con alteraciones visuales que llevan a degeneración retinal (Enevoldson et al., 1994, Velazquez-Perez et al., 2015). Los signos, la edad de inicio y el curso clínico es altamente variable debido a que las expansiones de repetidos CAG en el DNA varían de tamaño entre los pacientes y, debido a su naturaleza inestable estas continúan expandiéndose cuando se heredan de una generación a la siguiente, fenómeno que se conoce como “anticipación” lo que hace que la enfermedad sea más severa en generaciones subsecuentes. Comúnmente las expansiones más largas contribuyen a una forma más severa de la enfermedad y un inicio temprano de la edad (Paulson, 2009). La anticipación es particularmente severa en SCA7, dando lugar a expansiones extremadamente largas causando la patología incluso en niños (van de Warrenburg et al., 2001).

Recientemente, se han caracterizado dos fenotipos patológicos en SCA7 con respecto al número de repetidos CAG:

Fenotipo Clásico se presenta en pacientes de entre 37 a 46 repetidos CAG. La característica clínica inicial es la ataxia cerebelar seguido por dismetría, disartria, disfagia, hiperreflexia y disdiadococinesia acompañado de otros signos piramidales y extrapiramidales. Después del inicio de los síntomas motores hay afectación en la distinción de colores seguido por pérdida de agudeza visual, fotofobia, cambios pigmentarios, oftalmoplegía y degeneración de conos y bastones que eventualmente conlleva a la ceguera (Martin, 2012, Velazquez-Perez et al., 2015). Se han reportado casos aislados de psicosis, alucinaciones auditivas, demencia y alteraciones del comportamiento (Benton et al., 1998).

Fenotipo infantil y juvenil se presenta en pacientes con más de 46 repetidos CAG. Para los casos infantiles se han reportado a partir de 70 repetidos y el más alto de 460 repetidos CAG los cuales siempre se sospecha de transmisión paterna (van de Warrenburg et al., 2001). El curso de la enfermedad es rápido y tiene una duración de pocos meses o años. Además de los signos clásicos característicos de ataxia, hay pérdida visual desde el inicio de la enfermedad, desnutrición debido a la disfagia severa, hipotonía severa, temblores en las extremidades y dificultad respiratoria (Whitney et al., 2007, Trang et al., 2015, Donis et al., 2015). Se han reportado casos de cardiopatía, hepatomegalia, hemangioma múltiple, retraso del desarrollo, regresión motora y cognitiva, disfunción renal, taquipnea, microcefalia e insomnio (van de Warrenburg et al., 2001, Benton et al., 1998).

Interesantemente, pacientes con el mismo número de repetidos CAG han mostrado diferente edad de inicio en síntomas visuales y motores haciendo más compleja esta patología (Fig. 3). Esta variabilidad clínica se ha atribuido a la existencia de polimorfismos dentro del gen de interés, factores epigenéticos o mosaicismo somático tal como se ha reportado en otras poliglutaminopatías (Velazquez-Perez et al., 2015).

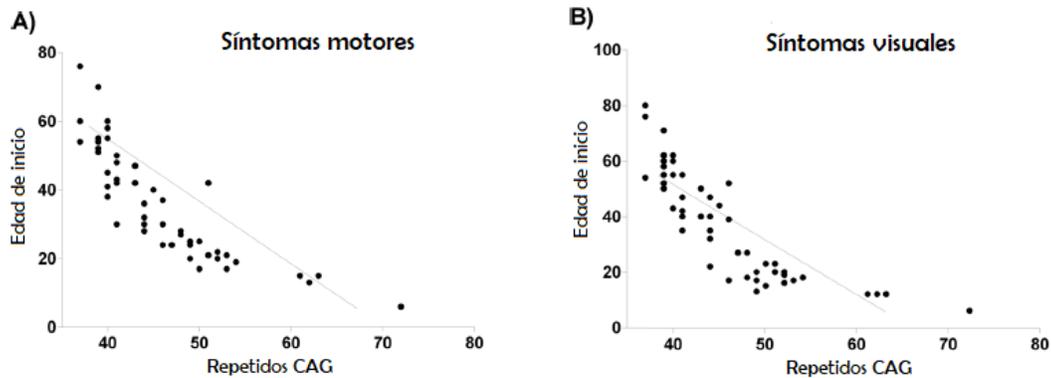


Fig. 3. Correlación entre la edad de inicio de los síntomas y el número de repetidos CAG en SCA7. Cada punto representa el análisis clínico de un paciente y la asociación que existe entre el número de repetidos y a) la edad de inicio de los síntomas motores atáxicos y b) la edad de inicio de los síntomas visuales. (Modificado de Velazquez-Perez et al., 2015).

3.1.2 Neuropatología de SCA7

A pesar de la amplia distribución de ataxina-7 en el cerebro, la neurodegeneración en SCA7 se observa principalmente en cerebelo y retina:

En el tejido cerebelar de los pacientes y en modelos transgénicos SCA7 (PrP-SCA7-c92Q) (La Spada et al., 2001), se ha reportado pérdida neuronal severa de las células cerebelares de Purkinje (PCs), pérdida de la arborización dendrítica, gliosis y cambios estructurales leves en la capa granular con aparición de inclusiones de proteína (Fig. 4) (Garden et al., 2002). Las imágenes de resonancia magnética (MRI) han mostrado más atrofia pontina que en otras SCAs, atrofia de la corteza cerebelar, del núcleo vestibular y núcleo dentado, pérdida neuronal prominente y gliosis en el complejo olivar inferior. En áreas extracerebelares hay demielinación del tracto piramidal, neurodegeneración del núcleo talámico, neocórtex, ganglios basales y medula oblonga (Holmberg et al., 1998, Rub et al., 2008).

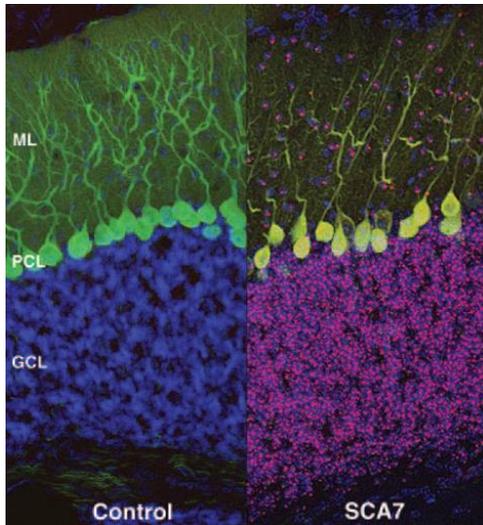


Figura 4. Neurodegeneración cerebelar en SCA7. Análisis inmunohistoquímico en secciones cerebelares de un ratón transgénico SCA7 (PrP-SCA7-c92Q). En el bloque izquierdo, podemos observar el ratón control. Mientras que en el bloque derecho se observan agregados de proteína mutante en las neuronas granulares y en otras células de la capa molecular cerebelar. Se observa una pérdida sustancial de dendritas de la capa molecular y muerte de células de Purkinje. (Modificado de Garden et al., 2002).

A nivel de retina, los pacientes muestran atrofia de la capa nuclear externa de la macula lútea, ausencia de los fotorreceptores neuronales conos y bastones, degeneración del epitelio pigmentoso e inclusiones de proteína en la capa nuclear externa e interna de la periferia retinal (Figura 5). También se observa pérdida severa de células neuronales ganglionares y bipolares, reducción de la capa plexiforme y nuclear, infiltración de macrófagos, migración del pigmento melanina del epitelio retinal hacia la retina atrofiada y gliosis fibrilar (Martin et al., 1994, Yvert et al., 2000, Rub et al., 2008).

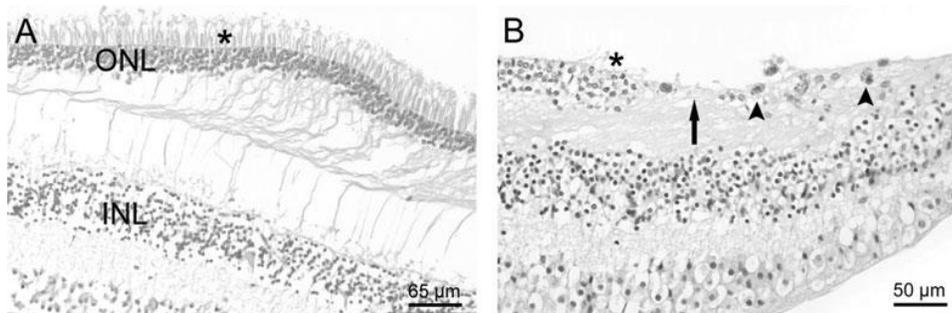


Figura 5: Características retinales en la macula lútea de un paciente SCA7 sin afectación visual (39 CAG) (A) y con afectación visual (47 CAG) (B) donde se observa: pérdida completa de células fotorreceptoras de la macula lútea (asterisco), atrofia de la capa nuclear externa (flecha) y la degeneración del epitelio pigmentoso (cabezas de flechas). La macula lútea (INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa) (Rub et al., 2008).

3.1.3 Del gen *ATXN7* a la proteína Ataxina-7

El gen *ATXN7* se localiza en el brazo corto del cromosoma 3p12-21.1 (Benomar et al., 1995) (Fig. 6). Los repetidos CAG se ubican en el primer exón codificante del gen (exón 3) (Lindblad et al., 1996, David et al., 1997), los cuales al expandirse por encima de 36 CAG's son responsables del desarrollo de SCA7 (David et al., 1997, Michalik et al., 2004). Esta región es, sin embargo, polimórfica en la población general, y el rango normal abarca de entre 4 a 19 CAG's siendo más común el alelo con 10 repetidos en el 75% de la población (Garden, 1993). Los alelos de 28-33 CAG's llamados "alelos intermedios" son inestables y tienen riesgo de expansión durante la meiosis y por lo tanto la presencia de SCA7 en la siguiente generación (Mittal et al., 2005). Finalmente los alelos de 34- 36 CAG's definidos como alelos de baja penetrancia, pueden dar lugar manifestaciones leves de la enfermedad en etapas tardías de la edad (Koob et al., 1998, Nardacchione et al., 1999).

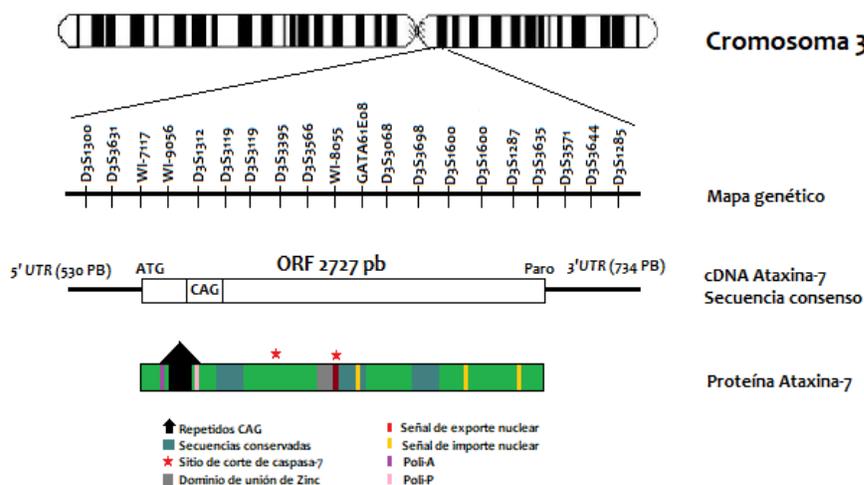


Fig. 6. Representación esquemática de la localización del gen *ATXN7* en el cromosoma 3p12-13. El gen da lugar a un transcrito de 3,969 pb que contiene un ORF de 2,727 pb. El codón ATG en la posición 562 representa el inicio de traducción. El ORF da lugar a una proteína de 892 aa. Se destacan en el recuadro las regiones que distinguen a ataxina-7.

ATXN7 es regulado por el factor regulador de la transcripción CTCF y el RNA no codificante *SCAANTI* (Sopher et al., 2011), codifica para una proteína de 892 aminoácidos nombrada ataxina-7 que se expresa en neuronas y células gliales del

sistema nervioso central además de una variedad de órganos y tejidos (Cancel et al., 2000, Lindenberg et al., 2000).

Estructuralmente, la proteína ataxina-7 contiene diversos dominios distinguibles tal como repetidos de polialanina y poliglutamina, seguido por un dominio conformado de cuatro segmentos de poliprolina, tres señales de localización nuclear (NLS), una señal de exporte nuclear (NES) y una región de unión al DNA (Figura 6) (Lebre and Brice, 2003, Taylor et al., 2006). Es componente de dos complejos involucrados en el remodelamiento de la cromatina conocidos como Complejo TAF libre de TBP (TFTC) y el complejo SPT3-TAF9-GCN5 acetiltransferasa (STAGA) los cuales llevan a cabo las actividades de acetilación (dependiente de GCN5) y deubiquitinación (dependiente de USP22) óptimos para la iniciación y elongación de la transcripción (Karam and Trottier, 2018). En el núcleo, ataxina-7 se encuentra asociado con la matriz nuclear y proteínas del nucléolo, aunque se desconoce su función concreta (Kaytor et al., 1999). Mientras que en el citoplasma se ha demostrado que estabiliza la red de microtúbulos al interactuar con α -tubulina y β -actina regulando la dinámica del citoesqueleto en células de Purkinje (Nakamura et al., 2012) (Fig. 7).

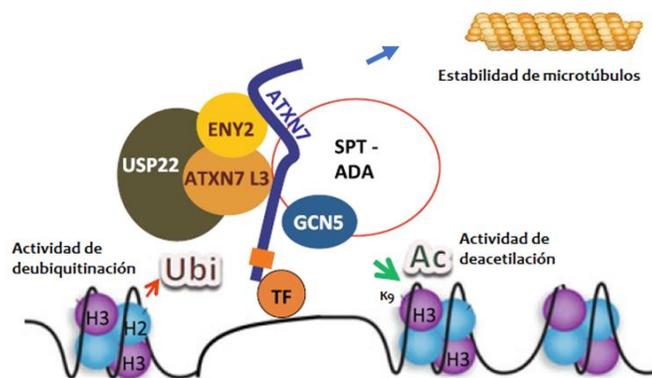


Figura 7. Representación esquemática de las funciones de ataxina-7. En el módulo de deubiquitinación (DUBm), junto con la ubiquitina-proteasa USP22, ATXN7L3 y ENY2 degrada las moléculas de ubiquitina en la histona H2B y activa la transcripción de genes. Dentro del módulo de acetilación, favorece la actividad acetilasa de GCN5 sobre la K9 de la histona H3 para iniciar la transcripción dependiente (Modificado de Karam and Trottier., 2018).

3.1.4 Mecanismos moleculares de neurodegeneración en SCA7

A pesar de no conocer por completo el papel de Ataxina-7 dentro de la célula, se han descrito mecanismos moleculares que se ven afectados con la expresión de la proteína mutante.

Inclusiones nucleares de proteína y RNA. En las enfermedades poliQ, la acumulación de la proteína mutante en el citoplasma y el núcleo es la principal característica de neurodegeneración (Adegbuyiro et al., 2017). Una vez que el número de CAGs/Q sobrepasa los 35 repetidos, el tracto de poliglutaminas cambia su estructura tridimensional normal de hélices- α a láminas β - plegadas las cuales se unen entre sí por enlaces de hidrogeno llevando a la formación de fibrillas tipo amiloide que se acumulan para formar inclusiones de proteína (Perutz et al., 1994). Esta conformación, sin embargo, retiene propiedades de interacción de la proteína la cual lleva a formar inclusiones de proteínas heterogéneas (Petrakis et al., 2013). En SCA7, el principal componente en las inclusiones es el fragmento N-terminal poli-Q (55kDa) de ataxina-7 mutante (mATXN7) que surge como resultado de un corte proteolítico en el aspartato 266 y 344 (D266, D344) por la caspasa-7 y resulta ser más citotóxico que la proteína mutante completa (Young et al., 2007). Estos agregados, secuestran proteínas relevantes que participan en el sistema ubiquitina proteosomal, factores y cofactores de la transcripción, chaperonas moleculares, remodeladores de la cromatina, proteínas de autofagia, proteínas del *splicing* alternativo y caspasas, afectando su funcionamiento y distribución celular, contribuyendo a la neurodegeneración (McCampbell et al., 2000, Shimohata et al., 2000, La Spada et al., 2001, Zander et al., 2001, Friedman et al., 2007, Alves et al., 2014, Ajayi et al., 2015b, Alves et al., 2016) (Fig.9). Así mismo se han identificado agregados de RNA con expansiones CAG y a pesar de que estos agregados no se han descrito del todo, tienen la capacidad de secuestrar proteínas nucleares (Urbanek et al., 2016).

Modificaciones postraduccionales (PTMs). La estabilidad del fragmento poliQ de mATXN7 y su acumulación dentro del núcleo se favorece por la acetilación en la lisina 257 (K257) la cual, impide la degradación del fragmento citotóxico

aumentando la muerte celular. En ausencia de esta acetilación, el fragmento es degradado por autofagia (Mookerjee et al., 2009). De manera interesante, el mismo residuo K257 es un sitio de SUMOilación, sin embargo, esta modificación disminuye la capacidad de agregación de mATXN7 (Janer et al., 2010).

Alteración del sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS). Se ha demostrado que los agregados intracelulares en SCA7, contribuyen en la neurotoxicidad secuestrando a subunidades y componentes del proteasoma 26S y con ello afectando la función proteolítica del sistema ubiquitina-proteasoma lo que lleva a la acumulación citosólica de proteínas de degradación (Yvert et al., 2000, Zander et al., 2001)(Fig. 9). Aunado a esto, se ha observado que el uso de inhibidores del proteasoma causan una muerte neuronal cerebelosa similar a como ocurre en SCA7, disminuyendo la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL y activando las caspasas 3 y 9 (Wang et al., 2007).

Inhibición de Autofagia. La autofagia es esencial en las poliglutaminopatías dada su capacidad de degradar fragmentos poliQ aminorando la toxicidad y aumentando la viabilidad celular (Pandey et al., 2007, Sarkar et al., 2009). En SCA7, la acumulación progresiva de mATXN7 induce la expresión de proteínas tempranas que forman el autofagosoma, sin embargo, algunas de estas proteínas son secuestradas en los agregados impidiendo el flujo normal de la vía autofágica. Esto, lleva a la acumulación de autofagosomas tempranos en las células los cuales, además, son incapaces de fusionarse con los lisosomas para su maduración debido a la disminución en la expresión de proteínas intermediarias que forman el autofagolisosoma; quedando por lo tanto arrestados en esta fase (Yu et al., 2013, Alves et al., 2014). Se ha hipotetizado además que en esta fase los autofagosomas son incapaces de reconocer moléculas cargo debido al secuestro y redistribución de la proteína p62, encargada de reconocer y transportar las moléculas marcadas para autofagia (Alves et al., 2014)(Fig. 9).

Transporte vesicular del glutamato. En modelos de ratón SCA7 (PrP-SCA7-c92Q), la disminución en la expresión de GLAST- el transportador más importante de glutamato - reduce hasta un 20-25% la captura de glutamato del espacio sináptico

por las células gliales de Bergman causando excitotoxicidad y neurodegeneración en las células cerebelares de Purkinje (Custer et al., 2006). En los sinaptosomas, la captura de glutamato se reduce hasta un 40%, probablemente debido a la desregulación de proteínas como SNAP-25 y sinaptosina (SYN), asociadas al transporte vesicular (Custer et al., 2006, Alves et al., 2016)(Fig. 9).

Disfunción mitocondrial. El daño mitocondrial en SCA7 surge como consecuencia de una morfología anormal de la mitocondria, acidosis metabólica, reducción en la actividad de la cadena transportadora de electrones (ETC), disminución del dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD⁺) y alteración de los niveles totales de ATP (Forsgren et al., 1996, Johansson et al., 1998, Ward et al., 2019)(Fig. 9), particularmente, debido a la actividad directa o indirecta de mATXN7 reduciendo los niveles de enzimas antioxidantes, aumentando la actividad de complejos productores de especies reactivas de oxígeno (ROS) y afectando proteínas esenciales de la integridad de la membrana mitocondrial previo a la muerte celular (Ajayi et al., 2012, Torres-Ramos et al., 2018). Una de estas proteínas esenciales, AIF, disminuye su expresión hasta un 50% en SCA7, lo que lleva a reducir la actividad de la ETC, afectar la integridad membranal, alterar el potencial de membrana mitocondrial y reducir en el consumo de oxígeno (Ajayi et al., 2015a).

Desregulación transcripcional. La desregulación transcripcional puede ocurrir por varios mecanismos moleculares en los que se incluyen los antes mencionados: secuestro de factores y cofactores de transcripción, alteración de la vía ubiquitina-proteasoma afectando el recambio de factores y cofactores transcripcionales, interacción aberrante de mATXN7 con represores transcripcionales (Duncan et al., 2013) y, finalmente, la pérdida funcional de mATXN7 en el complejo remodelador de la cromatina STAGA/TFTC (Fig. 9).

De manera normal, ataxina-7 dentro del complejo STAGA estabiliza y activa a la acetilasa GCN5 para que lleve a cabo la acetilación en K9 de la histona 3 y con ello el inicio de la transcripción de genes dependientes de STAGA. Sin embargo, se ha descrito que la expansión CAG en ataxina-7 afecta la formación del complejo, la acetilación de la histona H3 y la interacción de GCN5 con factores de transcripción

como CRX (proteína “homebox” de conos y bastones), que se une a regiones promotoras y reguladoras de varios genes específicos para el mantenimiento de células fotorreceptoras (Palhan et al., 2005, Burke et al., 2013)(Fig. 8). La represión de CRX lleva a la disminución de genes con actividad de fototransducción, factores de transcripción retinales y componentes estructurales de la retina, cimentando de esta manera las bases de la degeneración retinal y la razón de la pérdida selectiva de célula fotorreceptoras en esta enfermedad (La Spada et al., 2001, Yoo et al., 2003, Chen et al., 2004, Abou-Sleymane et al., 2006, Helmlinger et al., 2006). Además de la acetilación, mATXN7 también afecta la actividad de deubiquitinación de STAGA llevando a la disminución del gen de retina (*RELN*), una proteína con papel en la migración neuronal, mantenimiento de células de Purkinje y conexiones sinápticas en la retina (McCullough et al., 2012).

En el cerebelo de ratones modelos de SCA7 (ATX-7-52Q), se ha observado disminución en la expresión de genes antiapoptóticos y, otros asociados a la transmisión glutamatérgica, transducción de señal, formación de mielina, deubiquitinación, estrés mitocondrial, transporte axonal, diferenciación neuronal y glial y afectación en la expresión de proteínas chaperonas causando la neurotoxicidad y disfunción cerebelar al inicio de los síntomas atáxicos (Wang et al., 2006, Chou et al., 2010). En células mononucleares de pacientes, estudios del transcriptoma ha demostrado disminución en la expresión de genes de autofagia asociados con la severidad de la enfermedad (Alves et al., 2014).

Desregulación en la expresión de miRNAs: Análisis *in vivo* e *in vitro* en ratones transgénicos SCA7 (SCA7100Q/100Q) demuestran que ataxina-7 es regulado por miR-124, el miRNA más abundante del cerebelo y la retina (Sanuki et al., 2011). En SCA7, sin embargo, miR-124 disminuye debido a la reducida actividad transcripcional del complejo STAGA como resultado de la mutación en *ATXN7*; por lo que, los bajos niveles de miR-124 contribuyen a la abundancia de mATXN7 y la presencia de inclusiones nucleares principalmente en el cerebelo y la retina, las áreas mayormente afectadas en SCA7, contribuyendo de esta manera a la neurodegeneración (Tan et al., 2014).

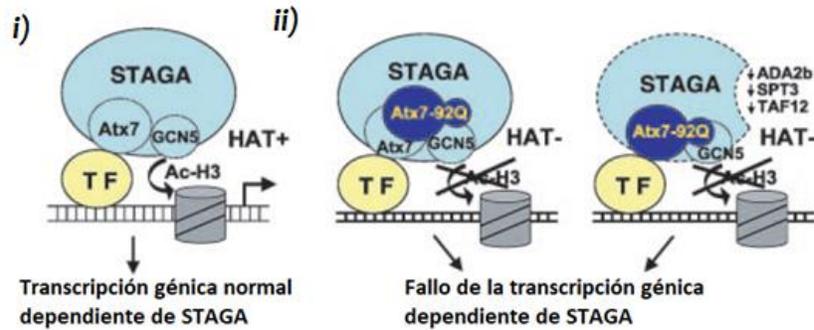


Fig. 8. Efecto de la proteína mutante ataxina-7 sobre la función de GCNG. El modelo indica (i) la función normal de ataxina-7 como parte del complejo STAGA en facilitar el reclutamiento de GCN5 y mediar la acetilación de la histona H3 a través de su interacción con factores de transcripción unidos a su región promotora, y (ii) inhibición de la actividad acetilasa de GCN5 al interactuar con la ataxina-7 mutante una vez formado el complejo o cuando se impide la formación del complejo (Modificado de Palhan et al., 2005).

3.1.5 Marcadores Moleculares de neurodegeneración

Las alteraciones de los mecanismos moleculares en SCA7, conllevan a la desregulación de diversos actores moleculares a nivel celular, ya sean proteínas, transcritos, metabolitos y miRNAs los cuales, además, pueden secretarse y encontrarse en el ambiente extracelular denominándoseles **biomarcadores circulantes**.

El análisis temprano de biomarcadores directamente en los pacientes ha permitido identificar subtipos clínicos de neurodegeneración, progresión y severidad y, debido a la imposibilidad de realizar estos análisis directamente en el tejido afectado de los pacientes, el análisis de biomarcadores se emplea principalmente en biofluidos tales como orina, saliva, plasma o suero, líquido cefalorraquídeo (CSF), etc., (Thambisetty et al., 2010, Gaughwin et al., 2011, Shi et al., 2014, Roede et al., 2013) los cuales tienen la ventaja de ser altamente accesibles sin necesidad de utilizar un método invasivo, con un alto grado de sensibilidad y especificidad y con capacidad de detectarse de manera rápida y segura.

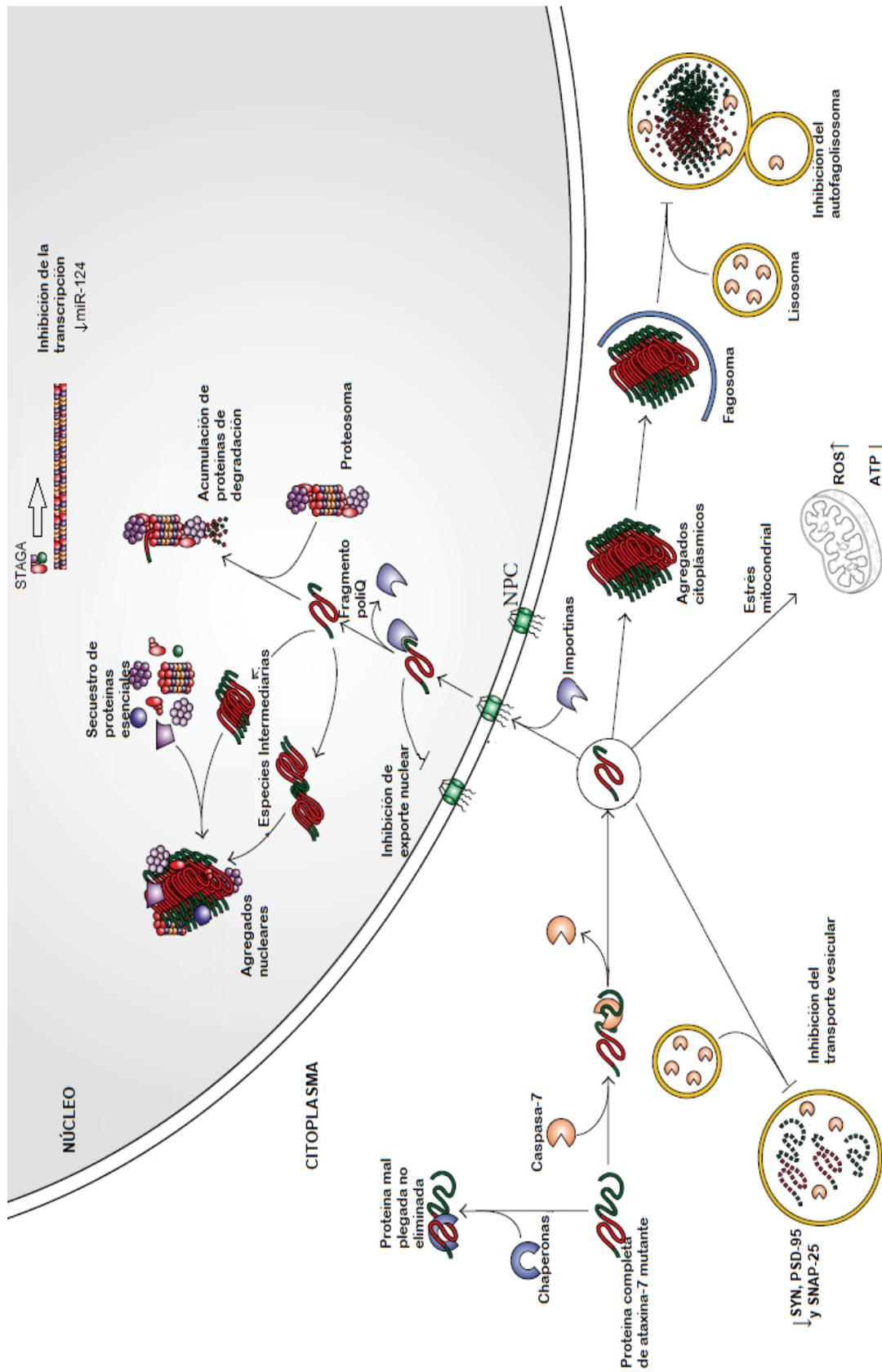


Fig. 9. Mecanismos moleculares de neurodegeneración en SCA7. Las vías alteradas están detalladas en el texto.

De estos, el CSF representa el biofluido más relevante para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en las enfermedades neurodegenerativas debido a su proximidad con el cerebro, sin embargo, el uso de CSF tiene algunas desventajas ya que existe un gran riesgo de contaminación y además el procedimiento puede ser doloroso lo cual limita la participación del paciente en los estudios. Por otro lado, el plasma o suero representa una fuente más conveniente para el descubrimiento de biomarcadores, ya que es un tejido complejo que comprende fluidos extracelulares de las células dañinas y es una fuente rica de biomarcadores como DNA, mRNA, proteínas, lípidos y microRNAs que representan el estado patológico en las enfermedades neurodegenerativas (Fig. 10) (Lista et al., 2013).

Dentro de éstos, los miRNA muestran muchas ventajas: su expresión es tejido-específica, tienen un bajo costo y se requiere poco tiempo para su análisis.

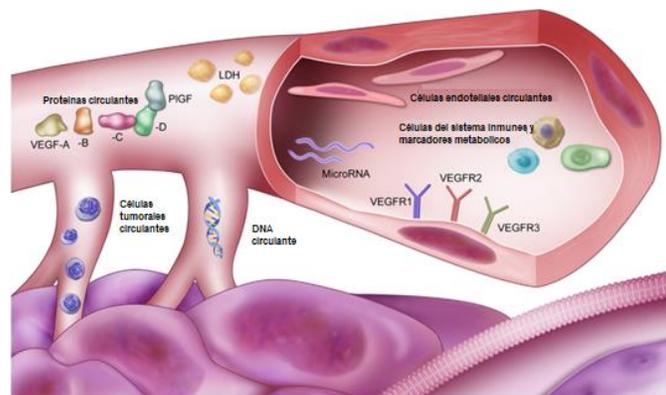


Fig. 10. Biomarcadores circulantes. La presencia de proteínas, metabolitos, células, DNA, mRNA y RNA no codificante como los **miRNAs** en la circulación sugiere posibles biomarcadores no invasivos para determinar un diagnóstico, pronóstico e incluso como posibles blancos terapéuticos (Modificado de Zhang et al., 2016).

3.2 microRNAs y su biogénesis

Los microRNAs (miRNAs) constituyen la clase más abundantes de RNAs pequeños no codificantes en la mayoría de los tejidos somáticos. Se encuentran codificados en el genoma en varios contextos (Fig. 11), aunque cabe destacar que

el 80% residen en intrones de genes codificantes, por lo que son regulados por el promotor del gen huésped y su expresión correlaciona con éste (Ha and Kim, 2014).

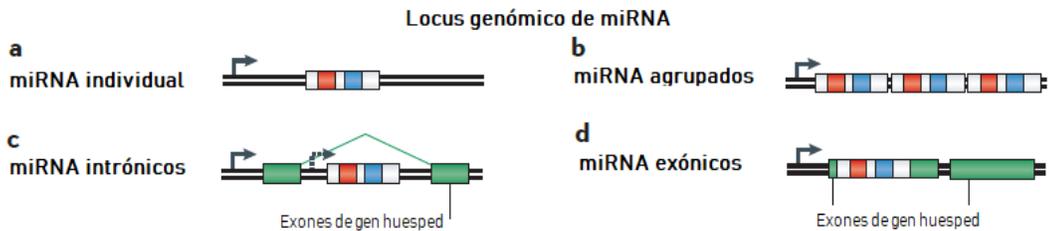


Fig. 11. Localización de secuencias de miRNAs en el genoma. Los miRNAs se encuentran en el genoma como: (a) unidades independientes, (b) grupos de varios miRNAs que se transcriben como un solo transcrito. Éstos dos regulados por su propia región promotora. La gran mayoría residen en, (c) regiones intrónicas de genes y son regulados por el promotor del gen huésped o por promotores intrónicos independientes y finalmente, (d) en regiones exónicas. Las flechas indican la direccionalidad de la región promotora (Modificado de Berezikov., 2011).

La transcripción de la mayoría de los miRNAs es llevada a cabo por la RNA polimerasa II (Pol II) y es controlado por los factores de transcripción asociados a la RNA Pol II y reguladores epigenéticos tal como la metilación del DNA y la modificación de histonas (Lee et al., 2004, Morales et al., 2017). Después de la transcripción, el miRNA primario (pri-miRNA) de aproximadamente 1Kb con estructura tallo-horquilla, es procesado por la RNAsa III Drosha y su cofactor DGCR8 quien inicia el proceso de maduración cortando el tallo para liberar un RNA en forma de horquilla de aproximadamente 65-100 pb (pre-miRNA), el cual, se exporta al citoplasma mediado por la proteína exportina-5 y RAN-GTP para que se complete la maduración. Después de la translocación a través del poro nuclear, el GTP se hidroliza liberando el pre-miRNA en el citosol donde nuevamente es procesado por la RNAsa III Dicer y su cofactor TRBP para generar un RNA maduro funcional (miRNA/miRNA*) de doble cadena de 18-23 pb. Una cadena es reconocida por la proteína Argonauta (AGO) y proteínas asociadas para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Durante el silenciamiento del mRNA, el miRNA funciona como una guía de apareamiento de base con el

3'UTR del RNA mensajero blanco, mientras que la proteína AGO funciona como efector reclutando factores que inducen la represión traduccional, la deanilación de mRNA y su degradación bloqueando de esta manera la traducción de genes (Fig.12) (Ha and Kim, 2014, Guo et al., 2010, Liu, 2008).

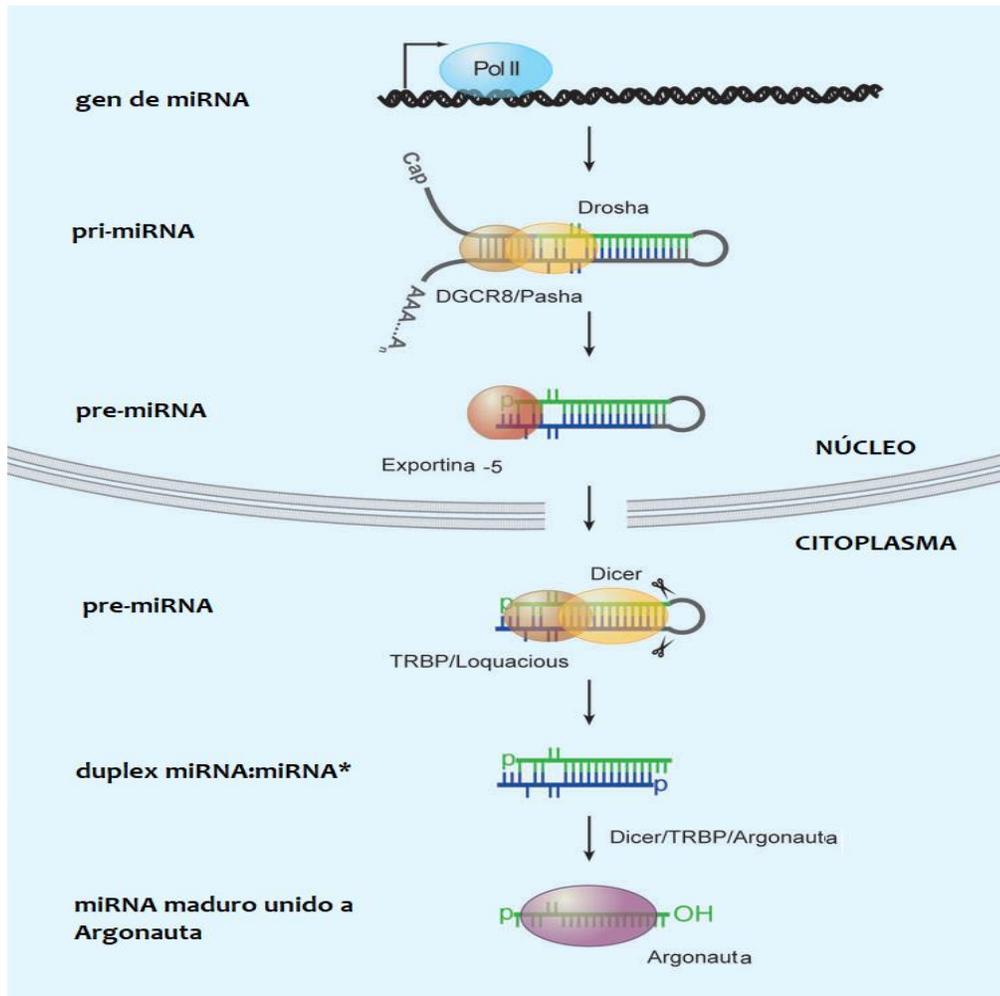


Figura 12: Biogénesis y modo de acción de miRNAs en mamíferos (Modificado de Bushati and Cohen, 2007).

El dominio en el extremo 5' de los miRNAs que abarca los nucleótidos 2 al 7 es crucial para el reconocimiento del mRNA blanco y se denomina “secuencia semilla”. Los nucleótidos del 8 al 16, aunque menos importantes, también contribuyen al apareamiento de bases (Ha and Kim, 2014). Mas del 60% de los genes que codifican para proteínas contienen por lo menos un sitio de unión

conservado para el miRNA, y considerando que existen un sin número de sitios no conservados, la mayoría de los genes están regulados por los miRNAs (Lim et al., 2005). No es de sorprender por lo tanto que, la biogénesis y función de los miRNAs son altamente regulados y su desregulación se ha asociado con enfermedades humanas incluyendo cáncer y desordenes neurodegenerativos.

3.2.1 miRNAs y neurodegeneración poliQ

Los miRNAs han sido implicado en las enfermedades neurodegenerativas de diferentes maneras. Primero, se ha demostrado que la interrupción global en la biogénesis de miRNAs en neuronas postmitóticas; como las células de Purkinje (PC), lleva a una degeneración cerebelar progresiva y ataxia, similar al observado en Alzheimer, Parkinson y a las enfermedades PoliQ (Schaefer et al., 2007). Además, se ha observado que la ausencia de miRNAs potencia la neurodegeneración poliQ tanto en *Drosophila* como en células humanas disminuyendo la viabilidad celular hasta un 50% más (Bilen et al., 2006). En segundo, varios miRNAs han demostrado regular a las proteínas asociadas a la patología y modular su concentración celular (Karres et al., 2007, Sinha et al., 2011). Así, por ejemplo, Ataxina-1, la proteína implicada en SCA1 es regulada por lo menos por 3 miRNAs (Lee et al., 2008). Tercero, se han identificado miRNAs capaz de revertir el efecto citotóxico de las proteínas poliQ mutantes al disminuir la ataxia cerebelar y la presencia de agregados de proteínas en modelos de ratón sugiriéndose como posibles blancos terapéuticos (Karres et al., 2007, Miyazaki et al., 2012, Huang et al., 2014). Finalmente, recientes datos sugieren que la alteración en la expresión de miRNAs puede representar una parte importante de los mecanismos patológicos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas. Esta desregulación pueden representar eventos no específicos de un proceso secundario que ocurre en la neurodegeneración como estrés oxidativo, apoptosis, homeostasis o determinar el inicio del proceso patológico y tener un papel en la evolución de la enfermedad (Marti et al., 2010, Ghose et al., 2011, Das et al., 2013). La expresión alterada de miRNAs se ha encontrado en una variedad de modelos

animales, modelos celulares, en muestras cerebrales post-mortem de pacientes y en el plasma y suero de los pacientes, estos últimos constituyen la clase de miRNAs circulantes (Roshan et al., 2012, Soldati et al., 2013, Rodriguez-Lebron et al., 2013, Kocerha et al., 2014, Shi et al., 2014).

3.3. miRNAs circulantes

Mientras que la gran mayoría de los miRNAs se han detectado en el microambiente celular, un gran número de estos- comúnmente conocidos como miRNAs circulantes- se han detectado en el ambiente extracelular, incluyendo diferentes fluidos biológicos y medios de cultivo (Valadi et al., 2007, Turchinovich et al., 2011, Gilad et al., 2008). Los miRNAs circulantes derivan de varias fuentes como: células sanguíneas, células endoteliales, órganos, tumores y células apoptóticas (Hunter et al., 2008, Turchinovich et al., 2011, Liang et al., 2014). A pesar de la presencia de ribonucleasas (RNAsas) en la circulación, los miRNAs circulantes se encuentran en altas concentraciones y suficientemente íntegros lo que sugiere que adoptan mecanismos protectivo que evita la actividad RNAsa en el ambiente extracelular. Se han caracterizado varios modelos para la estabilidad y excreción de los miRNAs circulantes: (1) Los miRNAs son secretados de células donadoras a través de vesículas de membrana que incluye exosomas y vesículas secretoras, conjuntamente denominadas Microvesículas (MVs) por medio de exocitosis o fusión de membrana (Mathivanan et al., 2010). ; (2) Una segunda vía, es formando complejos con lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Vickers et al., 2011); (3) Asociados a proteínas de unión al RNA como argonauta 1-4 (AGO1-4) (Arroyo et al., 2011) y finalmente, (4) en cuerpos apoptóticos los cuales se forman en el proceso final de muerte celular (Fig. 13) (Zernecke et al., 2009).

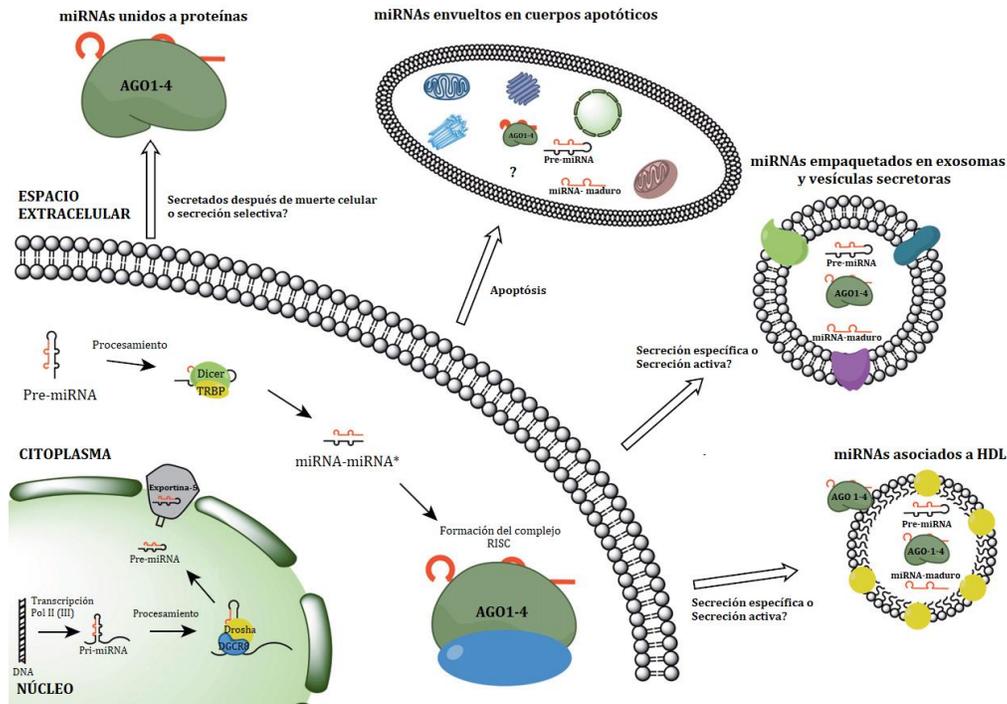


Figura 13: Modelos de empaquetamiento de miRNA extracelulares. El empaquetamiento de los miRNAs circulantes impide su degradación en el ambiente extracelular favoreciendo el transporte de éstos en el sistema circulatorio (Modificado de Turchinovich et al., 2012).

El empaquetamiento de los miRNAs dentro de las MVs parece ser un mecanismo selectivo bajo ciertas condiciones fisiológicas y patológicas. Sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo por el cual las células seleccionan los miRNAs o si esto depende de su secuencia, concentración intracelular o distribución tisular (Zhang et al., 2015). Algunos miRNAs son transcritos únicamente para su empaquetamiento en exosomas, lo que sugiere un papel específico de regulación. En el espacio extracelular, el intercambio de exosomas se da entre un tipo específico de células y su tráfico es similar al de las hormonas (Valadi et al., 2007).

Los mecanismos de captación de miRNAs desde el espacio extracelular no son bien conocidos, se ha propuesto que los exosomas interactúan con las células receptoras a través de un reconocimiento de proteínas transmembranales en el exosoma y receptores de las células receptoras. Esta interacción, permite la entrada de exosomas a la célula receptora por endocitosis, fagocitosis o por fusión directa con la

membrana plasmática (Simons and Raposo, 2009). Se ha sugerido que la interacción ligando-receptor es de igual manera el mecanismo de internalización de miRNAs unidos a HDL o AGO1-4 (Vickers et al., 2011).

Después de liberar los miRNAs circulantes en el citoplasma de la célula aceptora, estos, llevan a cabo mecanismos de regulación postranscripcional, comunicación celular, evasión del sistema inmune o inclusive pueden mediar señales de peligro a el organismo debido a una disfunción tisular (Valadi et al., 2007, Liang et al., 2014, Zhang et al., 2015).

3.3.4 miRNAs circulantes en SNC

Muchos tipos celulares existen en el SNC incluyendo neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos. Recientes reportes indican que los miRNAs del SNC pueden liberarse por diferentes vías y ser captados por células neuronales y no neuronales (Xin et al., 2012, Xu et al., 2013). En el primer estudio, se observó que las células madres mesenquimales (CMM) pueden regular el crecimiento de las neuritas transfiriendo miR-133b a las células neuronales a través de exosomas. Este mecanismo podría tener un beneficio terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurológicas promoviendo la recuperación de funciones (Xin et al., 2012). Por el otro lado, recientemente se ha encontrado que los miRNAs son activamente secretados en vesículas desde los sinaptosomas por exocitosis después de la despolarización de membrana, de manera similar a los neurotransmisores. Este reporte fue el primero además en indicar que moléculas neuroactivas como el factor de crecimiento neuronal (NGF) el ácido kaínico pueden regular la secreción de los miRNAs (Xu et al., 2013).

Actualmente, la desregulación del perfil de miRNAs asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas contribuyen no solo al conocimiento del funcionamiento patológico de la enfermedad, si no que pueden contribuir como marcadores específicos en el seguimiento natural de la patología o como marcadores de severidad de esta.

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

Mientras que extensos trabajos de miRNAs circulantes se han publicado en Alzheimer y Parkinson, el papel de estos en enfermedades poliglutámicas es escaso. El primer estudio sobre miRNAs como posibles biomarcadores circulantes en SCA3 fue publicado recientemente en el 2014. Shi y colaboradores describieron por primera vez la alteración de 46 miRNAs en el suero de los pacientes (20 incrementados y 26 disminuidos) comparados con los controles sanos en análisis de microarreglos. En este trabajo se pudo determinar que los miRNAs, miR-34b, miR-29a, miR-25b y miR-125 podrían ser excelentes marcadores de SCA3 al validarse por qRT-PCR (Fig.14a). Interesantemente, de entre los miRNAs diferencialmente expresados, miR-25 y miR-125b se asociaron directamente con el curso de la enfermedad, ya que la expresión de éstos disminuyó conforme progresaba la enfermedad (Fig.14b) (Shi et al., 2014). Con respecto a su papel molecular, se encontró que miR-25 regula los niveles de *ATXN3*, el gen responsable de SCA3 y la sobreexpresión de éste miRNA suprime la apoptosis y la formación de agregados, sugiriéndolo con un posible papel terapéutico (Huang et al., 2014).

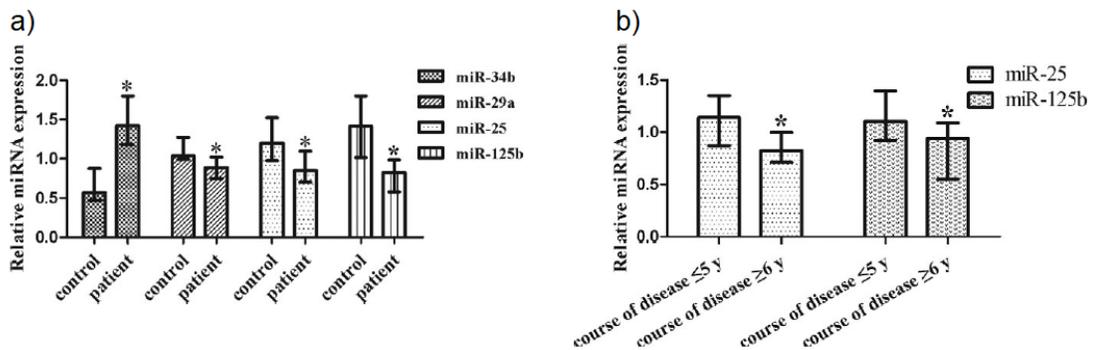


Figura 14: MicroRNAs circulantes como posibles biomarcadores en SCA3. A) Expresión relativa de miR-34b, miR-29a, miR-25 y miR-125b en el suero de 35 pacientes con SCA3 comparado con 25 sujetos controles. B) Expresión relativa de miR-25 y miR-125b en pacientes con un curso de enfermedad de 3 a 5 años comparados con pacientes de 6 a 9 años de enfermedad. Los niveles de expresión de miR-25 y miR-125b en el grupo de pacientes con ≤ 5 años de curso de la enfermedad fue diferente de aquel grupo con ≥ 6 años de curso de la enfermedad (Shi et al., 2014).

En HD, el análisis de miRNAs circulantes en plasma/suero ha sido más extenso. De primera instancia, la expansión CAG en Huntingtina, eleva significativamente los niveles de miR-34b en el plasma de pacientes presintomáticos con respecto a sujetos controles y a otros pacientes en estadios avanzados de la enfermedad. Dado que la expresión de este miRNA se altera antes del inicio de los síntomas, se sugiere que podría ser un excelente biomarcador con un papel en el pronóstico de la enfermedad (Gaughwin et al., 2011).

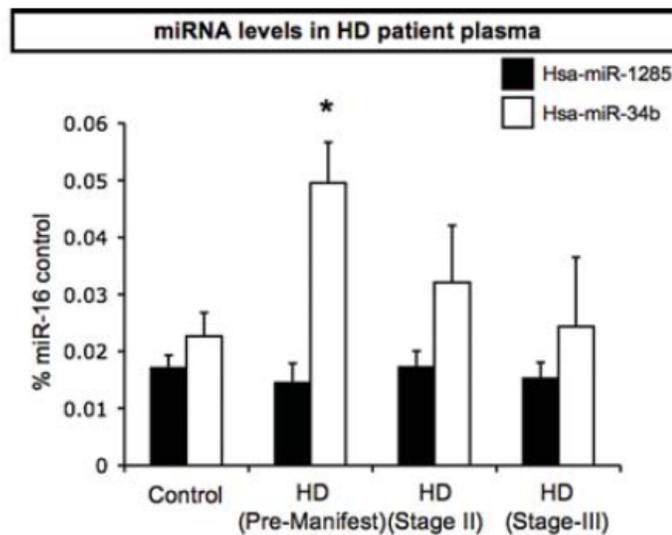


Figura 15: miR-34b es elevado en pacientes asintomáticos. Los niveles de miR-1285 (barras negras) y miR-34b (barras blancas) fueron cuantificadas en muestras de plasma de pacientes con HD (11 asintomáticos; 8 de Estado II o temprano y; 8 de estado III o moderado) comparado con sujetos controles (12 muestras) (Gaughwin et al., 2011).

Más importante Hoss y colaboradores destacaron la asociación que hay entre el cerebro y el sistema periférico al comparar los niveles de cuatro miRNAs (miR-10b-5p, miR-486-5p, miR-132-3p y miR-363-3p) anteriormente identificados en los cerebros de muestras post-mortem de pacientes con HD y muestras de plasma.

De los cuatro miRNAs alterados en el cerebro, sin embargo, sólo dos miRNAs (miR-10b-5p y miR-486-5p) se encontraron incrementados en el plasma de pacientes con HD, aunque sólo miR-10b-5p se asoció con el estado neuropatológico

de la enfermedad (Fig.16). La concordancia entre cerebro y la sangre periférica sostiene que miR-10b-5p podría tener una utilidad como biomarcador en ensayos clínicos de pacientes con HD y podría determinar la progresión de la enfermedad (Hoss et al., 2015).

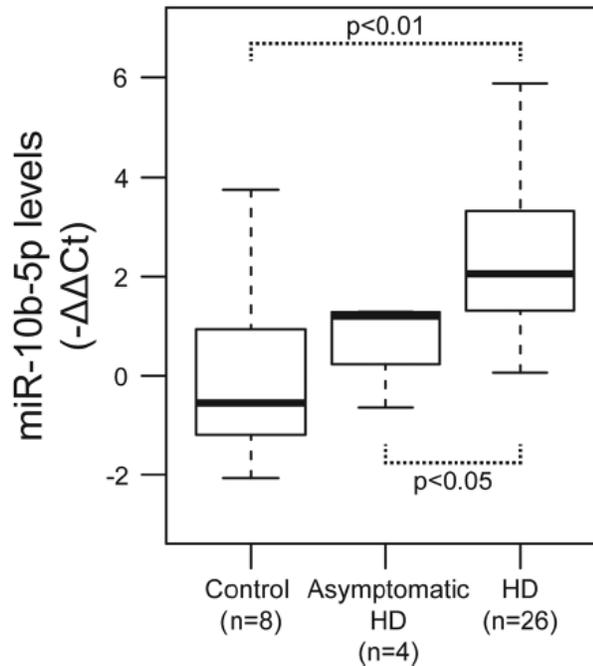


Fig. 16. miR-10b-5p tiene una asociación con el estado de enfermedad en HD. miR-10b-5p tiene una tendencia lineal desde los controles a pacientes presintomáticos y manifestantes de HD (Hoss et al., 2015).

No obstante, el único trabajo que detalla un perfil completo de miRNAs circulantes en pacientes con HD fue publicado más recientemente en el 2016 por Díez-Planelles. Trece miRNAs circulantes-miR-877-5p miR-223-3p, miR-30d-5p, miR-128, miR-22-5p, miR-222-3p, miR-338-3p, miR-130b-3p, miR-425-5p, miR-628-3p, miR-361-5p y miR-942- aumentaron significativamente en los pacientes con HD cuando se compararon con los sujetos controles (Fig.17). Análisis funcionales demostraron que estos miRNAs podrían estar asociados con enfermedades metabólicas como resistencia a la insulina que se ha observado en los pacientes con HD, además de hipercolesterolemia, hiperlipidemia e hiperglicemia (Diez-Planelles

et al., 2016). Establecer perfiles de miRNAs circulantes en los pacientes podría proveer información acerca de los procesos biológicos que podrían tener influencia en la enfermedad y podrían incluso llegar a ser posibles blancos terapéuticos.

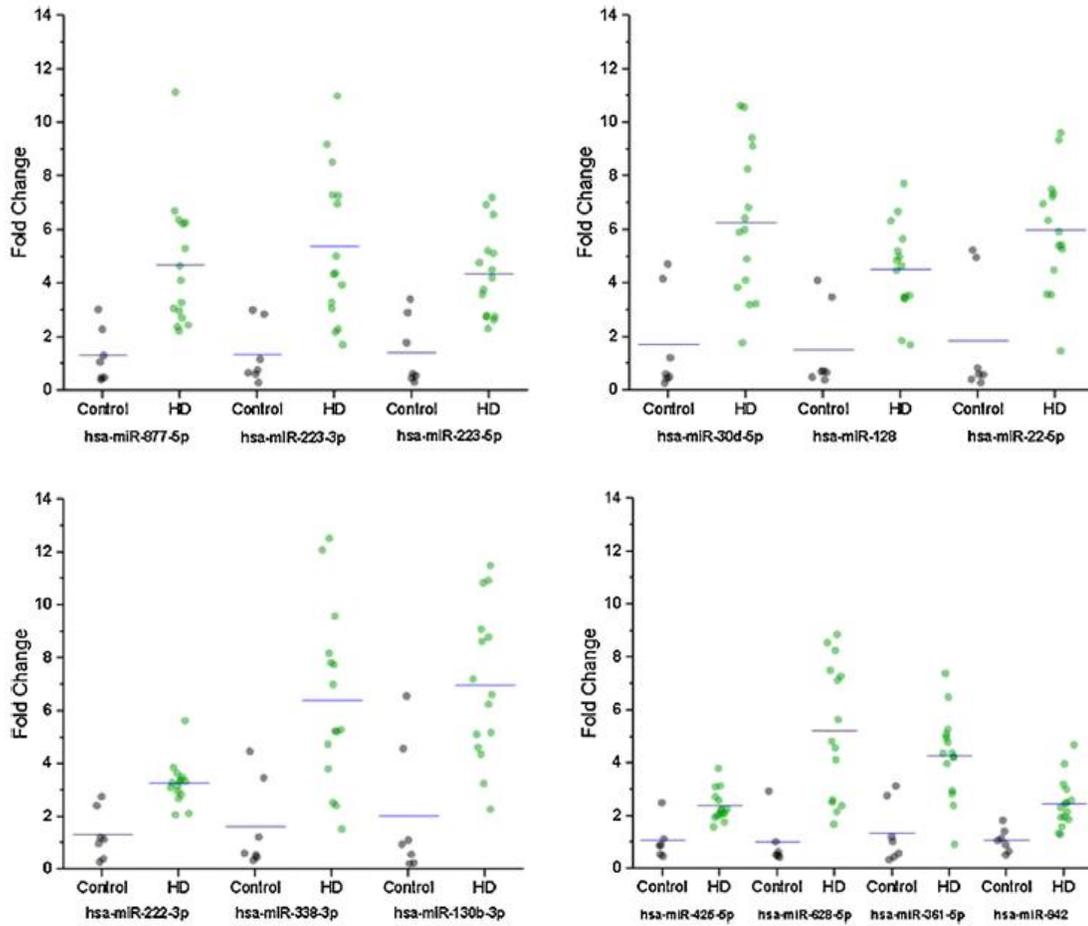


Fig. 17. miRNAs circulantes que cambiaron significativamente en pacientes con HD. La expresión de miRNAs circulantes de los sujetos controles (círculos grises) y pacientes con HD (círculos verdes) se analizó en 15 pacientes vs 7 sujetos controles (Diez-Planellas et al., 2016).

5. JUSTIFICACIÓN

En pacientes con SCA7, existe una diversidad en las características clínicas que van desde un estado asintomático hasta un fenotipo severo, debido en parte a la variabilidad en la edad de inicio de los síntomas y a la progresión de la enfermedad, particularmente de los síntomas cerebelosos y extracerebelosos. Esta diversidad en los fenotipos patológicos de SCA7 no es completamente dependiente de la longitud en el número de repetidos CAG, pero se cree que son regulados tanto por factores ambientales como genéticos. A la fecha, para determinar el proceso natural de la patología o la severidad de la ésta, se utilizan escalas neurológicas para identificar cambios sutiles en la enfermedad. Sin embargo, estas escalas no dejan de ser valoraciones subjetivas, que tienen un alto grado de variabilidad inter-observador, además de necesitar tener una amplia capacitación para el clínico, así como de una valoración extenuante en los pacientes. Por ello, es de gran importancia la identificación de biomarcadores que permitan monitorear el desarrollo natural de la enfermedad y que además puedan servir para mejorar el diagnóstico y definir la progresión de la enfermedad en SCA7. En este escenario, los miRNAs circulantes tienen un valor sin precedente debido a que se ha demostrado su papel diagnóstico, pronóstico y en la identificación de subtipos o fenotipos clínicos en otras enfermedades neurodegenerativas. Aunque en SCA7 se desconoce el papel de los miRNAs circulantes, en este trabajo nos propusimos obtener un perfil de expresión de éstos en una población significativa de pacientes, esto, nos permitirá ampliar la identificación de componentes neuroprotectores/neurotóxicos que están involucrados en la neurodegeneración de SCA7 y entender mejor los mecanismos patológicos, pero aún en mayor medida, identificar posibles marcadores objetivos para el seguimiento y valoración de la severidad de la patología, para que en un futuro puedan ser utilizados, incluso en la valoración de posibles alternativas terapéuticas.

6. HIPÓTESIS

Los miRNAs circulantes se expresan diferencialmente en pacientes con SCA7 en comparación con individuos sanos.

7. OBJETIVOS

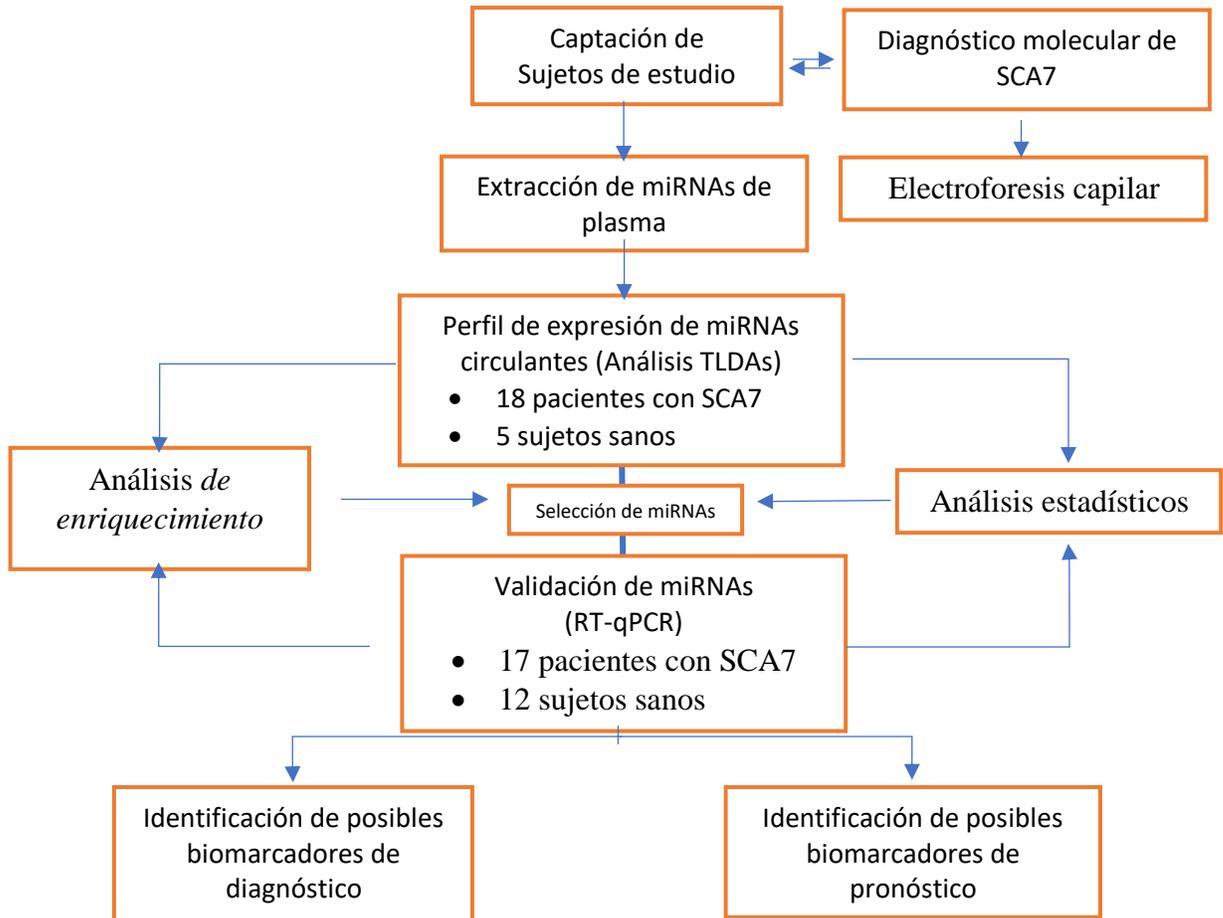
7.1 Objetivo General:

Determinar el perfil de expresión de miRNAs circulantes en pacientes con SCA7 y su posible asociación con la neurodegeneración.

7.2 Objetivos Particulares:

- Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs circulantes en muestras de plasma de pacientes con SCA7 respecto a sujetos sanos.
- Determinar si la desregulación de la expresión de miRNAs circulantes varía con respecto al fenotipo patológico (edad de inicio temprano o edad de inicio tardío).
- Realizar la validación de un conjunto de miRNAs a través de ensayos independientes de qRT-PCR.
- Determinar mediante análisis *de enriquecimiento* las vías de señalización en la que participan los miRNAs circulantes alterados.
- Identificar miRNAs con posible papel diagnóstico y pronóstico en SCA7.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Características del estudio

9.1.1 Sujetos de Estudio

Los sujetos de estudio incluyeron treinta y cinco pacientes mexicanos diagnosticados con SCA7 y diecisiete individuos sanos de la región central del estado de Veracruz, México, reclutados por el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y el Centro de Rehabilitación e Inclusión Social de Veracruz (CRIS-VER). Todos los sujetos participaron voluntariamente en la investigación y firmaron una carta de consentimiento informado (ANEXO 1). El estudio fue aprobado por el comité de Investigación y ética del Instituto Nacional de Rehabilitación-LGII (Registro 15/12).

a) Pacientes con SCA7

Criterios de Inclusión: Pacientes con diagnóstico molecular de SCA7 a través de electroforesis capilar. Todos los pacientes presentaron interrogatorio e historia clínica completa. Clínicamente fueron evaluados con los exámenes estándares neurológicos de acuerdo con los procedimientos de la Clínica Mayo (Denny-Brown et al., 1982). La evaluación de los síntomas cerebelosos se determinó usando la escala “Assessment and Rating of Ataxia” (SARA *por sus siglas en inglés*) (Schmitz-Hubsch et al., 2006) mientras que, la exploración de características extracerebelosas se llevó a cabo usando la escala “The Inventory of Non-ataxia symptoms” (INAS *por sus siglas en inglés*) (Schmitz-Hubsch et al., 2008) (ANEXOS 2 y 3). Todos los pacientes suspendieron la administración de fármacos, medicamentos y suplementos alimenticios con tres meses de antelación al estudio.

Criterios de exclusión: Pacientes con ataxia secundaria a alcoholismo, neoplasias, patología vascular, malformaciones congénitas, otras alteraciones genéticas, enfermedades crónico-degenerativas, autoinmunes e inflamatorias. Además se excluyeron individuos que presentaran infecciones, disfunción hepática, cáncer y embarazo. Se excluyeron sujetos con consumo de drogas, así como individuos con tratamientos farmacológicos, inmunosupresivos y desnutrición.

Criterios de eliminación: Se eliminaron los pacientes con muestra insuficiente para realizar los experimentos moleculares. Y todos aquellos sujetos a los que no se les haya realizado el 100% de los procedimientos requeridos o hayan abandonado el estudio por decisión propia.

b) Sujetos controles

Criterios de Inclusión: Individuos no relacionados o familiares de pacientes con diagnóstico molecular negativo para SCA7. Los individuos se seleccionaron considerando un mismo rango de edad, originarios de la misma región geográfica, además de condiciones de vida y dieta alimenticia similar al grupo de pacientes.

Criterios de exclusión: Se consideraron los mismos criterios descritos para el grupo de pacientes con SCA7 anteriormente descritos.

Criterios de eliminación: Se excluyeron sujetos sanos con muestra insuficiente para realizar los experimentos moleculares y todos aquellos a los que no se les haya realizado el 100% de los procedimientos requeridos.

c) Clasificación de pacientes

Para el estudio, los pacientes se distribuyeron en dos principales fenotipos: Pacientes con <46 repetidos CAG y cuyos síntomas clínicos surgieron en la edad adulta (AO) y pacientes >46 repetidos CAG y con inicio de síntomas en edades tempranas (EO) conforme a lo reportado previamente en la literatura (Velazquez-Perez et al., 2015).

9.1.2 Diagnóstico molecular de SCA7

El análisis de repetidos CAG se realizó con PCR de fluorescencia y electroforesis capilar. Brevemente, el DNA genómico se extrajo de leucocitos de sangre periférica usando GenraPuregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Dorschner y cols. (Dorschner et al., 2002) modificados por Magaña y cols (Magaña et al., 2014b), los cuales fueron marcados con diversos fluoróforos como se describe en la tabla 1.

Tabla1: Oligonucleótidos quiméricos específicos para cada tipo de SCA.

ID	DYE	SECUENCIA 5'→3'	(PB)
SCA1F	VIC	ggtcccaaaagggtcagtCAACATGGGCAGTCTGAG	
SCA1R		gcggtcccaaaagggtcagtAACTGGAAATGTGGACGTAC	270 + (CAG) _n
SCA2F	NED	aaaagggtcagtGGGCCCTCACCATGTCTG	
SCA2R		caaaagggtcagtCGGGCTTGC GGACATTGG	180 + (CAG) _n
SCA3F	FAM	gcggtcccaaaagggtcagtCCAGTGACTACTTTGATTCTG	
SCA3R		gcggtcccaaaagggtcagtTGGCCTTTCACATGGATGTGAA	350 + (CAG) _n
SCA6F	FAM	caaaagggtcagtCACGTGTCCTATTCCCCTGTGATCC	
SCA6R		aaagggtcagtTGGGTACCTCCGAGGGCCGCTGGTG	170 + (CAG) _n
SCA7F	NED	gcggtcccaaaagggtcagtTGTTACATTGTAGGAGCGGAA	
SCA7R		gtcccaaaagggtcagtCACGACTGTCCCAGCATCACTT	370 + (CAG) _n

R: iniciador antisentido; F: iniciador sentido
Letra mayúscula indica la secuencia del locus SCA; letra minúscula, secuencia M13MP18.

La PCR múltiple se desarrolla con un volumen total de 7µl, conteniendo: 0.6 µM de cada iniciador para SCA1, SCA2 y SCA6, 2.5 µM de cada iniciador para SCA3, 2.35 µM de cada iniciador SCA7, 400 µM de cada uno de los dNTPs, 0.6 µl del buffer 10X, 2 mM de MgCl₂ y 1.0 U de la DNA Taq. Polimerasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Germany). La reacción de PCR consistió en 29 ciclos, incluyendo un paso de desnaturalización a 95° C por 5 min, la hibridación a 58° C por 2 min y la polimerización a 68°C por 110 seg a través de un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Las alícuotas de cada reacción de PCR se mezclaron con formamida desionizada y el marcador de peso molecular (ABI GeneScan-500 TAMRA), el cual permite una precisa comparación con el tamaño de DNA que se evalúa en un rango de 35-500 pb. Posteriormente, la mezcla de reacción se lleva a un paso de desnaturalización a 95°C por 7 min, pasado este tiempo el tubo se colocó inmediatamente en hielo por 5 min y se corrió a través de la electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Bisystems, Foster City, CA, USA). Las condiciones de electroforesis capilar establecidas fueron 15 kV por 40 minutos a

60°C con un intervalo de 5 segundos en cada inyección. Los datos de genotipificación se analizaron con el software GENE SCAN.

9.2 Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con SCA7

Para realizar el perfil de microRNAs se emplearon 18 muestras de plasma de pacientes con diagnóstico positivo a SCA7 y 5 sujetos controles sanos (Tabla 7).

9.2.1 Extracción de miRNAs

La extracción de miRNAs en plasma de pacientes SCA7 se realizó con miRNeasy Mini Kit de Qiagen (No. De catálogo 217004) (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acuerdo con las condiciones de manufactura. Brevemente, aproximadamente 5 ml de sangre total periférica se colectaron en tubos con anticoagulante EDTA los cuales se centrifugaron a 2000g x 10 min a 4°C y se recuperó el plasma. A 600 µl de plasma de pacientes se les agregó 2 volúmenes de Quiazol, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregó 1/5 parte de cloroformo, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar a 12000 g x 15 min a 4°C para recuperar la fase acuosa. La fase acuosa se trató con 1.5 volúmenes de etanol al 100% y se mezcló por inversión del tubo; se transfirieron 700 µl de la mezcla a la minicolumna colocada sobre un tubo colector y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 seg a temperatura ambiente, se descartó la solución filtrada y se repitió el proceso hasta finalizar con la mezcla. Las columnas se lavaron una vez con 700 µl de buffer RWT y dos veces con 500 µl de buffer RPE por centrifugación a 10,000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. Los miRNAs se recuperaron en tubos de 1.5 ml eluyendo el RNA con 30 µl de agua libre de RNasas sobre la membrana y posteriormente centrifugando a 10,000 rpm por 1 min.

La concentración y pureza del RNA se determinaron mediante espectrofotometría a 260 nm en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Todas las muestras de RNA se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

9.2.2 Síntesis de cDNA

La retrotranscripción se llevó a cabo usando 90 ng de RNA total empleando el kit TaqMan microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) y un pool de primers megaplex RT (Human Pool-A; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) específicos para 384 miRNAs para realizar la síntesis simultánea de cDNAs de miRNAs maduros. La reacción de retrotranscripción se realizó con un volumen final de 15 µl mezclando los componentes descritos en la tabla 2.

Tabla 2: Reacción de síntesis de cDNA de miRNAs maduros.

Componente	Concentración
Megaplex RT primers	10X
dNTPs con dTTP	100 mM
Transcriptasa reversa MultiScribe	50 U/µl
Buffer de transcripción reversa	10X
Inhibidor de RNAsa	20 U/ µl
MgCl ₂	25 mM
RNA	90 ng
Agua libre de RNA	Hasta 7.5 µl

La amplificación se realizó por medio de un termociclador Gene Amp 9700 PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y las condiciones fueron las siguientes: 40 ciclos a 16 °C por 30 min; 42 °C por 30 min, seguido por un paso final a 80 °C por 5 min para inactivar la transcriptasa reversa.

9.2.3 Pre- Amplificación

Este paso permite incrementar las cantidades pequeñas de cDNA blanco para el análisis de expresión de genes, utilizando el kit MegaPlexPreAmp primer Human

Pool-A y el Kit PreAmpMasterMix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Colocar todos los siguientes componentes en un tubo de 0.2 ml como se indica en la tabla 3.

Tabla 3: Reacción de pre-amplificación de miRNAs maduros.

Componentes	Volumen
TaqMan PreAmp Master Mix	2X
Megaplex PreAmp Primers	10X
Agua libre de nucleasas	Hasta 25 µl
Mezclar y centrifugar brevemente	
cDNA	10X
Total	25 µl

Una vez hecha la mezcla, incubar la reacción durante 5 minutos en hielo. La reacción se realizó en un termociclador Gene Amp 9700 PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con las siguientes condiciones: 95°C por 10 minutos, 55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos, 12 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 4 min finalmente, mantener la reacción a 4°C.

Las muestras se almacenaron a -20 grados centígrados hasta su uso.

9.2.4 Sistema TaqMan Low Density Array (TLDA).

El perfil de expresión de miRNAs se obtuvo usando placas TaqMan Low Density Array (TLDA) microfluidic cards (Human miR ver 2.0; Applied Biosystems, Melbourne Australia). Este sistema consta de una placa (A) de 384 pozos donde cada una contiene primers TaqMan específicos y sondas para la detección de 380 diferentes miRNAs maduros humanos y 4 controles de RNA nucleolar. Inicialmente, se diluyeron los 25 µl de los productos pre-amplificados añadiendo 25 µl de buffer Tris-EDTA 0.1X pH 8; posteriormente en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclaron los reactivos que se describen en la tabla 4.

Tabla 4: Reacción del sistema TLDA para la identificación de 380 miRNAs maduros.

Componentes	Volumen
TaqMan Universal PCR Máster Mix No AmpEase UNG	2X
Agua libre de nucleasas	Hasta 900 μ l
Producto preamplificado diluido	10X
Total	900 μ l

Se cargaron cada uno de los 8 carriles de la placa TaqMan Human MicroRNA Array Set v2.0 (Placa A) con 100 μ l de la mezcla correspondiente, se centrifugaron las placas, se sellaron y se cargaron en el termociclador 7900 HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystem, Foster City, CA) donde se corrió el programa para 384 well TaqMan Low Density Array. Se realizó la qPCR por duplicado de una muestra y un control (Fig. 18).

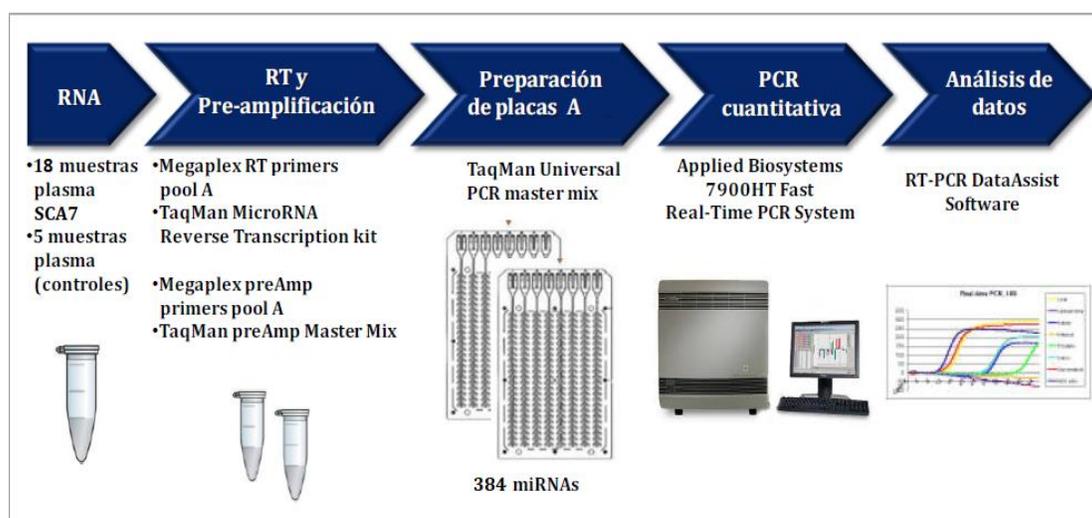


Figura 18: Procedimiento general para la obtención del perfil de miRNAs.

9.2.5 Análisis bioinformático y procesamiento de datos de ensayos TLDA.

Los valores de Ct (número de ciclo en el cual se ha alcanzado el 100% de la eficiencia de la amplificación del producto) de todas las placas se determinaron usando la línea basal automática y el umbral de 0.2. El análisis se realizó en el Data Assist Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA. USA). Los miRNAs que se

incluyeron en el análisis fueron todos aquellos con un valor máximo de Ct de 38. Se eliminaron todos los miRNAs que no se expresaron en por lo menos el 80% de las muestras o con más de 20% de análisis indeterminados.

Para definir a los miRNAs de referencia, se realizó un análisis de estabilidad (meanM) utilizando el algoritmo geNorm (http://genomebiology.com/2002/3/7/_research/0034); el cual permite determinar los genes de referencia más estables de un conjunto de genes candidatos (Vandesompele et al., 2002, Mestdagh et al., 2009). Los miRNAs candidatos se identificaron en la librería SlqPCR de la plataforma de Bioconductor y aquellos que mostraron una menor variabilidad de expresión entre todas las muestras evaluadas se seleccionaron como referencia. La normalización de los niveles de expresión relativa de los miRNAs se calculó con el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001, Schmittgen and Livak, 2008). El factor de normalización considera la media geométrica CT de los genes de referencia.

La significancia estadística se obtuvo calculando la *t* de student, los valores se ajustaron con la prueba de Benjamini-Hochberg para obtener el valor de *p* implementando la librería HTqPCR-limma en R. Los perfiles de expresión se ajustaron de acuerdo con las características clínicas, edad y sexo en HTqPCR-limma removiendo efectos de las variables confusoras. Los miRNAs que se consideraron diferencialmente alterados fueron aquellos con un valor de *p* <0.05 y valor de *p* ajustado <0.05 además de un fold change (FC) mayor a 1.

9.2.6 Análisis de Enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento de vías se realizó usando dos herramientas: A) Tool for annotations of MicroRNAs (TAM; <http://www.cuilab.cn/tam>; versión 2.0), mediante el cual se identificaron los miRNAs que se agrupaban en la misma familia, en la misma región genómica (cluster), o si estaban asociados a enfermedades y vías biológicas (no por predicción). Se evaluó la significancia estadística de cada

categoría con una prueba de Fisher con valor de $p < 0.05$, corrección con Bonferroni y FDR.

B) El análisis de enriquecimiento de vías de señalización para la firma de los miRNAs con valor diagnóstico de SCA7 se realizó con el programa miEAA (https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/mieaa_tool/?id=www/www-ccb/html/mieaa_tool/). Para la determinación de los valores estadísticamente significativos se realizó una prueba exacta de Fisher con valor de $p < 0.05$.

9.3 Selección y validación de miRNAs por qRT-PCR

Para la selección de miRNAs se determinaron los miRNAs con mayor cambio de expresión relativa y que estuvieran asociados a la afectación en otras enfermedades neurodegenerativas a través del análisis *in silico* en la base de datos miRWalk v2.0. Se seleccionaron 20 miRNAs maduros para su validación (Tabla 5).

Tabla 5: Sondas de los miRNAs validados que se encontraron diferencialmente expresados en SCA7.

miRNAs	Secuencia	No. en miRBase	ID ensayo TaqMan
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	MIMAT0000062	ID 000377
hsa-let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	MIMAT0000066	ID 002406
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	MIMAT0000414	ID 002282
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	MIMAT0000254	ID 002218
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	MIMAT0000070	ID 002308
hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	MIMAT0000072	ID 002422
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA	MIMAT0000073	ID 000395
hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	MIMAT0000075	ID 000580

hsa-miR-26a-5p	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	MIMAT0000082	ID 000405
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	MIMAT0000084	ID 000408
hsa-miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	MIMAT0000086	ID 002112
hsa-miR-30b-5p	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	MIMAT0000420	ID 000602
hsa-miR-132-3p	U AACAGUCUACAGCCAUGGUCG	MIMAT0000426	ID 000457
hsa-miR-148b-3p	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	MIMAT0000759	ID 000471
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	MIMAT0000278	ID 000524
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	MIMAT0000280	ID 002295
hsa-miR-323-3p	CACAUUACACGGUCGACCUCU	MIMAT0000755	ID 002227
hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUG	MIMAT0000761	ID 001136
hsa-miR-340-5p	UUUAAGCAAUGAGACUGAUU	MIMAT0004692	ID 002258
hsa-miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	MIMAT0000728	ID 000564

La validación se realizó en una cohorte independiente al ensayo TLDA conformada por 17 muestras de plasmas de pacientes con SCA7 (7 del grupo AO y 10 pacientes de EO) y 12 muestras de sujetos sanos controles (Tabla 14). La extracción de microRNAs, síntesis de cDNA y preamplificación se realizó como se mencionó anteriormente.

La extracción de microRNAs, síntesis de cDNA y preamplificación se realizó como se mencionó anteriormente.

9.3.1 Validación independiente con ensayos TaqMan

Para realizar los ensayos de qRT-PCR se usaron inicialmente 90 ng de RNA total y sondas individuales TaqMan miRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y primers de RT específicos para cada miRNA (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Pipetear los siguientes componentes en una placa de 96 pozos. La reacción de PCR se realizó en una placa de 96 pozos, considerando los controles negativos (NTC) y los duplicados bajo las concentraciones que indica la tabla 6.

Tabla 6: Reacción de qRT-PCR usando sondas taqMan específicas de los miRNAs para validación.

Componentes	Volumen
TaqMan Universal PCR Máster Mix No AmpEase UNG (2X)	2X
Producto preamplificado	1.33 μ l
TaqMan small RNA assay	20X
Agua libre de nucleasas	Hasta 10 μ l
Total	10 μ l

Una vez hecha la reacción, se colocaron las cantidades exactas en la placa de 96 pozos, se procedió a sellar la placa, centrifugar brevemente y colocarla en el StepOne-Real Time PCR system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). La reacción se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 50°C por 2 minutos para activar la UNG, 95°C por 10 minutos para la activación de la enzima y 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos.

9.3.2 Procesamiento de datos

Los valores de CT fueron procesados mediante la fórmula de $2^{-\Delta\Delta CT}$, que permite evaluar la expresión relativa de los genes y normalizar datos contra controles. Los miRNAs que se consideraron diferencialmente alterados fueron aquellos con un

valor de $p < 0.05$ y valor de p ajustado < 0.05 además de un fold change (FC) mayor a 1.

9.3.3 Análisis Univariado y curvas ROC

Para evaluar una posible asociación significativa de perfil de expresión de miRNAs y la severidad del fenotipo de la enfermedad, se realizó un análisis univariado (método descriptivo) entre estas variables con el paquete SAS Edition (remote version via virtual-machine).

Los valores de expresión normalizada ($2^{-\Delta\Delta CT}$) fueron estandarizados por z-score para definir la relación entre el patrón de expresión de miRNAs y el fenotipo de la enfermedad. La relación se evaluó a partir del conjunto de datos de los análisis TLDA y los ensayos de validación independiente. Se realizaron curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para calcular la especificidad y sensibilidad de los miRNAs y se graficaron con el paquete estadístico R.

9.3.4 Análisis de prognosis

Se realizó un análisis computacional para identificar miRNAs con potencial valor pronóstico de SCA7 con el paquete varSEIRF, usando el método de selección random forest (Diaz-Uriarte and Alvarez de Andres, 2006, Diaz-Uriarte, 2007). El coeficiente de correlación de Pearson se usó para evaluar la relación entre la expresión de hsa-miR-35-3p en el plasma de los pacientes contra las pruebas de SRA e INAS. La significancia estadística fue aquella con valor de $p < 0.05$. El software STATA 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA) se usó para los cálculos.

9.3.5 Análisis estadístico

Las características clínicas y demográficas de todos los sujetos se representan como desviación estándar \pm (SD). Se aplicó una estadística descriptiva para determinar las características individuales entre los pacientes con SCA7 y los sujetos del grupo control a través de la prueba Mann-Whitney determinar variables continuas y la

fórmula de Chi-cuadrada (X^2) o la prueba exacta de Fisher (bilateral) para variables categóricas. Los cálculos se realizaron en el paquete estadístico Stata ver. 10.0 (StataCorp, College station, TX, USA). Los análisis bioinformáticos tanto para el estudio de TLDA y ensayo independiente, así como los análisis de enriquecimiento y determinación de valores diagnóstico y pronóstico se describen a detalle en las secciones anteriores.

10. RESULTADOS

10.1 Perfil de miRNAs circulantes en pacientes con SCA7

Para determinar si la presencia de la mutación en pacientes con SCA7 afecta el perfil de expresión de miRNAs circulantes, desarrollamos un análisis global de miRNAs en muestras de plasma de 18 pacientes y comparamos con 5 sujetos controles cuyas características clínicas y demográficas se detallan en la tabla 7.

Tabla 7: Características clínicas de pacientes y sujetos controles para ensayos TLDA.

	Sujetos controles	Pacientes SCA7 Inicio adulto (AO)	Pacientes SCA7 Inicio temprano (EO)
Ensayo TLDA's			
Número	5	9	9
Femenino/Masculino	3/2	4/5	4/5
Edad	45.2 ± 15.2	48.6 ± 7.4	25.1 ± 4.7
Edad de inicio visual	NA	39.88 ± 6.5	18.9 ± 4.5
Edad de inicio motor	NA	43 ± 7.2	18.8 ± 3.8
Duración de la enfermedad	NA	9 ± 4	7 ± 4
Repetidos CAG	10.4 ± 0.8	42.3 ± 2	53.5 ± 5
SARA	NA	14.77 ± 5.8	20.8 ± 10.8
INAS	NA	3.5 ± 0.7	5.1 ± 2.3

Las escalas neurológicas SARA e INAS se usaron para evaluar las características cerebelares y extracerebelares en los pacientes.

Usando ensayos TLDA, diseñados para evaluar 384 miRNAs maduros en humanos, fuimos capaces de detectar 252 miRNAs en el plasma de los pacientes y sujetos controles con un CT ≤ 38 bajo todas las condiciones experimentales. Para normalizar los datos de expresión de los miRNAs circulantes, seleccionamos controles endógenos que mostraran un patrón de expresión estable e idéntico en el 100% de las muestras de plasma y una distribución similar. Para cada control, el algoritmo geNORM determinó la variación de expresión (M) con respecto a otros genes y la desviación estándar (Sta Dev). Los genes con los valores de M y desviación estándar más bajos representaron una expresión más estable en cada una de las muestras (Fig. 19a). Mediante un análisis de variación múltiple se determinó

el número óptimo de genes de referencia (Fig.19b), para este análisis utilizamos 2 genes de referencia: snRNAU6 y hsa-miR-483-5p los cuales tuvieron valores de CT ≤ 30 (Fig. 19c). Para identificar los miRNAs diferencialmente expresados se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ contemplando la media geométrica de ambos genes de referencia.

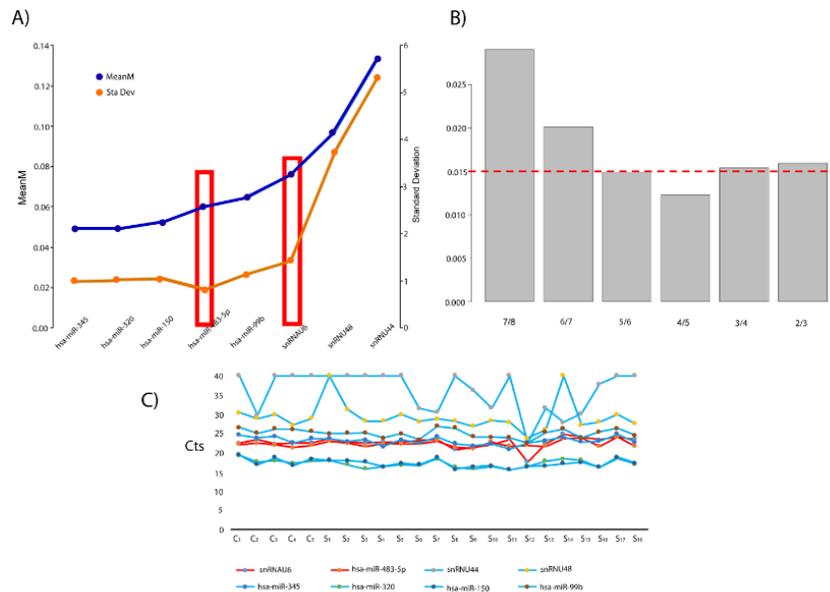


Fig. 19: Selección de controles endógenos para los análisis de expresión de miRNAs. A) Valor meanM y desviación estándar de snRNAU6 y hsa-miR-483-5p, los miRNAs con expresión más estable seleccionados para normalización. B) Cada valor de variación mutiple es 0.15, por debajo del valor, no se requiere incluir genes de referencia adicional. C) Gráfica de datos de expresión (Cts) de los controles endógenos seleccionados (líneas rojas para ambos) en muestras de pacientes con SCA7 (G_n) y controles sanos (C_n).

Además de la normalización con los genes de referencia, los datos de expresión de los miRNAs se ajustaron por edad y sexo realizando un modelo lineal con el programa Bioconductor HTqPCR-limma. Tomando en cuenta estas consideraciones, el perfil de expresión de miRNAs circulantes mostró 71 miRNAs (Tabla 8) significativamente aumentados en los pacientes con SCA7 con respecto a los controles, como se muestra en el mapa de calor y grafica de Volcán (Fig. 20a y b).

Tabla 8: miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con SCA7 con respecto a sujetos controles.

miRNA ID (mirBase v22)	miRbase Id	p.val	adj.p.val	FC
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	0,00008	0,0104	43,9829
hsa-miR-148b-3p	MIMAT0000759	0,0048	0,0182	21,1554
hsa-miR-18a-5p	MIMAT0000072	0,0016	0,0163	13,5955
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	0,0004	0,0118	10,9762
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	0,0011	0,0163	9,9867
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	0,0004	0,0118	9,8074
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	0,0012	0,0163	9,935
hsa-miR-539-5p	MIMAT0003163	0,0006	0,0149	10,9541
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	0,0012	0,0163	8,4155
hsa-miR-652-3p	MIMAT0003322	0,0029	0,0172	8,7644
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	0,0055	0,0182	7,3233
hsa-miR-330-3p	MIMAT0000751	0,0201	0,0371	6,7661
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	0,0016	0,0163	7,0355
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	0,0041	0,0182	6,2481
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	0,0056	0,0182	6,2437
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	0,0027	0,0171	6,917
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	0,0055	0,0182	5,922
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	0,0002	0,0104	6,215
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	0,0025	0,0168	5,8612
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	0,0038	0,0181	6,8961
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	0,0075	0,0211	5,0146
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	0,0021	0,0168	5,4836
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	0,0045	0,0182	5,6809
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	0,0013	0,0163	6,0926
hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727	0,0165	0,0333	5,7164
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	0,0031	0,0172	5,9443
hsa-miR-486-3p	MIMAT0004762	0,0105	0,0265	4,7093
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	0,0018	0,0163	6,0002
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	0,0015	0,0163	6,1098
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	0,0032	0,0175	5,2649
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	0,0064	0,0197	5,0907
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	0,0085	0,0222	5,4534
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	0,0001	0,0104	6,0917
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	0,0049	0,0182	5,6006
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	0,0044	0,0182	5,0335
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	0,0077	0,0211	5,0827
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	0,0054	0,0182	4,6539
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	0,0138	0,0292	4,432
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	0,0025	0,0168	5,2581
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	0,0079	0,0212	4,2768
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	0,0139	0,0292	3,9359
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	0,0024	0,0168	4,9209
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	0,0161	0,0328	3,9687
hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	0,0082	0,0218	4,588
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	0,0073	0,0211	4,6849
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	0,0091	0,0233	4,2493
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	0,0057	0,0184	4,0716
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	0,0181	0,0358	4,4009
hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	0,0282	0,0479	3,4221
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	0,0261	0,0459	3,6619

hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	0,0071	0,0211	4,5045
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	0,0051	0,0182	3,5676
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	0,0122	0,0291	4,2082
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	0,0133	0,0292	4,0489
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	0,0048	0,0182	4,1976
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	0,0189	0,0371	4,3371
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	0,0033	0,0175	3,8156
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	0,0064	0,0197	4,1163
hsa-miR-484	MIMAT0002174	0,0077	0,0212	3,6239
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	0,0189	0,0371	4,3371
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	0,0203	0,0371	3,2067
hsa-miR-92a-3p	MIMAT0000092	0,0272	0,0468	2,9754
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	0,0132	0,0292	3,2879
hsa-miR-425-5p	MIMAT0003393	0,0202	0,0371	3,2502
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	0,011	0,0272	3,4832
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	0,0125	0,0291	3,2113
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	0,0194	0,0371	2,9728
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	0,0048	0,0183	3,5995
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	0,0131	0,0292	3,1014
hsa-miR-375-3p	MI0000783	0,0266	0,0463	2,8554
hsa-miR-215-5p	MIMAT0000272	0,0301	0,0497	2,3977

10.1.2 Ontología de miRNAs circulantes alterados en pacientes con SCA7

Para determinar la funcionalidad de los 71 miRNAs alterados en SCA7, decidimos realizar ensayos *in silico* utilizando la herramienta bioinformática TAM (Tool for annotations of human miRNAs) y de esta manera analizar las vías biológicas que pudieran estar siendo afectadas en SCA7. El análisis reveló que de estos 71 miRNAs, 24 están involucrados en regulación hormonal, 15 en diferenciación adipocítica, 16 son reconocidos onco-miRNAs y otros más participan en procesos de regulación celular, hematopoyesis, angiogénesis y de mayor importancia, apoptosis y muerte celular (Tabla 9 y 10). Además, encontramos 2 familias de miRNAs alterados lo que significa que tienen un mismo precursor y pueden llegar a actuar sobre un mismo RNA mensajero blanco. La familia let-7 que corresponde a los miRNAs: hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-let-7e-5p y hsa-let-7g-5p y la familia miR-17 para los miRNAs: hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-106a-5p y hsa-miR-106b-5p. Así mismo se encontró una región policistrónica (cluster) de miRNAs, lo que significa que se regulan de manera conjunta por lo que podrían alterar una vía particular específica durante la enfermedad, estos miRNAs son: hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-20a-5p y hsa-miR-92a-3p. El análisis de TAM demostró

además que cinco miRNAs (hsa-let-7b, hsa-miR-139, hsa-miR-146a, hsa-miR-328 y hsa-miR-342) se han encontrado asociados a enfermedades neurodegenerativas anteriormente descritas, seis de las cuales (hsa-miR-20a, hsa-miR-106b, hsa-miR-146a, hsa-miR-17, hsa-miR-29a y hsa-miR-20b) se han alterado en Alzheimer y 2 (hsa-miR-21 y hsa-miR-146b) en gliomas (Tabla 9).

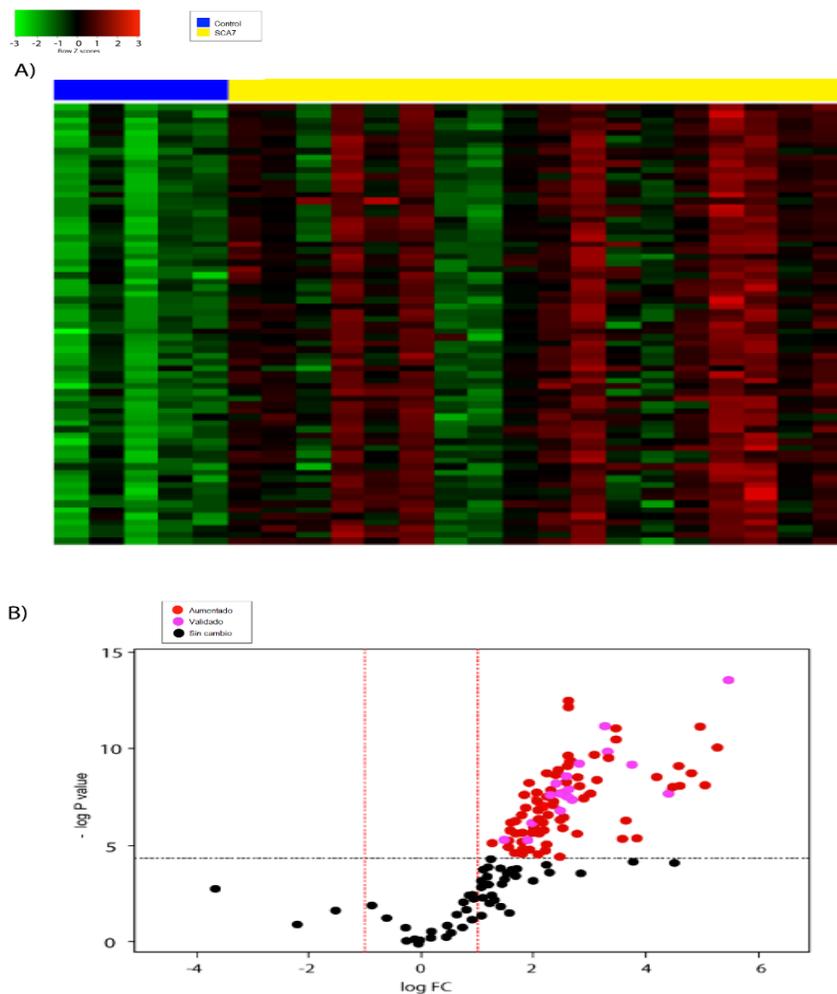


Figura 20: Perfil de expresión de miRNAs circulantes en pacientes con SCA7. A) Grafica de calor de miRNAs evaluados en SCA7, se muestran en rojo los miRNAs aumentados y en verde los que se encontraron disminuidos. Las columnas corresponden a los diferentes sujetos analizados. miRNAs con un cambio de expresión >1 ($p < 0.05$) fueron considerados aumentados. B) Graficas de Volcán de miRNAs diferencialmente expresados. Valor de corte de $p=0.05$ en el eje de las y ($-\log_{10} 0.05=4$) y una tasa de cambio >1 en el eje de las x ($\log_2=1$). Los puntos por encima de la línea punteada representan los miRNAs diferencialmente expresados, el cuadrante izquierdo representa miRNAs aumentados y el cuadrante derecho los miRNAs disminuidos.

Tabla 9: Análisis de enriquecimiento de miRNAs alterados en SCA7 por TAM.

	#	%	FC	p-val	Bonferroni	FDR
Vía Biológica						
Regulación hormonal	24	0.39	3.0797	1.35E-08	3.37E-06	6.63E-07
Diferenciación adipocítica	15	0.56	4.4199	3.71E-08	9.28E-06	1.54E-06
onco-miRNAs	16	0.52	4.1063	4.87E-08	1.22E-05	1.88E-06
Regulación de células madres embrionarias	27	0.32	2.5272	1.88E-07	4.69E-05	5.98E-06
Angiogénesis	12	0.5	3.9779	4.90E-06	1.23E-03	1.33E-04
Hematopoyesis	13	0.42	3.3363	2.15E-05	5.38E-03	4.32E-04
División celular	9	0.53	4.2119	5.04E-05	1.26E-02	9.40E-04
Proliferación celular	7	0.64	5.0628	8.11E-05	2.03E-02	1.25E-03
Apoptosis	15	0.34	2.7122	8.67E-05	2.17E-02	1.27E-03
Muerte celular	17	0.31	2.4591	1.11E-04	2.79E-02	1.55E-03
Familia						
Familia let-7	6	0.67	5.3039	1.98E-04	0.0496	2.50E-03
Familia mir-17	6	0.75	5.9669	7.34E-05	0.0184	1.17E-03
Cluster						
hsa-mir-17 cluster	4	0.67	5.3099	2.83E-03	0.7083	0.0213
Enfermedades						
Enfermedades neurodegenerativas	5	0.71	5.6828	4.70E-04	0.1175	4.89E-03
Enfermedad de Alzheimer	6	0.55	4.3396	8.86E-04	0.2214	8.41E-03
Glioma	2	0.32	2.5459	7.70E-03	1	0.0468

La significancia estadística se tomó con los valores de $p < 0.05$ y $FDR < 0.05$.

10.2 Diferencial de expresión de miRNA circulantes con respecto al fenotipo del paciente.

Como se ha establecido anteriormente, en SCA7 se han identificado fenotipos patológicos de la enfermedad que dependen del número de repetidos CAG y define el inicio de la enfermedad y la severidad de los síntomas. Anteriormente, nuestro grupo de trabajo estableció que la población de estudio se caracterizan principalmente por la presencia de dos fenotipos patológicos; pacientes de inicio temprano cuyos alelos tienen un rango de >46 repetidos CAG y pacientes de inicio adulto con un rango de <46 repetidos (Velazquez-Perez et al., 2015).

Tabla 10: Análisis de Enriquecimiento de los 71 miRNAs alterados en los pacientes con SCA7.

Vía biológica	miRNAs alterados
Regulación hormonal	hsa-miR-24-3p;hsa-miR-25-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-375-3p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p; hsa-let-7a-5p ; hsa-miR-126-3p; hsa-miR-27a-3p;hsa-miR-20a-5p;hsa-miR-29a-3p;hsa-miR93-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-16-5p; hsa-miR-484; hsa-miR-92a-3p;; hsa-miR-18a-5p ; hsa-miR-296-5p; hsa-miR-139-5p; hsa-miR-106b-5p; hsa-miR-133a-3p; hsa-miR-106a-5p; hsa-miR-146a-5p.
Diferenciación adipocítica	hsa-let-7b-5p; hsa-let-7c-5p; hsa-let-7a-5p ; hsa-let-7g-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-let-7e-5p ; hsa-miR-27a-3p; hsa-let-7d-5p; hsa-miR-130a-3p; hsa-miR-18a-5p ; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-375-3p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p.
onco-miRNAs	hsa-miR-24-3p;hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-106a-5p; hsa-miR-191-5p; hsa-miR-106b-5p; hsa-miR-27a-3p; hsa-miR-18a-5p ; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-93-5p; hsa-miR-224-5p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p; hsa-miR-146b-5p.
Regulación de células madres embrionarias	hsa-miR-24-3p; hsa-miR-25-3p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-148b-3p; hsa-miR-148a-3p; hsa-miR-145-5p; hsa-miR-142-3p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p; hsa-miR-126-3p; hsa-miR-27a-3p; hsa-miR-30b-5p ; hsa-miR-30c-5p; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-486-5p; hsa-miR-93-5p; hsa-miR-323a-3p; hsa-miR-125a-5p; hsa-miR-296-5p; hsa-miR-106b-5p; hsa-miR-106a-5p; hsa-miR-26a-5p; hsa-miR-146b-5p; hsa-miR-146a-5p.
Angiogénesis	hsa-let-7b-5p; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-18a-5p ; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-16-5p; hsa-miR-296-5p; hsa-miR-130a-3p; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-126-3p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p.
Hematopoyesis	hsa-miR-20a-5p; hsa-let-7a-5p ; hsa-miR-17-5p;hsa-miR-126-3p; hsa-miR-133a-3p; hsa-miR-145-5p; hsa-miR-142-3p; hsa-miR-18a-5p ; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p; hsa-miR-29a-3p.
División celular	hsa-let-7b-5p; hsa-let-7c-5p; hsa-let-7a-5p ; hsa-let-7g-5p; hsa-let-7d-5p; hsa-miR-16-5p; hsa-let-7e-5p ; hsa-miR-27a-3p; hsa-miR-106b-5p.
Proliferación celular	hsa-let-7b-5p; hsa-let-7c-5p; hsa-let-7a-5p ; hsa-let-7g-5p; hsa-let-7d-5p; hsa-miR-16-5p; hsa-let-7e-5p .
Apoptosis	hsa-miR-20a-5p; hsa-let-7c-5p; hsa-miR-18a-5p ; hsa-let-7g-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-16-5p; hsa-miR-148a-3p; hsa-miR-27a-3p; hsa-miR-26a-5p;hsa-miR-21-5p; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-29a-3p; hsa-miR-146a-5p; hsa-miR-222-3p; hsa-miR-221-3p.
Muerte celular	hsa-let-7b-5p; hsa-miR-25-3p; hsa-let-7a-5p ; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-16-5p; hsa-let-7e-5p ; hsa-miR-145-5p; hsa-miR-222-3p; hsa-let-7d-5p; hsa-miR-18a-5p ; hsa-miR-20a-5p; hsa-miR-92a-3p; hsa-miR-146a-5p; hsa-let-7c-5p; hsa-miR-221-3p; hsa-let-7g-5p.

Para determinar si esta alteración de miRNAs circulantes varía con respecto al fenotipo patológico de la enfermedad, se decidió realizar el análisis de miRNAs circulantes por fenotipo, uno de inicio temprano (EO) cuyas características clínicas motoras y visuales son mayormente afectadas y un grupo de pacientes de inicio adulto (AO) con menor grado de afectación (Tabla 7). Cuando se comparó el perfil de expresión de miRNAs circulantes de pacientes AO con sujetos controles, encontramos que 47 miRNAs (Tabla 11) aumentaron en los pacientes (Fig. 21a y b) mientras que, en pacientes EO se encontraron 60 miRNAs (Tabla 12) aumentados con respecto a los sujetos controles (Fig. 21c y d). Estos resultados claramente demuestran que a mayor severidad de síntomas existe una mayor desregulación de miRNAs lo que sugiere que éstos se asocian con el fenotipo patológico y que por lo tanto podrían ser importantes para monitorear el curso de la enfermedad. De los 47 miRNAs circulantes alterados en el perfil AO y los 60 de los pacientes EO, se encontró que; 35 miRNAs se alteraron en ambos fenotipos patológicos, mientras que, 12 fueron específicos del fenotipo AO y 25 fueron específicos de EO (Fig. 21e). Además, los miRNAs circulantes diferencialmente expresados fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA), demostrando una diversificación de los diferentes grupos de análisis; pacientes SCA7 vs Sujetos controles; AO vs controles y; EO vs controles, con un componente principal (PC1, PC2 y PC3) y que representó un porcentaje de variabilidad acumulada de 69.62%, 68.85% y 65.49% respectivamente (Fig. 22a-c).

Tabla 11: miRNAs diferencialmente expresados en pacientes AO con respecto a sujetos controles.

miRNA ID (mirBase v22)	miRbase Id	p.val	adj.p.val	FC
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	0,0014	0,0917	40,0119
hsa-miR-652-3p	MIMAT0003322	0,0129	0,1068	9,5868
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	0,0294	0,1068	6,1836
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	0,0103	0,1068	8,1024
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	0,0034	0,0917	10,2842
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	0,0110	0,1068	7,7811
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	0,0245	0,1068	5,4941

hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	0,0155	0,1068	6,9727
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	0,0032	0,0917	5,8542
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	0,0328	0,1068	4,8835
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	0,0440	0,1127	4,5378
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	0,0358	0,1068	5,1747
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	0,0350	0,1068	4,9863
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	0,0247	0,1068	6,4565
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	0,0315	0,1068	4,8955
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	0,0230	0,1068	5,1866
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	0,0201	0,1068	4,8575
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	0,0274	0,1068	5,8007
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	0,0115	0,1068	6,0359
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	0,0036	0,0917	8,0242
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	0,0372	0,1068	4,4561
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	0,0372	0,1068	4,4561
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	0,0235	0,1068	4,9548
hsa-miR-744-5p	MIMAT0004945	0,0211	0,1068	6,2043
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	0,0219	0,1068	5,7348
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	0,0413	0,1116	5,1386
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	0,0125	0,1068	5,6034
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	0,0169	0,1068	5,0799
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	0,0025	0,0917	5,9241
hsa-miR-25-3p	MIMAT0000081	0,0442	0,1127	4,0946
hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455	0,0367	0,1068	4,5263
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	0,0236	0,1068	6,4684
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	0,0311	0,1068	4,8652
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	0,0323	0,1068	4,3350
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	0,0197	0,1068	5,0451
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	0,0348	0,1068	4,8353
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	0,0500	0,1233	4,2508
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	0,0207	0,1068	4,3735
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	0,0164	0,1068	4,7743
hsa-miR-484	MIMAT0002174	0,0340	0,1068	3,6149
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	0,0287	0,1068	4,1398
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	0,0349	0,1068	3,2952
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	0,0322	0,1068	3,8832
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	0,0227	0,1068	3,6390
hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809	0,0292	0,1068	3,8668
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	0,0094	0,1068	4,4509
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	0,0440	0,1127	3,1886

.Tabla 12: miRNAs diferencialmente expresados en pacientes EO con respecto a sujetos controles.

miRNA ID (mirBase v22)	miRbase Id	p val	adj.p.val	FC
hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	0,0015	0,044	49,085
hsa-miR-340-5p	MIMAT0004692	0,0068	0,0569	47,7572
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	0,0499	0,1045	76,6182
hsa-miR-148b-3p	MIMAT0000759	0,0035	0,044	63,85
hsa-miR-18a-5p	MIMAT0000072	0,0012	0,044	34,4101
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	0,0398	0,0938	11,9419
hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	0,0021	0,044	15,6085
hsa-miR-539-5p	MIMAT0003163	0,0066	0,0569	12,01
hsa-miR-365a-3p	MIMAT0000710	0,0102	0,0599	11,1756
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	0,0073	0,0569	9,2821
hsa-miR-30b-5p	MIMAT0000420	0,0091	0,0599	9,8379
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	0,0096	0,0599	9,2163
hsa-miR-323a-3p	MIMAT0000755	0,0032	0,044	9,7676
hsa-miR-330-3p	MIMAT0000751	0,0337	0,0937	10,2502
hsa-miR-342-5p	MIMAT0004694	0,0453	0,1009	6,2315
hsa-miR-224-5p	MIMAT0000281	0,0023	0,044	17,2193
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	0,0037	0,044	10,7143
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	0,0152	0,0741	7,7749
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	0,0165	0,0756	6,9873
hsa-miR-145-5p	MIMAT0000437	0,022	0,0814	7,4277
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	0,0112	0,063	7,4991
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	0,0323	0,0937	6,066
hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	0,0096	0,0599	6,7137
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	0,0313	0,0937	5,6191
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	0,0226	0,0814	6,8529
hsa-miR-652-3p	MIMAT0003322	0,0291	0,0929	7,8984
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	0,0029	0,044	6,6613
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	0,0115	0,063	6,3114
hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	0,003	0,044	6,292
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	0,0331	0,0937	5,4079
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	0,0127	0,0647	6,4375
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	0,0382	0,0938	5,8427
hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	0,0253	0,0861	5,5531
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	0,0385	0,0938	4,4538
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	0,0459	0,1009	4,238
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	0,0345	0,0938	7,6722
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	0,0229	0,0814	5,5698
hsa-miR-339-3p	MIMAT0004702	0,017	0,0756	5,9591
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	0,0181	0,0756	5,0967

hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	0,0462	0,1009	4,2102
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	0,0272	0,0906	5,1036
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	0,0387	0,0938	4,5841
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	0,0284	0,0926	5,1264
hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093	0,0333	0,0937	5,3421
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	0,0182	0,0756	5,4726
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	0,032	0,0937	3,8241
hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445	0,03	0,0937	4,3016
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	0,0155	0,0741	7,1488
hsa-miR-28-5p	MIMAT0000085	0,0489	0,1039	5,158
hsa-miR-486-5p	MIMAT0002177	0,0239	0,083	3,912
hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	0,0024	0,044	9,3327
hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	0,0206	0,0814	4,0312
hsa-miR-375-3p	MIMAT0000728	0,0362	0,0938	3,7928
hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449	0,0378	0,0938	4,0024
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	0,0352	0,0938	4,9649
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	0,0211	0,0814	5,715
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	0,0394	0,0938	4,0893
hsa-miR-484	MIMAT0002174	0,0436	0,0995	3,6344
hsa-miR-215-5p	MIMAT0000272	0,0477	0,1029	2,9416
hsa-miR-618	MIMAT0003287	0,0071	0,0568	0,0093

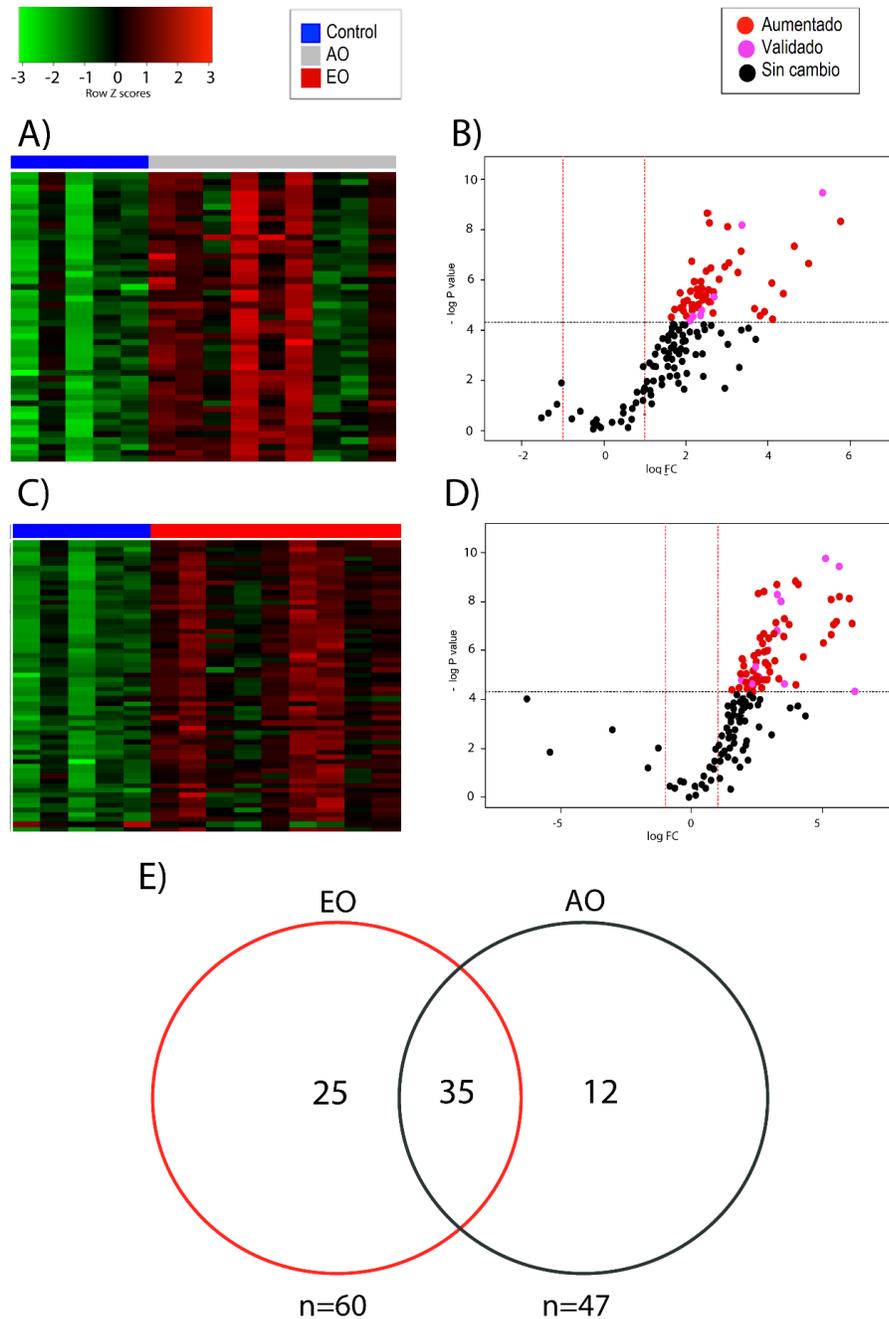


Figura 21: Perfil de expresión de miRNAs circulantes alterados en pacientes AO y EO. Grafica de calor de miRNAs circulantes evaluados en pacientes AO (A) y EO (B). miRNAs con un cambio de expresión >1 ($p < 0.05$) fueron considerados aumentados. B y D) Graficas de Volcán de miRNAs diferencialmente expresados en ambos fenotipos. Valor de corte de $p = 0.05$ en el eje de las y ($-\log_{10} 0.05 = 4$) y una tasa de cambio >1 en el eje de las x ($\log_2 = 1$). E) Diagrama de Venn que muestra los miRNAs que se encontraron alterados en común e individualmente por fenotipo.

Con los resultados obtenidos del perfil de expresión de miRNAs circulantes en ambos fenotipos; AO y EO, decidimos realizar nuevamente un análisis de enriquecimiento para determinar las vías biológicas en las que participan los miRNAs y que pudieran estar relacionados con la severidad del fenotipo. Como podemos ver en la tabla 6, las vías biológicas afectadas en AO y EO son muy similares, pues en ambos se pudieron identificar miRNAs que participan en: Regulación hormonal, onco-miRNAs, regulación de células madres, respuesta inmune, hematopoyesis, ciclo celular y diferenciación adipocítica. Es importante notar, sin embargo, que en los pacientes AO se identificaron específicamente las vías de inflamación, angiogénesis y supresor de tumor, mientras que, en los pacientes EO se identificaron 8 miRNAs asociados a VIH y, de manera más interesante, 13 miRNAs que participan en la apoptosis y 8 en la vía AKT (Tabla 13).

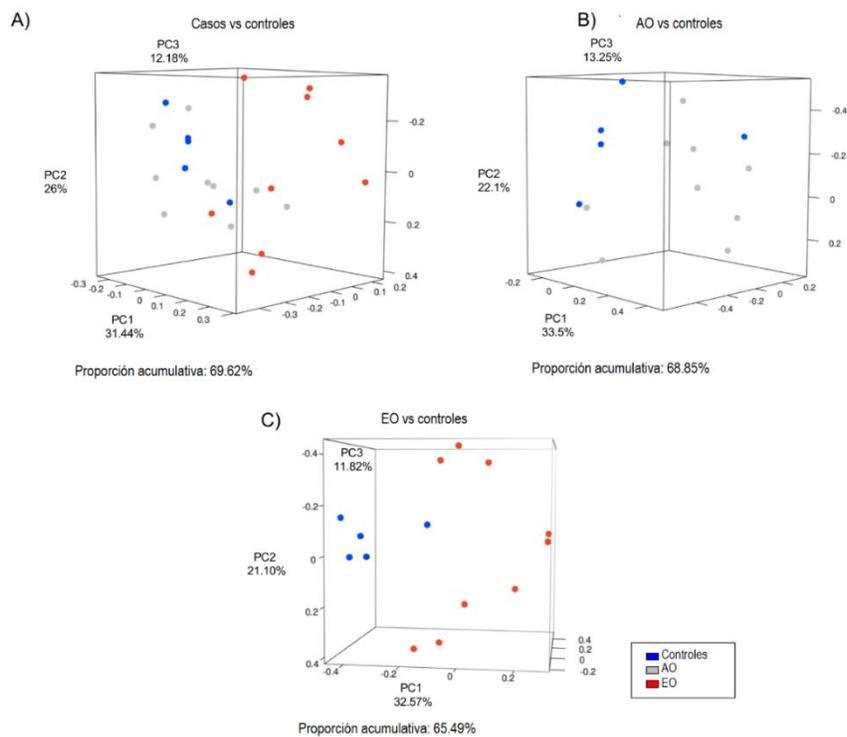


Figura 22: Análisis de componentes principales de los miRNAs circulantes diferencialmente expresado. A) Análisis de pacientes SCA7 vs controles; B) AO vs sujetos controles y; C) EO vs sujetos controles del conjunto de muestras analizadas con TLDA. Se muestra el porcentaje de varianza de cada componente y el porcentaje acumulado.

Tabla 13: Análisis de enriquecimiento de miRNAs alterados en pacientes AO y EO con SCA7 por TAM.

		#	%	FC	Valor de p	Bonferroni	FDR
AO-SCA7							
1	Regulación Hormonal	20	0.32	3.7938	4.66E-09	1.02E-06	4.20E-07
2	Onco-miRNAs	13	0.42	4.932	1.49E-07	3.27E-05	7.35E-06
3	Regulación de células madres embrionarias	21	0.25	2.9056	3.78E-07	8.28E-05	1.57E-05
4	Hematopoyesis	11	0.35	4.1732	1.21E-05	2.66E-03	3.65E-04
5	Diferenciación adipocítica	10	0.37	4.3559	2.12E-05	4.64E-03	5.74E-04
6	Inflamación	12	0.29	3.4422	4.34E-05	9.50E-03	1.02E-03
7	Angiogénesis	9	0.38	4.4103	5.30E-05	1.16E-02	1.02E-03
8	Ciclo celular	15	0.23	2.6729	1.07E-04	2.35E-02	2.15E-03
9	Respuesta inmune	12	0.25	2.9402	2.45E-04	0.0536	4.14E-03
10	Supresor de tumor	10	0.27	3.1786	4.56E-04	0.0999	7.26E-03
EO-SCA7							
1	onco-miRNAs	15	0.48	4.6745	2.29E-08	5.51E-06	1.77E-06
2	Regulación de células madres embrionarias	23	0.27	2.6141	1.00E-06	2.41E-04	3.87E-05
3	hematopoyesis	13	0.42	4.0513	1.97E-06	4.75E-04	7.11E-05
4	Regulación Hormonal	18	0.29	2.8047	8.21E-06	1.98E-03	2.34E-04
5	Diferenciación adipocítica	11	0.41	3.9358	2.00E-05	0.0416	4.91E-04
6	Vía AKT	8	0.47	4.5462	9.42E-05	0.1358	2.21E-03
7	Apoptosis	13	0.3	2.8543	1.73E-04	0.2735	0.0153
8	Latencia VIH	8	0.38	3.6803	5.64E-04	0.3024	0.0162
9	Sistema inmune	7	0.39	3.7569	1.13E-03	2.74E-01	1.53E-02
10	Ciclo celular	15	0.23	2.1956	1.25E-03	3.02E-01	1.62E-02
La significancia estadística se tomó con los valores de $p < 0.05$ y $FDR < 0.05$.							

10.3 Validación de miRNAs circulantes alterados en pacientes con SCA7 em ambos fenotipos patológicos.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos en los ensayos TLDA, seleccionamos 20 miRNAs para validarlos de manera independiente por ensayos de PCR tiempo real en una nueva cohorte de pacientes (Tabla 14), de esta manera, podemos confirmar que la alteración de miRNAs circulantes tiene el mismo comportamiento en cualquier población de pacientes con SCA7. De los 20 miRNAs validados, los miRNAs: hsa-let-7e-5p y hsa-miR-132-3p son miRNAs que se alteraron específicamente en pacientes AO, mientras que los miRNAs: hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-324-3p y hsa-miR-375-3p fueron específicos de pacientes EO, 8 de estos miRNAs se alteraron en ambos fenotipos.

Tabla 14: Características clínicas de pacientes y sujetos controles quienes fueron sujetos a ensayos independientes de PCR tiempo real.

	Sujetos controles	Pacientes SCA7 Inicio adulto (AO)	Pacientes SCA7 Inicio temprano (EO)
Ensayos de validación independiente			
Número	12	7	10
Femenino/Masculino	8/4	3/4	6/4
Edad	39.36 ± 10.66	47.43 ± 11.92	29.7 ± 10.87
Edad de inicio visual	NA	38.42 ± 13.61	17.3 ± 7.40
Edad de inicio motor	NA	38.28 ± 12.04	19.9 ± 6.98
Duración de la enfermedad	NA	10.14 ± 7.36	13 ± 12.22
Repetidos CAG	10.66 ± 0.94	41.71 ± 2.71	51.1 ± 6.20
SARA	NA	11.87 ± 8.81	15.3 ± 7.42
INAS	NA	3.85 ± 1.46	3.9 ± 1.51

Las escalas neurológicas SARA e INAS se usaron para evaluar las características cerebelares y extracerebelares en los pacientes.

Tomando en cuenta las consideraciones de normalización, todos los miRNAs pudieron validarse, ya que se mostraron elevados en la nueva cohorte de pacientes,

la excepción fue hsa-miR-375-3p quien mostró una tendencia al aumento, cercano a un valor estadísticamente significativo $p < 0.05$ (Tabla 15).

Tabla 15: Validación de miRNAs diferencialmente expresados.

miRNAs validados en pacientes de inicio adulto con SCA7 (AO)							
	miRNA	TLDA			RT-qPCR independiente		
		FC	p-val	adj.pval	FC	p-val	adj.pval
1	hsa-let-7a-5p	40.0119	0.0014	0.0917	8.0851	7.90E-03	0.0607
2	hsa-let-7e-5p	6.4565	0.0247	0.1068	2.6163	0.0459	0.6788
3	hsa-let-7g-5p	10.2842	0.0034	0.0917	9.5665	0.0163	0.0602
4	has-miR-17-5p	4.4269	0.0316	0.1068	11.2495	0.0029	0.0398
5	has-miR-20a-5p	5.1747	0.0358	0.1068	14.6602	0.0026	0.0398
6	has-miR-26a-5p	5.1386	0.0413	0.1116	1.1271	0.0494	0.6402
7	has-miR-27a-3p	4.8955	0.0315	0.1068	7.5964	0.0172	0.5022
8	has-miR-29a-3p	4.5378	0.0444	0.1127	18.2001	0.0236	0.5022
9	has-miR-132-3p	4.2508	0.0500	0.1233	1.2281	0.043	0.6556
10	has-miR-221-3p	5.8007	0.0274	0.1086	8.4761	0.0331	0.5578
miRNA validated in patients with SCA7 (Early onset)							
	miRNA	TLDA			RT-qPCR independiente		
		FC	p-val	adj. pval	FC	p-val	adj.pval
1	hsa-let-7a-5p	49.0850	0.0015	0.0440	2.6552	0.0412	0.7629
2	hsa-let-7g-5p	9.2821	0.0073	0.0569	1.6897	0.0478	0.9638
3	has-miR-17-5p	6.4375	0.0127	0.0647	1.4068	0.0377	0.6964
4	has-miR-18a-5p	34.4102	0.0012	0.0440	1.6258	0.0457	0.7638
5	has-miR-19a-3p	4.5841	0.0382	0.0938	2.0769	0.0423	0.7735
6	has-miR-20a-5p	7.7749	0.0152	0.0741	2.9849	0.0498	0.9928
7	has-miR-26a-5p	5.8427	0.0382	0.0938	1.1185	0.0412	0.7629
8	has-miR-27a-3p	10.7143	0.0037	0.0440	2.0000	0.0482	0.9638
9	has-miR-29a-3p	7.1488	0.0155	0.0741	3.1100	0.0473	0.9638
10	has-miR-221-3p	6.0660	0.0323	0.0937	2.1988	0.0466	0.9638
11	has-miR-223-3p	5.4079	0.0331	0.0937	2.579	0.0479	0.9638
12	has-miR-323a-3p	9.7676	3.20E-03	4.40E-02	2.0106	0.0475	0.9638
13	has-miR-10b-5p	11.9419	0.0398	0.0938	1.44924	4.6E-02	0.9638
14	has-miR-30b-5p	9.8379	0.0091	0.0599	1.2522	0.0312	0.6964
15	has-miR-148b-3p	63.8500	0.0035	0.044	5.6371	0.0460	0.9638
16	has-miR-324-3p	76.6188	0.0499	0.1045	1.4844	0.0468	0.9638
17	has-miR-375-3p	3.7928	0.0362	0.0938	1.3253	0.0584	0.9640

MiRNAs con un cambio de expresión >1 ($p < 0.05$) fueron considerados aumentados.

10.4 Identificación de miRNAs con valor diagnóstico en SCA7

Para determinar si estos miRNAs circulantes alterados tienen el poder diagnóstico predictivo de diferenciar entre una población de sujetos controles y pacientes, realizamos un análisis de regresión logística univariado. Mediante este análisis encontramos que cinco miRNAs (hsa-let-7a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-30b-5p y hsa-miR-132-3p) se asocian de manera significativa con la presencia de la enfermedad. Sin embargo, cuando el análisis se realizó con el método Random Forest para incrementar el poder estadístico, el resultado mostró que la desregulación de 4 miRNAs de los 5 anteriormente identificados (hsa-let-7a-5p, hsa-miR-30b-5p, hsa-miR-18a-5p y hsa-let-7e-5p), dichos miRNAs son suficiente para discriminar entre pacientes con SCA7 y sujetos saludables (Tabla 16 y Fig.23a). El modelo final de predicción que define este modelo se describe de manera más detallada en la figura 23a y b. Se demostró, que esta firma de 4 miRNAs, se alteran de manera conjunta en los pacientes al utilizar cualquiera de los dos métodos; ensayos; TLDA (Fig.23c) y en los ensayos independientes (Fig.23d). Finalmente, se realizaron curvas ROC que demostraron que los 4 miRNAs circulantes tiene el poder de discriminar entre pacientes con SCA7 y sujetos controles con alta sensibilidad y especificidad (área bajo la curva=0.89 para el análisis en TLDA y 0.84 para los ensayos independientes) sugiriéndose como posibles biomarcadores de la enfermedad con un valor auxiliar en el diagnóstico en los pacientes (Fig. 23e-f).

De manera muy interesante, al determinar el papel biológico de esta firma de miRNAs, un nuevo análisis de enriquecimiento conjunto y específico. Los resultados mostraron que estos 4 miRNAs comparten tres vías de señalización. Dichos miRNAs, participan activamente en la vía de señalización de FAS y que a excepción de let-7a-5p, también participan conjuntamente en la vía de Biosíntesis de Heparán Sulfato y el transporte vesicular dependiente de SNARE (Tabla 17).

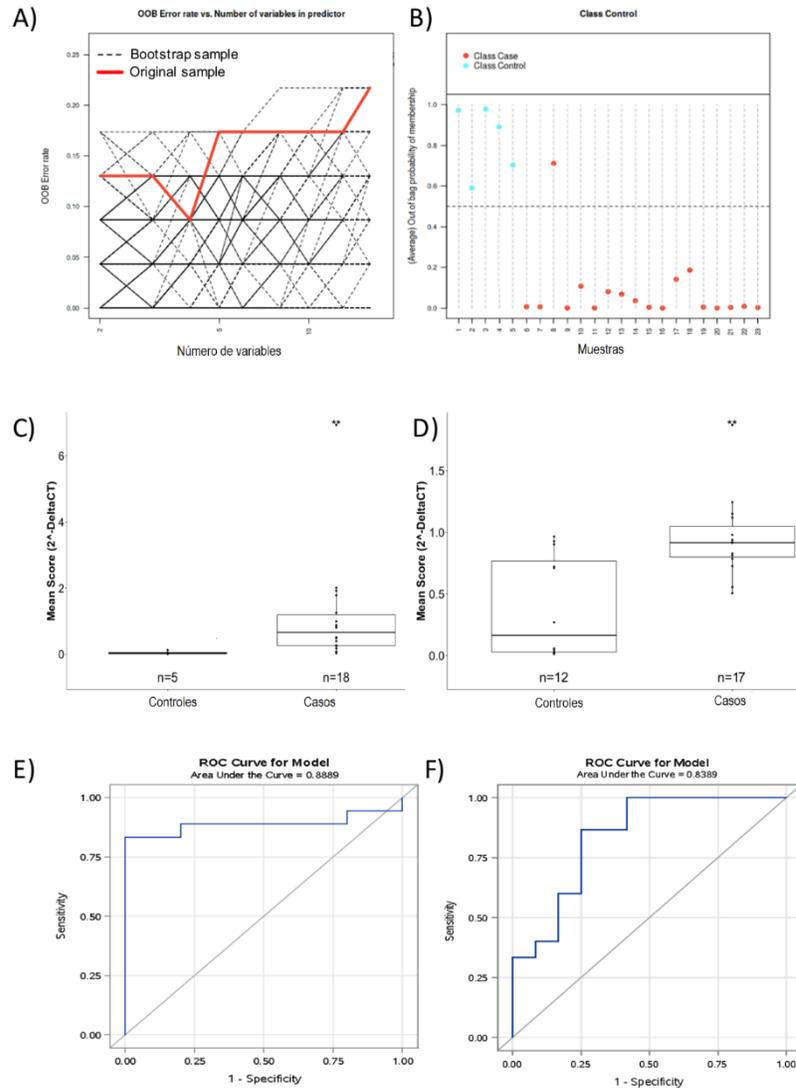


Fig. 23 miRNAs asociados con la patología SCA7. A) Se determinó que el mejor número de genes que lleva a una tasa de error más baja en el modelo de predicción son 4 como se muestra en la gráfica. Los datos originales (línea roja) y las 20 muestras de predicción (línea negra punteada); B) el análisis muestra que la mayoría de las muestras se clasifican en ambos grupos (pacientes y sujetos controles). El error de predicción del modelo fue (0.08821) mientras que la tasa de error del random forest fue 0.22. Diferencial de expresión conjunta de los 4 miRNAs (*let-7a-5p*, *miR-30b-5p*, *miR-18a-5p* y *let-7e-5p*) entre pacientes vs sujetos controles por TLDA. (C) y ensayos independientes (D). La significancia estadística de $p < 0.05$. (E) Curvas ROC muestran que la expresión diferencial de los 4 miRNAs en conjunto discriminan entre los pacientes SCA7 y los sujetos controles con alta especificidad y sensibilidad en ensayos TLDA y en ensayos independientes (F). Se presenta el área bajo a curva, un valor cercano al 1 tiene mayor sensibilidad y especificidad. El área bajo la curva por encima de la línea diagonal representa que son verdaderos positivos.

Tabla 16: miRNAs con valor diagnóstico diferencialmente expresados.

miRNA-ID (miRBase-v22)	Ensayos TLDA			Ensayos RT-qPCR		
	Random Forest	OR	Valor p	Random Forest	OR	Valor p
hsa-let-7a-5p	0.48	2.35	0.0235	1.95	0.035	0.88
hsa-miR-30b-5p	0.325	2.568	0.0267	1.15	0.016	0.74
hsa-miR-18a-5p	0.3	2.639	0.0232	2.68	0.027	0.76
hsa-let-7e-5p	0.268	2.615	0.0256	1.95	0.035	0.70
*hsa-miR-132-3p	0.005	2.742	0.0362	2.68	0.05	0.65
Mean (hsa-let-7a-5p+hsa-miR-30b-5p+hsa-miR-18a-5p+hsa-let-7e-5p)	NA	2.708	0.035	2.56	0.011	0.83
Frecuencia de Random Forest mayor a 0.22 es considerado significativo. $OR \geq 2.0$ y valor de $p=0.05$ fueron considerados significativos. *No validado. NA=No aplica.						

Tabla 17: Análisis de enriquecimiento de la firma de 4 miRNAs asociados a SCA7.

Vía de señalización	Valor de p	Número	miRNAs
Vía de señalización de FAS	0.014	4	hsa-let-7a-5p hsa-miR-18a-5p hsa-let-7e-5p hsa-miR-30b-5p
Biosíntesis de Heparán-Sulfato	0.002	3	hsa-miR-18a-5p hsa-let-7e-5p hsa-miR-30b-5p
Transporte vesicular dependiente de SNARE	0.010	3	hsa-miR-18a-5p hsa-let-7e-5p hsa-miR-30b-5p

10.5 Análisis computacional para la identificación de miRNAs con valor pronóstico.

Como se ha mencionado anteriormente, en SCA7 se han podido identificar fenotipos de la patología que se clasifican de acuerdo con la severidad de los síntomas y a la progresión o evolución de la enfermedad. Para determinar si estos miRNAs circulantes presentan un papel en la prognosis de la enfermedad, se decidió realizar un análisis que permitiera la identificación de miRNAs asociados al fenotipo de SCA7. Para ello inicialmente, el análisis de expresión circulante mostró que entre ambos fenotipos: EO (n=9) y AO (n=9) se encontraron 17 miRNAs alterados, específicamente, estos miRNAs se encontraron elevados en EO (Tabla 18).

Tabla 18: Perfil de expresión diferencial de miRNAs circulantes entre pacientes EO vs AO con SCA7.

miRNA	p.val	adj.p.val	FC
hsa-miR-10b-5p	0,0141	0,2675	10,6033
hsa-miR-365-3p	0,0006	0,0913	10,0329
hsa-miR-30b-5p	0,0170	0,2675	4,3718
hsa-miR-215b-5p	0,0291	0,2824	4,1963
hsa-miR-323-3p	0,0086	0,2675	4,1286
hsa-miR-30c-5p	0,0181	0,2675	3,8563
hsa-miR-885-5p	0,0364	0,2835	3,5387
hsa-miR-539-5p	0,0221	0,2694	3,5186
hsa-miR-342-5p	0,0266	0,2824	3,4806
hsa-miR-193a-5p	0,0301	0,2824	3,3538
hsa-miR-342-3p	0,0053	0,2675	3,2761
hsa-miR-376a-3p	0,0472	0,2835	3,1306
hsa-miR-485-3p	0,0492	0,2835	3,0809
hsa-miR-375-3p	0,0119	0,2675	3,0282
hsa-miR-140-5p	0,0469	0,2835	3,0230
hsa-miR-142-3p	0,0389	0,2835	3,0063
hsa-miR-215-5p	0,0048	0,2675	2,6965

Dada la severidad del fenotipo EO, lo siguiente fue determinar e identificar si alguno de estos 17 miRNAs podrían servir como marcadores de pronóstico, usando un análisis computacional basado en la selección de genes por Random Forest y los

análisis de regresión lineal. Mediante este modelo, se pudo determinar que 4 miRNAs se asocian con la progresión de la enfermedad (miR-342-5p, miR-215-5p, miR-375-3p y miR-365a-3p) (fig. 24a y Tabla 19). De manera interesante pudimos observar que ambos grupos se clasificaron de manera separada como AO o EO usando el modelo predictivo (Tasa de estimación de error 0.22) (Fig. 24 b). Además, se corroboró que los 4 miRNAs juntos, aumentan mayormente en pacientes EO que en los pacientes AO (Fig. 24c), mientras que la curva ROC demostró que estos miRNAs tienen un alta sensibilidad y especificidad de asociación con la progresión de la enfermedad, con un área bajo la curva de 0.92 (Fig. 24d). Finalmente, la expresión de miR-375-3p se correlacionó positivamente con las escalas de evaluación atáxica de SCA7; SARA ($r=-0.580$; $p=0.0145$) e INAS ($r=-0.524$; $p=0.0305$) indicando que podría ser efectivos predictores en la progresión de SCA7.

Tabla 19: miRNAs con valor pronóstico diferencialmente expresados.

miRNA-ID (miRBase-v22)	Valor p	Adj. Valor p	FC	Random forest	OR	Valor p
hsa-miR-342-5p	0.0266	2.35	3.4806	0.3	0.84	0.04984
hsa-miR-215-5p	0.0048	2.568	2.6965	0.405	0.89	0.0358
hsa-miR-375-3p	0.0119	2.639	3.0282	0.425	0.89	0.046
hsa-miR-365a-3p	0.0006	2.615	10.0329	0.675	0.0267	0.93
hsa-miR-539-5p*	0.0221	2.742	3.5186	0.18	0.0285	0.93
Mean (hsa-miR-342-5p+hsa-miR-215-5p+hsa-miR-375-3p+hsa-miR-365a-3p+hsa-miR-539-5p)	NA	2.708		NA	0.0285	0.93
Frecuencia de Random Forest mayor a 0.22 es considerado significativo						

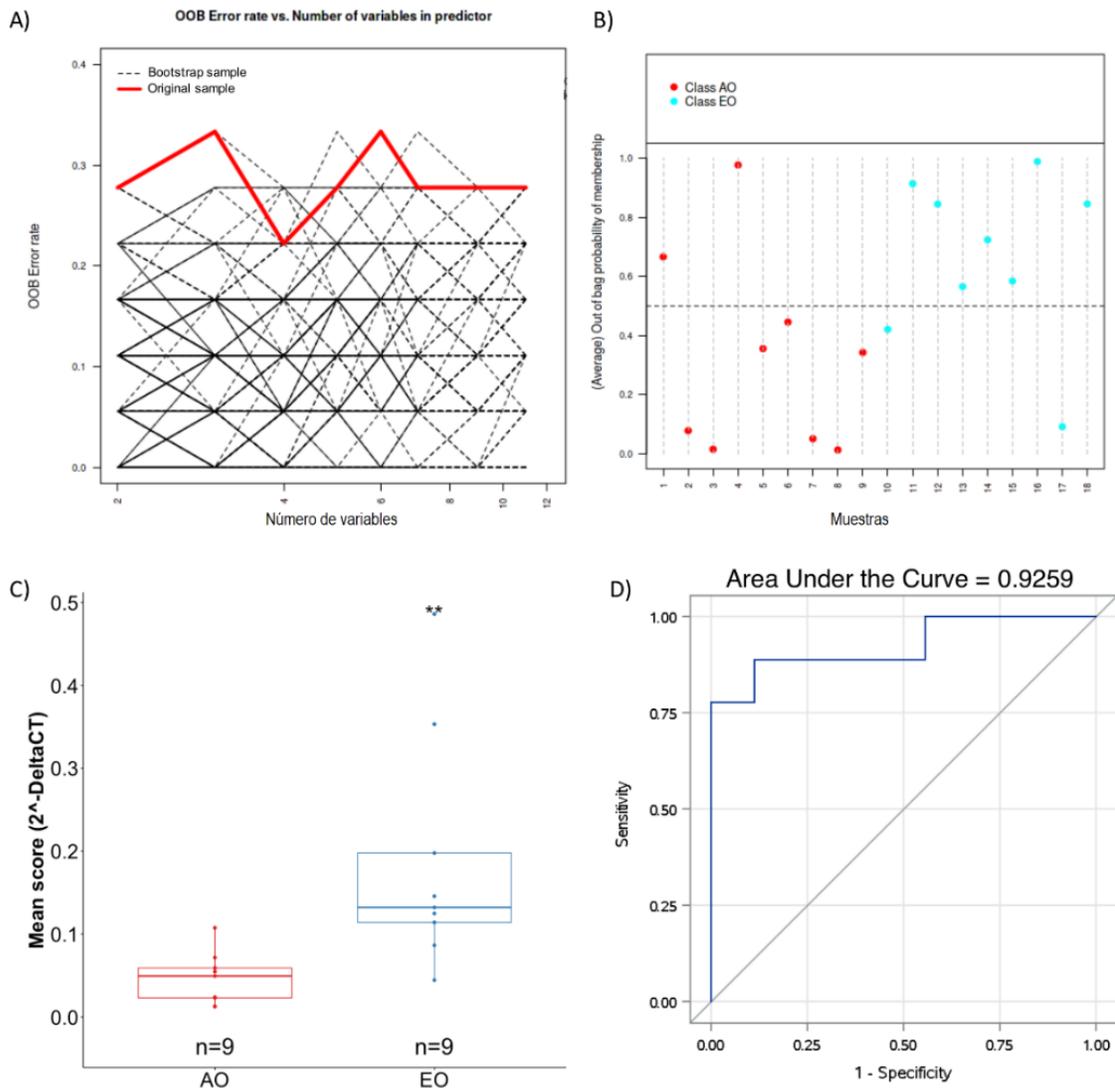


Fig. 24 miRNAs asociados con la progresión y severidad de SCA7. A) Se determinó que el mejor número de genes que lleva a una tasa de error más baja en el modelo de predicción son 4 como se muestra en a gráfica. Los datos originales (línea roja) y las 17 muestras de predicción (línea negra punteada); B) el análisis muestra que la mayoría de las muestras se clasifican en ambos grupos (EO y AO). (C) Diferencial de expresión conjunta de los 4 miRNAs (miR-342-5p, miR-215-5p, miR-375-3p y miR-365a-3p) entre EO vs sujetos AO por TLDA. (E) Curvas ROC muestran que la expresión diferencial de los 4 miRNAs en conjunto discriminan entre los pacientes EO y los pacientes AO con alta especificidad y sensibilidad en ensayos TLDA. Se presenta el área bajo a curva, un valor cercano al 1 tiene mayor sensibilidad y especificidad. El área bajo la curva por encima de la línea diagonal representa que son verdaderos positivos.

11. DISCUSIÓN

Evidencia reciente apoya la participación de los miRNAs en la neurodegeneración (Maciotta et al., 2013) y más específicamente de los miRNAs circulantes (Pereira et al., 2017). Sin embargo, dentro del campo de estudio de las enfermedades poliQ, solamente se han estudiado el papel de los miRNAs circulantes en la enfermedad de Huntington (HD) y SCA3. En este estudio, se analizó por primera vez, el perfil de expresión de miRNAs circulantes en pacientes con SCA7. Mediante el empleo de ensayos TLDA, identificamos 71 miRNAs que se expresan diferencialmente entre los pacientes con SCA7 y los sujetos controles; un análisis comparativo reveló que los pacientes EO mostraron un mayor número de miRNAs alterados que los pacientes AO, sugiriendo que mientras más severa es la enfermedad resulta un mayor número de miRNAs presentan expresión alterada. La confiabilidad de los ensayos TLDA se corroboró por medio de un ensayo independiente utilizando una nueva cohorte de pacientes y ensayos de qRT-PCR. Para eliminar el efecto inespecífico de variables confusoras, el perfil de expresión de los miRNAs circulantes se ajustó por edad y género. Adicionalmente, no se ha reportado que la expresión de alguno de los miRNAs identificados en este estudio dependa de la edad o género (Ameling et al., 2015, Kumar et al., 2017).

Actualmente, se utilizan escalas clínicas para evaluar los síntomas cerebelosos y extracerebelosos de los pacientes con SCA7, con la finalidad de definir los diferentes estados de la enfermedad (ANEXOS 2 y 3). Este procedimiento, sin embargo, consume mucho tiempo y requiere un examinador entrenado para evitar errores. Es por lo que la identificación de biomarcadores específicos, sensibles y con alta biodisponibilidad en los estados sintomáticos de la enfermedad podría mejorar el diagnóstico y el monitoreo de la historia natural de SCA7, así como la progresión de los pacientes. A este respecto, en este estudio identificamos una firma de 4 miRNAs circulantes (hsa-let-7a-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-18a-5p y hsa-miR-30b-5p) que tienen una alta sensibilidad y especificidad discriminativa entre pacientes y sujetos controles. Además, identificamos diferentes miRNAs circulantes que fueron exclusivamente desregulados en los pacientes AO (12) y EO (25), sugiriendo que la expresión de estos microRNAs correlaciona con los

diferentes fenotipos de la enfermedad. Aunque la desregulación de la expresión de los miRNAs identificados en este estudio podría tener un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, su eficacia para seguir la progresión de la enfermedad se desconoce. Para abordar este punto, desarrollamos un análisis computacional de los miRNAs expresados diferencialmente entre AO y EO para identificar aquellos miRNAs asociados con la prognosis. Con ello, obtuvimos un grupo de 4 miRNAs (hsa-miR-342-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-375-3p y hsa-miR-365a-5p) con un papel pronóstico potencial. Es importante mencionar que hsa-miR-375-3p, correlacionó positivamente con las escalas clínicas SARA e INAS. Así mismo, su homólogo (dme-miR-375-3p) se ha encontrado desregulado en un modelo de *D. melanogaster* para SCA7 lo que sugiere que hsa-miR-375-3p podría estar involucrado en los mecanismos moleculares de SCA7 (Reinhardt et al., 2012).

Consideramos que la firma de miRNAs circulantes podría ser un marcador auxiliar novedoso en SCA7, debido a que la metodología que se utiliza para su detección no es invasiva y se basa en utilizar ensayos de qRT-PCR, la firma de miRNAs circulantes comprende un marcador auxiliar novedoso para SCA7. No obstante, es importante mencionar que el análisis de estos miRNAs circulantes para SCA7, no tiene la intención de reemplazar la técnica de PCR para el diagnóstico de la enfermedad, ya que este método es barato y simple. Más bien, la identificación de miRNAs circulantes tiene un amplio rango de aplicaciones incluyendo la identificación de subtipos de SCA7 y el monitoreo de la respuesta del paciente ante alguna intervención terapéutica.

Aunque, la relación que hay entre los miRNAs circulantes en plasma/sangre y las enfermedades neurodegenerativas no se conoce plenamente, se sabe que los miRNAs expresados en el cerebro pueden cruzar la barrera hematoencefálica a través del transporte exosomal (Haqqani et al., 2013, Cichon et al., 2014, Andras and Toborek, 2016); lo que sugiere que los niveles alterados de los miRNAs que se encuentran a nivel circulatorio podría reflejar el estado fisiológico de los órganos distales donde se expresan originalmente estos miRNAs. Cuando se determinó la funcionalidad de los miRNAs circulantes alterados en los pacientes, encontramos

10 procesos biológicos potencialmente involucrados en SCA7, los cuales se han relacionado previamente con otras enfermedades neurodegenerativas (Eacker et al., 2009, Su et al., 2016, Procaccini et al., 2016), así como con procesos importantes del sistema nervioso central, incluyendo neurogénesis, neurodegeneración y angiogénesis (Yoo et al., 2003, Wang et al., 2011, Roush and Slack, 2008, Jin et al., 2016). En particular, las vías de regulación hormonal y diferenciación adipocítica, podrían estar relacionadas con la disminución del índice de masa corporal (IMC) observada en los pacientes con SCA7 y, en los modelos de ratón knockin (*Sca7^{266Q/5Q}*) (Yoo et al., 2003). Aunado a lo anterior, encontramos la presencia de dos familias de miRNAs (*let-7e* y *miR-17*) así como del cluster *miR-17-92*. Además de su papel canónico en la regulación de la diferenciación de células madres y la neurogénesis (Wang et al., 2011), *let-7* induce neurodegeneración a través de la activación del receptor tipo Toll sensible a RNA (TLR7) (Lehmann et al., 2012). Con respecto al cluster *miR-17-92*, se sabe que su actividad en la regulación génica se asocia directamente con angiogénesis, neurogénesis y plasticidad neuronal en adultos (Jin et al., 2016, Xin et al., 2017).

Particularmente, la firma de 4 miRNAs con valor diagnóstico que identificamos (*hsa-let-7a-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-18a-5p* y *hsa-miR-30b-5p*); está involucrada en vías de señalización del sistema nervioso central, incluyendo, muerte celular activada por el ligando de FAS, biosíntesis de Heparán Sulfato (HS) y transporte vesicular dependiente de las proteínas SNARE (Fig. 25). A nivel neuronal, se sabe que la pérdida gradual de neuronas es un proceso regulado por la vía de señalización de FAS (Su et al., 2003, Choi and Benveniste, 2004), y en conjunto con otros miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNFR), modula de manera indirecta la respuesta inflamatoria, el crecimiento celular y la proliferación (Kragh et al., 2013). Por otro lado, el heparán sulfato es un componente principal de la matriz extracelular (ECM), regula la homeostasis y actúa como correceptor del factor de crecimiento para facilitar la unión del ligando (Properzi et al., 2008, Maeda, 2015, Mikami and Kitagawa, 2016). Finalmente, con respecto al transporte vesicular SNARE, el cual media la exocitosis durante el desarrollo neuronal y la liberación de neurotransmisores para la transmisión sináptica (Hong, 2005), se ha

expresión de miR-124 en las muestras de plasma de los pacientes con SCA7, lo que sugiere que la función de este miRNA está restringida a órganos específicos (Lee et al., 2013, Kang et al., 2013, Tan et al., 2015) y que su expresión basal no es suficiente para que se detecte en el plasma de los pacientes.

Una pregunta importante es saber si los 4 miRNAs con valor diagnóstico identificados en este estudio tienen alguna relevancia en otras enfermedades neurodegenerativas. La alteración en la expresión de miR-30b-5p ya se ha observado en otras enfermedades neurodegenerativas, en PD, el aumento de expresión de este miRNA en sangre periférica se asoció con la progresión de la enfermedad (Serafin et al., 2015). La alteración de miR-30b-5p, también se observó en la corteza cerebral de pacientes con HD y SCA1 (Marti et al., 2010, Persengiev et al., 2011), mientras que, los niveles de let-7a-5p se encontraron incrementados en el cerebelo y la corteza cerebral de pacientes con SCA1 (Persengiev et al., 2011) y los de let-7e-5p en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con AD (Derkow et al., 2018). Esto parece indicar que algunos miRNAs asociados a SCA7 podrían estar involucrados en mecanismos de neurodegeneración comunes. Con respecto a modelos animales las enfermedades poliQ, se ha observado la desregulación de mmm-miR-30b-5p en el cerebelo de los ratones modelo de SCA1 (SCA1B05-82Q)(Rodriguez-Lebron et al., 2013). Por lo tanto, con la excepción de hsa-miR-18a-5p, que parece ser específica de SCA7, el resto de los miRNAs que aquí se describen están relacionados con mecanismos de neurodegeneración. Finalmente, con respecto a la firma de miRNAs con valor pronóstico, la expresión de mmu-miR-365-3p se ha encontrado incrementada en la corteza cerebral de los ratones transgénicos HD (N171-82Q HD) (Jin et al., 2012), mientras que la expresión de miR-342-5p también está incrementada en líneas celulares de HD (STHdhQ111/HdhQ111) (Sinha et al., 2011). Nuestros datos sobre el grupo de miRNAs con valor diagnóstico motivarán seguramente estudios posteriores que definan claramente la utilidad de estos miRNAs en los estudios clínicos de SCA7.

Es importante mencionar que el presente estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, los casos y controles no están apareados completamente por edad y

género; por lo tanto, fue necesario incluir estos parámetros como covariables confusoras para ajustar los datos de expresión de miRNAs. Otra limitación fue el tamaño relativamente pequeño de la muestra (35 pacientes), lo que se debe principalmente a la baja incidencia de SCA7 ($<1/100,000$). La estratificación de los pacientes en los dos fenotipos de la enfermedad (EO y AO) disminuyó el poder estadístico del análisis. Por lo tanto, aunque identificamos miRNAs circulantes específicos de cada fenotipo de la enfermedad, el tamaño de las muestras EO y AO no fue lo suficientemente grande para mantener la significancia estadística en los valores de p ajustados.

Finalmente, aunque el análisis de enriquecimiento del perfil de miRNAs en SCA7 se basan en asociaciones estadísticas, nos permitió identificar mecanismos moleculares potencialmente asociados con SCA7, aunque, es necesario realizar estudios funcionales que confirmen la participación de estos miRNAs con la biología de la enfermedad.

12. CONCLUSIONES

- 1) Los pacientes con SCA7 presentan un perfil de expresión de miRNAs desregulado.
- 2) Se identificaron 4 miRNAs (let-7a-5p, let-e-5p, miR-18a-5p y miR-30b-5p) con la capacidad de discernir entre pacientes e individuos controles.
- 3) Se identificaron 4 miRNAs (hsa-miR- 342-5p, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-375-3p, and hsa-miR- 365a-3p) con potencial valor pronóstico que podrían ser útiles para monitorear el progreso de la enfermedad y para evaluar la respuesta del paciente después de intervenciones terapéuticas.
- 4) Los miRNAs identificados se asocian con diversas vías de señalización neuronal.

13. PERSPECTIVAS

- Aumentar el tamaño de la muestra de pacientes con SCA7, incluyendo pacientes de diferentes poblaciones.
- Determinar la confiabilidad de los miRNAs circulantes alterados como biomarcadores en ensayos longitudinales de casos y controles.
- Determinar si los miRNAs identificados son secretados por células neuronales o gliales empleando modelos celulares y/o animales de SCA7.
- Realizar ensayos funcionales para definir la participación de los miRNAs identificados en la fisiopatogénesis de la enfermedad.
- Analizar si las vías de señalización relacionadas con el perfil de expresión de miRNAs de los pacientes (ligando de FAS, la síntesis de Heparán sulfato o el transporte vesicular dependiente de SNARE), podrían ser rutas nuevas de neurodegeneración en SCA7 (Fig. 25).
- Identificar otros posibles biomarcadores en SCA7, tal como RNAs mensajeros, metabolitos o proteínas cuya expresión se ve alterada por la presencia de la enfermedad. Se ha observado que la combinación de OMICS amplía mayormente el conocimiento de la enfermedad y la posibilidad de desarrollar nuevas terapias.

14. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ABOU-SLEYMANE, G., CHALMEL, F., HELMLINGER, D., LARDENOIS, A., THIBAUT, C., WEBER, C., MERIENNE, K., MANDEL, J. L., POCH, O., DEVYS, D. & TROTTIER, Y. 2006. Polyglutamine expansion causes neurodegeneration by altering the neuronal differentiation program. *Hum Mol Genet*, 15, 691-703.
- ADEGBUYIRO, A., SEDIGHI, F., PILKINGTON, A. W. T., GROOVER, S. & LEGLEITER, J. 2017. Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. *Biochemistry*, 56, 1199-1217.
- AJAYI, A., YU, X., LINDBERG, S., LANGEL, U. & STROM, A. L. 2012. Expanded ataxin-7 cause toxicity by inducing ROS production from NADPH oxidase complexes in a stable inducible Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) model. *BMC Neurosci*, 13, 86.
- AJAYI, A., YU, X., WAHLO-SVEDIN, C., TSIRIGOTAKI, G., KARLSTROM, V. & STROM, A. L. 2015a. Altered p53 and NOX1 activity cause bioenergetic defects in a SCA7 polyglutamine disease model. *Biochim Biophys Acta*, 1847, 418-428.
- AJAYI, A., YU, X., WAHLO-SVEDIN, C., TSIRIGOTAKI, G., KARLSTROM, V. & STROM, A. L. 2015b. Altered p53 and NOX1 activity cause bioenergetic defects in a SCA7 polyglutamine disease model. *Biochim Biophys Acta*, 1847, 418-28.
- ALVES, S., CORMIER-DEQUAIRE, F., MARINELLO, M., MARAIS, T., MURIEL, M. P., BEAUMATIN, F., CHARBONNIER-BEAUPEL, F., TAHIRI, K., SEILHEAN, D., EL HACHIMI, K., RUBERG, M., STEVANIN, G., BARKATS, M., DEN DUNNEN, W., PRIAULT, M., BRICE, A., DURR, A., CORVOL, J. C. & SITTNER, A. 2014. The autophagy/lysosome pathway is impaired in SCA7 patients and SCA7 knock-in mice. *Acta Neuropathol*, 128, 705-22.
- ALVES, S., MARAIS, T., BIFERI, M. G., FURLING, D., MARINELLO, M., EL HACHIMI, K., CARTIER, N., RUBERG, M., STEVANIN, G., BRICE, A., BARKATS, M. & SITTNER, A. 2016. Lentiviral vector-mediated overexpression of mutant ataxin-7 recapitulates SCA7 pathology and promotes accumulation of the FUS/TLS and MBNL1 RNA-binding proteins. *Mol Neurodegener*, 11, 58.
- AMELING, S., KACPROWSKI, T., CHILUKOTI, R. K., MALSCH, C., LIEBSCHER, V., SUHRE, K., PIETZNER, M., FRIEDRICH, N., HOMUTH, G., HAMMER, E. & VOLKER, U. 2015. Associations of circulating plasma microRNAs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC Med Genomics*, 8, 61.
- ANDRAS, I. E. & TOBOREK, M. 2016. Extracellular vesicles of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers*, 4, e1131804.
- ARROYO, J. D., CHEVILLET, J. R., KROH, E. M., RUF, I. K., PRITCHARD, C. C., GIBSON, D. F., MITCHELL, P. S., BENNETT, C. F., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., STIREWALT, D. L., TAIT, J. F. & TEWARI, M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5003-8.
- ATADZHANOV, M., SMITH, D. C., MWABA, M. H., SIDDIQI, O. K., BRYER, A. & GREENBERG, L. J. 2017. Clinical and genetic analysis of spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) in Zambian families. *Cerebellum Ataxias*, 4, 17.
- AZEVEDO, P. B., ROCHA, A. G., KEIM, L. M. N., LAVINSKY, D., FURTADO, G. V., DE MATTOS, E. P., VARGAS, F. R., LEOTTI, V. B., SARAIVA-PEREIRA, M. L., JARDIM, L. B. & REDE, N. 2019. Ophthalmological and Neurologic Manifestations in Pre-clinical and Clinical Phases of Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Cerebellum*.

- BENOMAR, A., KROLS, L., STEVANIN, G., CANCEL, G., LEGUERN, E., DAVID, G., OUHABI, H., MARTIN, J. J., DURR, A., ZAIM, A. & ET AL. 1995. The gene for autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy maps to chromosome 3p12-p21.1. *Nat Genet*, 10, 84-8.
- BENTON, C. S., DE SILVA, R., RUTLEDGE, S. L., BOHLEGA, S., ASHIZAWA, T. & ZOGHBI, H. Y. 1998. Molecular and clinical studies in SCA-7 define a broad clinical spectrum and the infantile phenotype. *Neurology*, 51, 1081-6.
- BILEN, J., LIU, N., BURNETT, B. G., PITTMAN, R. N. & BONINI, N. M. 2006. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell*, 24, 157-63.
- BURKE, T. L., MILLER, J. L. & GRANT, P. A. 2013. Direct inhibition of Gcn5 protein catalytic activity by polyglutamine-expanded ataxin-7. *J Biol Chem*, 288, 34266-75.
- CANCEL, G., DUYCKAERTS, C., HOLMBERG, M., ZANDER, C., YVERT, G., LEBRE, A. S., RUBERG, M., FAUCHEUX, B., AGID, Y., HIRSCH, E. & BRICE, A. 2000. Distribution of ataxin-7 in normal human brain and retina. *Brain*, 123 Pt 12, 2519-30.
- CICHON, C., SABHARWAL, H., RUTER, C. & SCHMIDT, M. A. 2014. MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions. *Tissue Barriers*, 2, e944446.
- CUSTER, S. K., GARDEN, G. A., GILL, N., RUEB, U., LIBBY, R. T., SCHULTZ, C., GUYENET, S. J., DELLER, T., WESTRUM, L. E., SOPHER, B. L. & LA SPADA, A. R. 2006. Bergmann glia expression of polyglutamine-expanded ataxin-7 produces neurodegeneration by impairing glutamate transport. *Nat Neurosci*, 9, 1302-11.
- CHEN, S., PENG, G. H., WANG, X., SMITH, A. C., GROTE, S. K., SOPHER, B. L. & LA SPADA, A. R. 2004. Interference of Crx-dependent transcription by ataxin-7 involves interaction between the glutamine regions and requires the ataxin-7 carboxy-terminal region for nuclear localization. *Hum Mol Genet*, 13, 53-67.
- CHOI, C. & BENVENISTE, E. N. 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*, 44, 65-81.
- CHOU, A. H., CHEN, C. Y., CHEN, S. Y., CHEN, W. J., CHEN, Y. L., WENG, Y. S. & WANG, H. L. 2010. Polyglutamine-expanded ataxin-7 causes cerebellar dysfunction by inducing transcriptional dysregulation. *Neurochem Int*, 56, 329-39.
- DAS, E., JANA, N. R. & BHATTACHARYYA, N. P. 2013. MicroRNA-124 targets CCNA2 and regulates cell cycle in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 437, 217-24.
- DAVID, G., ABBAS, N., STEVANIN, G., DURR, A., YVERT, G., CANCEL, G., WEBER, C., IMBERT, G., SAUDOU, F., ANTONIOU, E., DRABKIN, H., GEMMILL, R., GIUNTI, P., BENOMAR, A., WOOD, N., RUBERG, M., AGID, Y., MANDEL, J. L. & BRICE, A. 1997. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet*, 17, 65-70.
- DENNY-BROWN, D., DAWSON, D. M. & TYLER, H. R. 1982. *Handbook of neurological examination and case recording*, Cambridge, Mass., Harvard University Press.
- DERKOW, K., ROSSLING, R., SCHIPKE, C., KRUGER, C., BAUER, J., FAHLING, M., STROUX, A., SCHOTT, E., RUPRECHT, K., PETERS, O. & LEHNARDT, S. 2018. Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *PLoS One*, 13, e0200602.
- DIAZ-URIARTE, R. 2007. GeneSrF and varSelRF: a web-based tool and R package for gene selection and classification using random forest. *BMC Bioinformatics*, 8, 328.

- DIAZ-URIARTE, R. & ALVAREZ DE ANDRES, S. 2006. Gene selection and classification of microarray data using random forest. *BMC Bioinformatics*, 7, 3.
- DIEZ-PLANELLES, C., SANCHEZ-LOZANO, P., CRESPO, M. C., GIL-ZAMORANO, J., RIBACOBA, R., GONZALEZ, N., SUAREZ, E., MARTINEZ-DESCALS, A., MARTINEZ-CAMBLOR, P., ALVAREZ, V., MARTIN-HERNANDEZ, R., HUERTA-RUIZ, I., GONZALEZ-GARCIA, I., COSGAYA, J. M., VISIOLI, F., DAVALOS, A., IGLESIAS-GUTIERREZ, E. & TOMAS-ZAPICO, C. 2016. Circulating microRNAs in Huntington's disease: Emerging mediators in metabolic impairment. *Pharmacol Res*, 108, 102-110.
- DONIS, K. C., MATTOS, E. P., SILVA, A. A., FURTADO, G. V., SARAIVA-PEREIRA, M. L., JARDIM, L. B. & SAUTE, J. A. 2015. Infantile spinocerebellar ataxia type 7: Case report and a review of the literature. *J Neurol Sci*, 354, 118-21.
- DORSCHNER, M. O., BARDEN, D. & STEPHENS, K. 2002. Diagnosis of five spinocerebellar ataxia disorders by multiplex amplification and capillary electrophoresis. *J Mol Diagn*, 4, 108-13.
- DUNCAN, C. E., AN, M. C., PAPANIKOLAOU, T., RUGANI, C., VITELLI, C. & ELLERBY, L. M. 2013. Histone deacetylase-3 interacts with ataxin-7 and is altered in a spinocerebellar ataxia type 7 mouse model. *Mol Neurodegener*, 8, 42.
- EACKER, S. M., DAWSON, T. M. & DAWSON, V. L. 2009. Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 10, 837-41.
- ENEVOLDSON, T. P., SANDERS, M. D. & HARDING, A. E. 1994. Autosomal dominant cerebellar ataxia with pigmentary macular dystrophy. A clinical and genetic study of eight families. *Brain*, 117 (Pt 3), 445-60.
- FORSGREN, L., LIBELIUS, R., HOLMBERG, M., VON DOBELN, U., WIBOM, R., HEIJBEL, J., SANDGREN, O. & HOLMGREN, G. 1996. Muscle morphology and mitochondrial investigations of a family with autosomal dominant cerebellar ataxia and retinal degeneration mapped to chromosome 3p12-p21.1. *J Neurol Sci*, 144, 91-8.
- FRIEDMAN, M. J., SHAH, A. G., FANG, Z. H., WARD, E. G., WARREN, S. T., LI, S. & LI, X. J. 2007. Polyglutamine domain modulates the TBP-TFIIB interaction: implications for its normal function and neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 10, 1519-28.
- GARDEN, G. 1993. Spinocerebellar Ataxia Type 7. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., STEPHENS, K. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- GARDEN, G. A., LIBBY, R. T., FU, Y. H., KINOSHITA, Y., HUANG, J., POSSIN, D. E., SMITH, A. C., MARTINEZ, R. A., FINE, G. C., GROTE, S. K., WARE, C. B., EINUM, D. D., MORRISON, R. S., PTACEK, L. J., SOPHER, B. L. & LA SPADA, A. R. 2002. Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice. *J Neurosci*, 22, 4897-905.
- GAUGHWIN, P. M., CIESLA, M., LAHIRI, N., TABRIZI, S. J., BRUNDIN, P. & BJORKQVIST, M. 2011. Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 20, 2225-37.
- GHOSE, J., SINHA, M., DAS, E., JANA, N. R. & BHATTACHARYYA, N. P. 2011. Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease. *PLoS One*, 6, e23837.
- GILAD, S., MEIRI, E., YOGEV, Y., BENJAMIN, S., LEBANONY, D., YERUSHALMI, N., BENJAMIN, H., KUSHNIR, M., CHOLAKH, H., MELAMED, N., BENTWICH, Z., HOD, M., GOREN, Y. & CHAJUT, A. 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One*, 3, e3148.

- GREENBERG, J., SOLOMON, G. A., VORSTER, A. A., HECKMANN, J. & BRYER, A. 2006. Origin of the SCA7 gene mutation in South Africa: implications for molecular diagnostics. *Clin Genet*, 70, 415-7.
- GUO, H., INGOLIA, N. T., WEISSMAN, J. S. & BARTEL, D. P. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 835-40.
- HA, M. & KIM, V. N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 509-24.
- HAQQANI, A. S., DELANEY, C. E., TREMBLAY, T. L., SODJA, C., SANDHU, J. K. & STANIMIROVIC, D. B. 2013. Method for isolation and molecular characterization of extracellular microvesicles released from brain endothelial cells. *Fluids Barriers CNS*, 10, 4.
- HELMLINGER, D., HARDY, S., ABOU-SLEYMANE, G., EBERLIN, A., BOWMAN, A. B., GANSMULLER, A., PICAUD, S., ZOGHBI, H. Y., TROTTIER, Y., TORA, L. & DEVYS, D. 2006. Glutamine-expanded ataxin-7 alters TFTC/STAGA recruitment and chromatin structure leading to photoreceptor dysfunction. *PLoS Biol*, 4, e67.
- HOLMBERG, M., DUJCKAERTS, C., DURR, A., CANCEL, G., GOURFINKEL-AN, I., DAMIER, P., FAUCHEUX, B., TROTTIER, Y., HIRSCH, E. C., AGID, Y. & BRICE, A. 1998. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum Mol Genet*, 7, 913-8.
- HONG, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*, 1744, 493-517.
- HOSS, A. G., LAGOMARSINO, V. N., FRANK, S., HADZI, T. C., MYERS, R. H. & LATOURELLE, J. C. 2015. Study of plasma-derived miRNAs mimic differences in Huntington's disease brain. *Mov Disord*, 30, 1961-4.
- HUANG, F., ZHANG, L., LONG, Z., CHEN, Z., HOU, X., WANG, C., PENG, H., WANG, J., LI, J., DUAN, R., XIA, K., CHUANG, D. M., TANG, B. & JIANG, H. 2014. miR-25 alleviates polyQ-mediated cytotoxicity by silencing ATXN3. *FEBS Lett*, 588, 4791-8.
- HUNTER, M. P., ISMAIL, N., ZHANG, X., AGUDA, B. D., LEE, E. J., YU, L., XIAO, T., SCHAFER, J., LEE, M. L., SCHMITTGEN, T. D., NANA-SINKAM, S. P., JARJOURA, D. & MARSH, C. B. 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3, e3694.
- JANER, A., WERNER, A., TAKAHASHI-FUJIGASAKI, J., DARET, A., FUJIGASAKI, H., TAKADA, K., DUJCKAERTS, C., BRICE, A., DEJEAN, A. & SITTNER, A. 2010. SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. *Hum Mol Genet*, 19, 181-95.
- JIN, J., CHENG, Y., ZHANG, Y., WOOD, W., PENG, Q., HUTCHISON, E., MATTSON, M. P., BECKER, K. G. & DUAN, W. 2012. Interrogation of brain miRNA and mRNA expression profiles reveals a molecular regulatory network that is perturbed by mutant huntingtin. *J Neurochem*, 123, 477-90.
- JIN, J., KIM, S. N., LIU, X., ZHANG, H., ZHANG, C., SEO, J. S., KIM, Y. & SUN, T. 2016. miR-17-92 Cluster Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis, Anxiety, and Depression. *Cell Rep*, 16, 1653-1663.
- JOHANSSON, J., FORSGREN, L., SANDGREN, O., BRICE, A., HOLMGREN, G. & HOLMBERG, M. 1998. Expanded CAG repeats in Swedish spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) patients: effect of CAG repeat length on the clinical manifestation. *Hum Mol Genet*, 7, 171-6.
- JONASSON, J., JUVONEN, V., SISTONEN, P., IGNATIUS, J., JOHANSSON, D., BJORCK, E. J., WAHLSTROM, J., MELBERG, A., HOLMGREN, G., FORSGREN, L. & HOLMBERG, M.

2000. Evidence for a common Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) founder mutation in Scandinavia. *Eur J Hum Genet*, 8, 918-22.
- KANG, K., PENG, X., ZHANG, X., WANG, Y., ZHANG, L., GAO, L., WENG, T., ZHANG, H., RAMCHANDRAN, R., RAJ, J. U., GOU, D. & LIU, L. 2013. MicroRNA-124 suppresses the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting multiple genes and inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 288, 25414-27.
- KARAM, A. & TROTTIER, Y. 2018. Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies in Spinocerebellar Ataxia Type 7. *Adv Exp Med Biol*, 1049, 197-218.
- KARRES, J. S., HILGERS, V., CARRERA, I., TREISMAN, J. & COHEN, S. M. 2007. The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell*, 131, 136-45.
- KAYTOR, M. D., DUVICK, L. A., SKINNER, P. J., KOOB, M. D., RANUM, L. P. & ORR, H. T. 1999. Nuclear localization of the spinocerebellar ataxia type 7 protein, ataxin-7. *Hum Mol Genet*, 8, 1657-64.
- KOCERHA, J., XU, Y., PRUCHA, M. S., ZHAO, D. & CHAN, A. W. 2014. microRNA-128a dysregulation in transgenic Huntington's disease monkeys. *Mol Brain*, 7, 46.
- KOOB, M. D., BENZOW, K. A., BIRD, T. D., DAY, J. W., MOSELEY, M. L. & RANUM, L. P. 1998. Rapid cloning of expanded trinucleotide repeat sequences from genomic DNA. *Nat Genet*, 18, 72-5.
- KRAGH, C. L., FILLON, G., GYSBERS, A., HANSEN, H. D., NEUMANN, M., RICHTER-LANDSBERG, C., HAASS, C., ZALC, B., LUBETZKI, C., GAI, W. P., HALLIDAY, G. M., KAHLE, P. J. & JENSEN, P. H. 2013. FAS-dependent cell death in alpha-synuclein transgenic oligodendrocyte models of multiple system atrophy. *PLoS One*, 8, e55243.
- KUMAR, S., VIJAYAN, M., BHATTI, J. S. & REDDY, P. H. 2017. MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 146, 47-94.
- LA SPADA, A. R., FU, Y. H., SOPHER, B. L., LIBBY, R. T., WANG, X., LI, L. Y., EINUM, D. D., HUANG, J., POSSIN, D. E., SMITH, A. C., MARTINEZ, R. A., KOSZDIN, K. L., TREUTING, P. M., WARE, C. B., HURLEY, J. B., PTACEK, L. J. & CHEN, S. 2001. Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron*, 31, 913-27.
- LEBRE, A. S. & BRICE, A. 2003. Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet Genome Res*, 100, 154-63.
- LEE, Y., KIM, H. J., PARK, C. K., KIM, Y. G., LEE, H. J., KIM, J. Y. & KIM, H. H. 2013. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. *Bone*, 56, 383-9.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-60.
- LEE, Y., SAMACO, R. C., GATCHEL, J. R., THALLER, C., ORR, H. T. & ZOGHBI, H. Y. 2008. miR-19, miR-101 and miR-130 co-regulate ATXN1 levels to potentially modulate SCA1 pathogenesis. *Nat Neurosci*, 11, 1137-9.
- LEHMANN, S. M., KRUGER, C., PARK, B., DERKOW, K., ROSENBERGER, K., BAUMGART, J., TRIMBUCH, T., EOM, G., HINZ, M., KAUL, D., HABEL, P., KALIN, R., FRANZONI, E., RYBAK, A., NGUYEN, D., VEH, R., NINNEMANN, O., PETERS, O., NITSCH, R., HEPPNER, F. L., GOLENBOCK, D., SCHOTT, E., PLOEGH, H. L., WULCZYN, F. G. & LEHNARDT, S. 2012. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 15, 827-35.

- LIANG, H., GONG, F., ZHANG, S., ZHANG, C. Y., ZEN, K. & CHEN, X. 2014. The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5, 285-300.
- LIM, L. P., LAU, N. C., GARRETT-ENGELE, P., GRIMSON, A., SCHELTER, J. M., CASTLE, J., BARTEL, D. P., LINSLEY, P. S. & JOHNSON, J. M. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433, 769-73.
- LINDBLAD, K., SAVONTAUS, M. L., STEVANIN, G., HOLMBERG, M., DIGRE, K., ZANDER, C., EHRSSON, H., DAVID, G., BENOMAR, A., NIKOSKELAINEN, E., TROTTIER, Y., HOLMGREN, G., PTACEK, L. J., ANTTINEN, A., BRICE, A. & SCHALLING, M. 1996. An expanded CAG repeat sequence in spinocerebellar ataxia type 7. *Genome Res*, 6, 965-71.
- LINDENBERG, K. S., YVERT, G., MULLER, K. & LANDWEHRMEYER, G. B. 2000. Expression analysis of ataxin-7 mRNA and protein in human brain: evidence for a widespread distribution and focal protein accumulation. *Brain Pathol*, 10, 385-94.
- LISTA, S., FALTRACO, F., PRVULOVIC, D. & HAMPEL, H. 2013. Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*, 101-102, 1-17.
- LIU, J. 2008. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 214-21.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- MACIOTTA, S., MEREGALLI, M. & TORRENTE, Y. 2013. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*, 7, 265.
- MAEDA, N. 2015. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front Neurosci*, 9, 98.
- MAGANA, J. J., GOMEZ, R., MALDONADO-RODRIGUEZ, M., VELAZQUEZ-PEREZ, L., TAPIA-GUERRERO, Y. S., CORTES, H., LEYVA-GARCIA, N., HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. & CISNEROS, B. 2013. Origin of the spinocerebellar ataxia type 7 gene mutation in Mexican population. *Cerebellum*, 12, 902-5.
- MAGANA, J. J., TAPIA-GUERRERO, Y. S., VELAZQUEZ-PEREZ, L., CERECEDO-ZAPATA, C. M., MALDONADO-RODRIGUEZ, M., JANO-ITO, J. S., LEYVA-GARCIA, N., GONZALEZ-PINA, R., MARTINEZ-CRUZ, E., HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. & CISNEROS, B. 2014a. Analysis of CAG repeats in five SCA loci in Mexican population: epidemiological evidence of a SCA7 founder effect. *Clin Genet*, 85, 159-65.
- MAGANA, J. J., TAPIA-GUERRERO, Y. S., VELAZQUEZ-PEREZ, L., CRUZ-MARINO, T., CERECEDO-ZAPATA, C. M., GOMEZ, R., MURILLO-MELO, N. M., GONZALEZ-PINA, R., HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. & CISNEROS, B. 2014b. Clinical and molecular effect on offspring of a marriage of consanguineous spinocerebellar ataxia type 7 mutation carriers: a family case report. *Int J Clin Exp Med*, 7, 5896-903.
- MARTI, E., PANTANO, L., BANEZ-CORONEL, M., LLORENS, F., MINONES-MOYANO, E., PORTA, S., SUMOY, L., FERRER, I. & ESTIVILL, X. 2010. A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res*, 38, 7219-35.
- MARTIN, J. J. 2012. Spinocerebellar ataxia type 7. *Handb Clin Neurol*, 103, 475-91.
- MARTIN, J. J., VAN REGEMORTER, N., KROLS, L., BRUCHER, J. M., DE BARSY, T., SZLIWOWSKI, H., EVRARD, P., CEUTERICK, C., TASSIGNON, M. J., SMET-DIELEMAN,

- H. & ET AL. 1994. On an autosomal dominant form of retinal-cerebellar degeneration: an autopsy study of five patients in one family. *Acta Neuropathol*, 88, 277-86.
- MATHIVANAN, S., JI, H. & SIMPSON, R. J. 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*, 73, 1907-20.
- MCCAMPBELL, A., TAYLOR, J. P., TAYE, A. A., ROBITSCHKE, J., LI, M., WALCOTT, J., MERRY, D., CHAI, Y., PAULSON, H., SOBUE, G. & FISCHBECK, K. H. 2000. CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, 9, 2197-202.
- MCCULLOUGH, S. D., XU, X., DENT, S. Y., BEKIRANOV, S., ROEDER, R. G. & GRANT, P. A. 2012. Reelin is a target of polyglutamine expanded ataxin-7 in human spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 21319-24.
- MESTDAGH, P., VAN VLIERBERGHE, P., DE WEER, A., MUTH, D., WESTERMANN, F., SPELEMAN, F. & VANDESOMPELE, J. 2009. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*, 10, R64.
- MICHALIK, A., MARTIN, J. J. & VAN BROECKHOVEN, C. 2004. Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. *Eur J Hum Genet*, 12, 2-15.
- MIKAMI, T. & KITAGAWA, H. 2016. Sulfated glycosaminoglycans: their distinct roles in stem cell biology. *Glycoconj J*.
- MITTAL, U., ROY, S., JAIN, S., SRIVASTAVA, A. K. & MUKERJI, M. 2005. Post-zygotic de novo trinucleotide repeat expansion at spinocerebellar ataxia type 7 locus: evidence from an Indian family. *J Hum Genet*, 50, 155-7.
- MIYAZAKI, Y., ADACHI, H., KATSUNO, M., MINAMIYAMA, M., JIANG, Y. M., HUANG, Z., DOI, H., MATSUMOTO, S., KONDO, N., IIDA, M., TOHNAI, G., TANAKA, F., MURAMATSU, S. & SOBUE, G. 2012. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat Med*, 18, 1136-41.
- MOOKERJEE, S., PAPANIKOLAOU, T., GUYENET, S. J., SAMPATH, V., LIN, A., VITELLI, C., DEGIACOMO, F., SOPHER, B. L., CHEN, S. F., LA SPADA, A. R. & ELLERBY, L. M. 2009. Posttranslational modification of ataxin-7 at lysine 257 prevents autophagy-mediated turnover of an N-terminal caspase-7 cleavage fragment. *J Neurosci*, 29, 15134-44.
- MORALES, S., MONZO, M. & NAVARRO, A. 2017. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol Concepts*, 8, 203-212.
- NAKAMURA, Y., TAGAWA, K., OKA, T., SASABE, T., ITO, H., SHIWAKU, H., LA SPADA, A. R. & OKAZAWA, H. 2012. Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Hum Mol Genet*, 21, 1099-110.
- NARDACCHIONE, A., ORSI, L., BRUSCO, A., FRANCO, A., GROSSO, E., DRAGONE, E., MORTARA, P., SCHIFFER, D. & DE MARCHI, M. 1999. Definition of the smallest pathological CAG expansion in SCA7. *Clin Genet*, 56, 232-4.
- NOOR, A. & ZAHID, S. 2017. A review of the role of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in neurological disorders. *Int J Neurosci*, 127, 805-811.
- PALHAN, V. B., CHEN, S., PENG, G. H., TJERNBERG, A., GAMPER, A. M., FAN, Y., CHAIT, B. T., LA SPADA, A. R. & ROEDER, R. G. 2005. Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8472-7.
- PANDEY, U. B., NIE, Z., BATLEVI, Y., MCCRAY, B. A., RITSON, G. P., NEDELSKY, N. B., SCHWARTZ, S. L., DIPROSPERO, N. A., KNIGHT, M. A., SCHULDINER, O., PADMANABHAN, R., HILD, M., BERRY, D. L., GARZA, D., HUBBERT, C. C., YAO, T. P.,

- BAEHRECKE, E. H. & TAYLOR, J. P. 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, 447, 859-63.
- PAULSON, H. L. 2009. The spinocerebellar ataxias. *J Neuroophthalmol*, 29, 227-37.
- PEREIRA, P., QUEIROZ, J. A., FIGUEIRAS, A. & SOUSA, F. 2017. Current progress on microRNAs-based therapeutics in neurodegenerative diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 8.
- PERSENGIEV, S., KONDOVA, I., OTTING, N., KOEPPEN, A. H. & BONTROP, R. E. 2011. Genome-wide analysis of miRNA expression reveals a potential role for miR-144 in brain aging and spinocerebellar ataxia pathogenesis. *Neurobiol Aging*, 32, 2316 e17-27.
- PERUTZ, M. F., JOHNSON, T., SUZUKI, M. & FINCH, J. T. 1994. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5355-8.
- PETRAKIS, S., SCHAEFER, M. H., WANKER, E. E. & ANDRADE-NAVARRO, M. A. 2013. Aggregation of polyQ-extended proteins is promoted by interaction with their natural coiled-coil partners. *Bioessays*, 35, 503-7.
- PROCACCINI, C., SANTOPAULO, M., FAICCHIA, D., COLAMATTEO, A., FORMISANO, L., DE CANDIA, P., GALGANI, M., DE ROSA, V. & MATARESE, G. 2016. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism*, 65, 1376-90.
- PROPERZI, F., LIN, R., KWOK, J., NAIDU, M., VAN KUPPEVELT, T. H., TEN DAM, G. B., CAMARGO, L. M., RAHA-CHOWDHURY, R., FURUKAWA, Y., MIKAMI, T., SUGAHARA, K. & FAWCETT, J. W. 2008. Heparan sulphate proteoglycans in glia and in the normal and injured CNS: expression of sulphotransferases and changes in sulphation. *Eur J Neurosci*, 27, 593-604.
- REINHARDT, A., FEUILLETTE, S., CASSAR, M., CALLENS, C., THOMASSIN, H., BIRMAN, S., LECOURTOIS, M., ANTONIEWSKI, C. & TRICOIRE, H. 2012. Lack of miRNA Misregulation at Early Pathological Stages in Drosophila Neurodegenerative Disease Models. *Front Genet*, 3, 226.
- RODRIGUEZ-LEBRON, E., LIU, G., KEISER, M., BEHLKE, M. A. & DAVIDSON, B. L. 2013. Altered Purkinje cell miRNA expression and SCA1 pathogenesis. *Neurobiol Dis*, 54, 456-63.
- ROEDE, J. R., UPPAL, K., PARK, Y., LEE, K., TRAN, V., WALKER, D., STROBEL, F. H., RHODES, S. L., RITZ, B. & JONES, D. P. 2013. Serum metabolomics of slow vs. rapid motor progression Parkinson's disease: a pilot study. *PLoS One*, 8, e77629.
- ROSHAN, R., GHOSH, T., GADGIL, M. & PILLAI, B. 2012. Regulation of BACE1 by miR-29a/b in a cellular model of Spinocerebellar Ataxia 17. *RNA Biol*, 9, 891-9.
- ROUSH, S. & SLACK, F. J. 2008. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, 18, 505-16.
- RUB, U., BRUNT, E. R., SEIDEL, K., GIERGA, K., MOOY, C. M., KETTNER, M., VAN BROECKHOVEN, C., BECHMANN, I., LA SPADA, A. R., SCHOLS, L., DEN DUNNEN, W., DE VOS, R. A. & DELLER, T. 2008. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): widespread brain damage in an adult-onset patient with progressive visual impairments in comparison with an adult-onset patient without visual impairments. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34, 155-68.
- SANUKI, R., ONISHI, A., KOIKE, C., MURAMATSU, R., WATANABE, S., MURANISHI, Y., IRIE, S., UNEO, S., KOYASU, T., MATSUI, R., CHERASSE, Y., URADE, Y., WATANABE, D., KONDO, M., YAMASHITA, T. & FURUKAWA, T. 2011. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci*, 14, 1125-34.

- SARAIVA, C., ESTEVES, M. & BERNARDINO, L. 2017. MicroRNA: Basic concepts and implications for regeneration and repair of neurodegenerative diseases. *Biochem Pharmacol*, 141, 118-131.
- SARKAR, S., RAVIKUMAR, B., FLOTO, R. A. & RUBINSZTEIN, D. C. 2009. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ*, 16, 46-56.
- SCHAEFER, A., O'CARROLL, D., TAN, C. L., HILLMAN, D., SUGIMORI, M., LLINAS, R. & GREENGARD, P. 2007. Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med*, 204, 1553-8.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- SCHMITZ-HUBSCH, T., COUDERT, M., BAUER, P., GIUNTI, P., GLOBAS, C., BALIKO, L., FILLA, A., MARIOTTI, C., RAKOWICZ, M., CHARLES, P., RIBAI, P., SZYMANSKI, S., INFANTE, J., VAN DE WARRENBURG, B. P., DURR, A., TIMMANN, D., BOESCH, S., FANCELLU, R., ROLA, R., DEPOND, C., SCHOLS, L., ZDIENICKA, E., KANG, J. S., DOHLINGER, S., KREMER, B., STEPHENSON, D. A., MELEGH, B., PANDOLFO, M., DI DONATO, S., DU MONTCEL, S. T. & KLOCKGETHER, T. 2008. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71, 982-9.
- SCHMITZ-HUBSCH, T., DU MONTCEL, S. T., BALIKO, L., BERCIANO, J., BOESCH, S., DEPOND, C., GIUNTI, P., GLOBAS, C., INFANTE, J., KANG, J. S., KREMER, B., MARIOTTI, C., MELEGH, B., PANDOLFO, M., RAKOWICZ, M., RIBAI, P., ROLA, R., SCHOLS, L., SZYMANSKI, S., VAN DE WARRENBURG, B. P., DURR, A., KLOCKGETHER, T. & FANCELLU, R. 2006. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66, 1717-20.
- SERAFIN, A., FOCO, L., ZANIGNI, S., BLANKENBURG, H., PICARD, A., ZANON, A., GIANNINI, G., PICHLER, I., FACHERIS, M. F., CORTELLI, P., PRAMSTALLER, P. P., HICKS, A. A., DOMINGUES, F. S. & SCHWIENBACHER, C. 2015. Overexpression of blood microRNAs 103a, 30b, and 29a in L-dopa-treated patients with PD. *Neurology*, 84, 645-53.
- SHI, Y., HUANG, F., TANG, B., LI, J., WANG, J., SHEN, L., XIA, K. & JIANG, H. 2014. MicroRNA profiling in the serums of SCA3/MJD patients. *Int J Neurosci*, 124, 97-101.
- SHIMOHATA, T., NAKAJIMA, T., YAMADA, M., UCHIDA, C., ONODERA, O., NARUSE, S., KIMURA, T., KOIDE, R., NOZAKI, K., SANO, Y., ISHIGURO, H., SAKOE, K., OOSHIMA, T., SATO, A., IKEUCHI, T., OYAKE, M., SATO, T., AOYAGI, Y., HOZUMI, I., NAGATSU, T., TAKIYAMA, Y., NISHIZAWA, M., GOTO, J., KANAZAWA, I., DAVIDSON, I., TANESE, N., TAKAHASHI, H. & TSUJI, S. 2000. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nat Genet*, 26, 29-36.
- SIMONS, M. & RAPOSO, G. 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 575-81.
- SINHA, M., GHOSE, J. & BHATTARCHARYYA, N. P. 2011. Micro RNA -214,-150,-146a and-125b target Huntingtin gene. *RNA Biol*, 8, 1005-21.
- SOLDATI, C., BITHELL, A., JOHNSTON, C., WONG, K. Y., STANTON, L. W. & BUCKLEY, N. J. 2013. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease. *J Neurochem*, 124, 418-30.
- SOPHER, B. L., LADD, P. D., PINEDA, V. V., LIBBY, R. T., SUNKIN, S. M., HURLEY, J. B., THIENES, C. P., GAASTERLAND, T., FILIPPOVA, G. N. & LA SPADA, A. R. 2011. CTCF

- regulates ataxin-7 expression through promotion of a convergently transcribed, antisense noncoding RNA. *Neuron*, 70, 1071-84.
- SU, J. H., ANDERSON, A. J., CRIBBS, D. H., TU, C., TONG, L., KESSLACK, P. & COTMAN, C. W. 2003. Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis*, 12, 182-93.
- SU, W., ALOI, M. S. & GARDEN, G. A. 2016. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small regulators with powerful potential. *Brain Behav Immun*, 52, 1-8.
- SUBRAMONY, S. H. 2012. Overview of autosomal dominant ataxias. *Handb Clin Neurol*, 103, 389-98.
- TAN, J. Y., VANCE, K. W., VARELA, M. A., SIREY, T., WATSON, L. M., CURTIS, H. J., MARINELLO, M., ALVES, S., STEINKRAUS, B., COOPER, S., NESTEROVA, T., BROCKDORFF, N., FULGA, T., BRICE, A., SITTTLER, A., OLIVER, P. L., WOOD, M. J., PONTING, C. P. & MARQUES, A. C. 2014. Cross-talking noncoding RNAs contribute to cell-specific neurodegeneration in SCA7. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 955-961.
- TAN, J. Y., VANCE, K. W., VARELA, M. A., SIREY, T., WATSON, L. M., CURTIS, H. J., MARINELLO, M., ALVES, S., STEINKRAUS, B. R., COOPER, S., NESTEROVA, T., BROCKDORFF, N., FULGA, T. A., BRICE, A., SITTTLER, A., OLIVER, P. L., WOOD, M. J., PONTING, C. P. & MARQUES, A. C. 2015. Corrigendum: Cross-talking noncoding RNAs contribute to cell-specific neurodegeneration in SCA7. *Nat Struct Mol Biol*, 22, 272.
- TAYLOR, J., GROTE, S. K., XIA, J., VANDELFT, M., GRACZYK, J., ELLERBY, L. M., LA SPADA, A. R. & TRUANT, R. 2006. Ataxin-7 can export from the nucleus via a conserved exportin-dependent signal. *J Biol Chem*, 281, 2730-9.
- THAMBISETTY, M., SIMMONS, A., VELAYUDHAN, L., HYE, A., CAMPBELL, J., ZHANG, Y., WAHLUND, L. O., WESTMAN, E., KINSEY, A., GUNTERT, A., PROITSI, P., POWELL, J., CAUSEVIC, M., KILLICK, R., LUNNON, K., LYNHAM, S., BROADSTOCK, M., CHOUDHRY, F., HOWLETT, D. R., WILLIAMS, R. J., SHARP, S. I., MITCHELMORE, C., TUNNARD, C., LEUNG, R., FOY, C., O'BRIEN, D., BREEN, G., FURNEY, S. J., WARD, M., KLOSZEWSKA, I., MECOCCI, P., SOININEN, H., TSOLAKI, M., VELLAS, B., HODGES, A., MURPHY, D. G., PARKINS, S., RICHARDSON, J. C., RESNICK, S. M., FERRUCCI, L., WONG, D. F., ZHOU, Y., MUEHLBOECK, S., EVANS, A., FRANCIS, P. T., SPENGER, C. & LOVESTONE, S. 2010. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*, 67, 739-48.
- TORRES-RAMOS, Y., MONTROYA-ESTRADA, A., CISNEROS, B., TERCERO-PEREZ, K., LEON-REYES, G., LEYVA-GARCIA, N., HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. & MAGANA, J. J. 2018. Oxidative Stress in Spinocerebellar Ataxia Type 7 Is Associated with Disease Severity. *Cerebellum*.
- TRANG, H., STANLEY, S. Y., THORNER, P., FAGHFOURY, H., SCHULZE, A., HAWKINS, C., PEARSON, C. E. & YOON, G. 2015. Massive CAG repeat expansion and somatic instability in maternally transmitted infantile spinocerebellar ataxia type 7. *JAMA Neurol*, 72, 219-23.
- TURCHINOVICH, A., WEIZ, L., LANGHEINZ, A. & BURWINKEL, B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39, 7223-33.
- URBANEK, M. O., JAZUREK, M., SWITONSKI, P. M., FIGURA, G. & KRZYZOSIAK, W. J. 2016. Nuclear speckles are detention centers for transcripts containing expanded CAG repeats. *Biochim Biophys Acta*, 1862, 1513-20.

- VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. & LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- VAN DE WARRENBURG, B. P., FRENKEN, C. W., AUSEMS, M. G., KLEEFSTRA, T., SINKE, R. J., KNOERS, N. V. & KREMER, H. P. 2001. Striking anticipation in spinocerebellar ataxia type 7: the infantile phenotype. *J Neurol*, 248, 911-4.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, RESEARCH0034.
- VELAZQUEZ-PEREZ, L., CERECEDO-ZAPATA, C. M., HERNANDEZ-HERNANDEZ, O., MARTINEZ-CRUZ, E., TAPIA-GUERRERO, Y. S., GONZALEZ-PINA, R., SALAS-VARGAS, J., RODRIGUEZ-LABRADA, R., GURROLA-BETANCOURTH, R., LEYVA-GARCIA, N., CISNEROS, B. & MAGANA, J. J. 2015. A comprehensive clinical and genetic study of a large Mexican population with spinocerebellar ataxia type 7. *Neurogenetics*, 16, 11-21.
- VICKERS, K. C., PALMISANO, B. T., SHOUCRI, B. M., SHAMBUREK, R. D. & REMALEY, A. T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13, 423-33.
- WANG, H. L., HE, C. Y., CHOU, A. H., YEH, T. H., CHEN, Y. L. & LI, A. H. 2007. Polyglutamine-expanded ataxin-7 decreases nuclear translocation of NF-kappaB p65 and impairs NF-kappaB activity by inhibiting proteasome activity of cerebellar neurons. *Cell Signal*, 19, 573-81.
- WANG, H. L., YEH, T. H., CHOU, A. H., KUO, Y. L., LUO, L. J., HE, C. Y., HUANG, P. C. & LI, A. H. 2006. Polyglutamine-expanded ataxin-7 activates mitochondrial apoptotic pathway of cerebellar neurons by upregulating Bax and downregulating Bcl-x(L). *Cell Signal*, 18, 541-52.
- WANG, S., TANG, Y., CUI, H., ZHAO, X., LUO, X., PAN, W., HUANG, X. & SHEN, N. 2011. Let-7/miR-98 regulate Fas and Fas-mediated apoptosis. *Genes Immun*, 12, 149-54.
- WARD, J. M., STOYAS, C. A., SWITONSKI, P. M., ICHOU, F., FAN, W., COLLINS, B., WALL, C. E., ADANYEGUH, I., NIU, C., SOPHER, B. L., KINOSHITA, C., MORRISON, R. S., DURR, A., MUOTRI, A. R., EVANS, R. M., MOCHEL, F. & LA SPADA, A. R. 2019. Metabolic and Organelle Morphology Defects in Mice and Human Patients Define Spinocerebellar Ataxia Type 7 as a Mitochondrial Disease. *Cell Rep*, 26, 1189-1202 e6.
- WATSON, L., SMITH, D. C., SCHOLEFIELD, J., BALLO, R., KIDSON, S., GREENBERG, L. J. & WOOD, M. J. 2016. Spinocerebellar ataxia type 7 in South Africa: Epidemiology, pathogenesis and therapy. *S Afr Med J*, 106, S107-9.
- WEI, C., THATCHER, E. J., OLENA, A. F., CHA, D. J., PERDIGOTO, A. L., MARSHALL, A. F., CARTER, B. D., BROADIE, K. & PATTON, J. G. 2013. miR-153 regulates SNAP-25, synaptic transmission, and neuronal development. *PLoS One*, 8, e57080.
- WHITNEY, A., LIM, M., KANABAR, D. & LIN, J. P. 2007. Massive SCA7 expansion detected in a 7-month-old male with hypotonia, cardiomegaly, and renal compromise. *Dev Med Child Neurol*, 49, 140-3.
- XIN, H., KATAKOWSKI, M., WANG, F., QIAN, J. Y., LIU, X. S., ALI, M. M., BULLER, B., ZHANG, Z. G. & CHOPP, M. 2017. MicroRNA cluster miR-17-92 Cluster in Exosomes Enhance Neuroplasticity and Functional Recovery After Stroke in Rats. *Stroke*, 48, 747-753.

- XIN, H., LI, Y., BULLER, B., KATAKOWSKI, M., ZHANG, Y., WANG, X., SHANG, X., ZHANG, Z. G. & CHOPP, M. 2012. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, 30, 1556-64.
- XU, J., CHEN, Q., ZEN, K., ZHANG, C. & ZHANG, Q. 2013. Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways. *J Neurochem*, 124, 15-25.
- YOO, S. Y., PENNESI, M. E., WEEBER, E. J., XU, B., ATKINSON, R., CHEN, S., ARMSTRONG, D. L., WU, S. M., SWEATT, J. D. & ZOGHBI, H. Y. 2003. SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron*, 37, 383-401.
- YOUNG, J. E., GOUW, L., PROPP, S., SOPHER, B. L., TAYLOR, J., LIN, A., HERMEL, E., LOGVINOVA, A., CHEN, S. F., CHEN, S., BREDESEN, D. E., TRUANT, R., PTACEK, L. J., LA SPADA, A. R. & ELLERBY, L. M. 2007. Proteolytic cleavage of ataxin-7 by caspase-7 modulates cellular toxicity and transcriptional dysregulation. *J Biol Chem*, 282, 30150-60.
- YU, X., AJAYI, A., BOGA, N. R. & STROM, A. L. 2012. Differential degradation of full-length and cleaved ataxin-7 fragments in a novel stable inducible SCA7 model. *J Mol Neurosci*, 47, 219-33.
- YU, X., MUNOZ-ALARCON, A., AJAYI, A., WEBLING, K. E., STEINHOF, A., LANGEL, U. & STROM, A. L. 2013. Inhibition of autophagy via p53-mediated disruption of ULK1 in a SCA7 polyglutamine disease model. *J Mol Neurosci*, 50, 586-99.
- YVERT, G., LINDENBERG, K. S., PICAUD, S., LANDWEHRMEYER, G. B., SAHEL, J. A. & MANDEL, J. L. 2000. Expanded polyglutamines induce neurodegeneration and trans-neuronal alterations in cerebellum and retina of SCA7 transgenic mice. *Hum Mol Genet*, 9, 2491-506.
- ZANDER, C., TAKAHASHI, J., EL HACHIMI, K. H., FUJIGASAKI, H., ALBANESE, V., LEBRE, A. S., STEVANIN, G., DUYCKAERTS, C. & BRICE, A. 2001. Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Hum Mol Genet*, 10, 2569-79.
- ZERNECKE, A., BIDZHEKOV, K., NOELS, H., SHAGDARSUREN, E., GAN, L., DENECKE, B., HRISTOV, M., KOPPEL, T., JAHANTIGH, M. N., LUTGENS, E., WANG, S., OLSON, E. N., SCHOBBER, A. & WEBER, C. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2, ra81.
- ZHANG, J., LI, S., LI, L., LI, M., GUO, C., YAO, J. & MI, S. 2015. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 13, 17-24.

15. ANEXOS

15.1 Carta de consentimiento informado



INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a _____ de _____ de 20__

A Quién Corresponda:

Por medio de la presente hago de su conocimiento que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el protocolo de investigación "Alteraciones de RNAs y miRNAs cíclicas en Ataxia espinocerebelosa tipo 7" que forma parte del proyecto de investigación '**Estandarización de un Diagnóstico Molecular eficaz y su correlación con la edad de inicio, transmisión y génesis de las Ataxias Espinocerebelares tipo 1, 2, 3, 6, 7 y 10 en la población Mexicana**' a cargo del Dr. en C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE, que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación, con registro definitivo 15/12.

He sido informado que el estudio consiste en la búsqueda de un mayor entendimiento de los mecanismos celulares que producen esta enfermedad. Esto se realiza tomando una muestra de sangre de la vena del brazo para obtener una muestra de mi material hereditario que se expresa en mi organismo (RNA), existiendo una mínima posibilidad de que se forme un moretón.

Tengo el entendimiento que de este estudio se obtendrá como beneficio un mayor conocimiento de la enfermedad que padezco, con lo cual posiblemente en un futuro se puedan originar estrategias de evaluación que coadyuven en el tratamiento de mi enfermedad.

Es de mi conocimiento que este estudio no tiene ningún costo para mí. También se me explicó que es posible que se guarde una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, ya que posteriormente se podría estudiar otros factores que en este momento es imposible analizar y que la información obtenida será confidencial. Así mismo, se me ha explicado que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación y que estoy en libertad de negarme a participar en el estudio, sin que esto modifique la calidad de atención médica que reciba en el Instituto.

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

FIRMA DEL PACIENTE, PADRE O TUTOR: _____

MÉDICO SOLICITANTE: **DR. NORBERTO LEYVA GARCÍA**

FIRMA: _____

RESPONSABLE DEL PROYECTO: **DR. EN C. JONATHAN JAVIER MAGAÑA AGUIRRE**

FIRMA: _____

TESTIGO:

FIRMA: _____

15.2. Escala de evaluación de síntomas atáxicos (SARA)

Rater: _____ date: _____ patient: _____

Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)

<p>1) Gait</p> <p>Proband is asked (1) to walk at a safe distance parallel to a wall including a half-turn (turn around to face the opposite direction of gait) and (2) to walk in tandem (heels to toes) without support.</p> <ul style="list-style-type: none"> 0 Normal, no difficulties in walking, turning and walking tandem (up to one misstep allowed) 1 Slight difficulties, only visible when walking 10 consecutive steps in tandem 2 Clearly abnormal, tandem walking >10 steps not possible 3 Considerable staggering, difficulties in half-turn, but without support 4 Marked staggering, intermittent support of the wall required 5 Severe staggering, permanent support of one stick or light support by one arm required 6 Walking > 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person) 7 Walking < 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person) 8 Unable to walk, even supported 	<p>2) Stance</p> <p>Proband is asked to stand (1) in natural position, (2) with feet together in parallel (big toes touching each other) and (3) in tandem (both feet on one line, no space between heel and toe). Proband does not wear shoes, eyes are open. For each condition, three trials are allowed. Best trial is rated.</p> <ul style="list-style-type: none"> 0 Normal, able to stand in tandem for > 10 s 1 Able to stand with feet together without sway, but not in tandem for > 10s 2 Able to stand with feet together for > 10 s, but only with sway 3 Able to stand for > 10 s without support in natural position, but not with feet together 4 Able to stand for >10 s in natural position only with intermittent support 5 Able to stand >10 s in natural position only with constant support of one arm 6 Unable to stand for >10 s even with constant support of one arm
<p>Score</p>	<p>Score</p>
<p>3) Sitting</p> <p>Proband is asked to sit on an examination bed without support of feet, eyes open and arms outstretched to the front.</p> <ul style="list-style-type: none"> 0 Normal, no difficulties sitting >10 sec 1 Slight difficulties, intermittent sway 2 Constant sway, but able to sit > 10 s without support 3 Able to sit for > 10 s only with intermittent support 4 Unable to sit for >10 s without continuous support 	<p>4) Speech disturbance</p> <p>Speech is assessed during normal conversation.</p> <ul style="list-style-type: none"> 0 Normal 1 Suggestion of speech disturbance 2 Impaired speech, but easy to understand 3 Occasional words difficult to understand 4 Many words difficult to understand 5 Only single words understandable 6 Speech unintelligible / anarthria
<p>Score</p>	<p>Score</p>

Rater: _____ date: _____ patient: _____

5) Finger chase Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Examiner sits in front of proband and performs 5 consecutive sudden and fast pointing movements in unpredictable directions in a frontal plane, at about 50 % of proband's reach. Movements have an amplitude of 30 cm and a frequency of 1 movement every 2 s. Proband is asked to follow the movements with his index finger, as fast and precisely as possible. Average performance of last 3 movements is rated.			6) Nose-finger test Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to point repeatedly with his index finger from his nose to examiner's finger which is in front of the proband at about 90 % of proband's reach. Movements are performed at moderate speed. Average performance of movements is rated according to the amplitude of the kinetic tremor.		
0 No dysmetria 1 Dysmetria, under/ overshooting target <5 cm 2 Dysmetria, under/ overshooting target < 15 cm 3 Dysmetria, under/ overshooting target > 15 cm 4 Unable to perform 5 pointing movements			0 No tremor 1 Tremor with an amplitude < 2 cm 2 Tremor with an amplitude < 5 cm 3 Tremor with an amplitude > 5 cm 4 Unable to perform 5 pointing movements		
Score	Right	Left	Score	Right	Left
mean of both sides (R+L)/2			mean of both sides (R+L)/2		
7) Fast alternating hand movements Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to perform 10 cycles of repetitive alternation of pro- and supinations of the hand on his/her thigh as fast and as precise as possible. Movement is demonstrated by examiner at a speed of approx. 10 cycles within 7 s. Exact times for movement execution have to be taken.			8) Heel-shin slide Rated separately for each side Proband lies on examination bed, without sight of his legs. Proband is asked to lift one leg, point with the heel to the opposite knee, slide down along the shin to the ankle, and lay the leg back on the examination bed. The task is performed 3 times. Slide-down movements should be performed within 1 s. If proband slides down without contact to shin in all three trials, rate 4.		
0 Normal, no irregularities (performs <10s) 1 Slightly irregular (performs <10s) 2 Clearly irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, but performs <10s 3 Very irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, performs >10s 4 Unable to complete 10 cycles			0 Normal 1 Slightly abnormal, contact to shin maintained 2 Clearly abnormal, goes off shin up to 3 times during 3 cycles 3 Severely abnormal, goes off shin 4 or more times during 3 cycles 4 Unable to perform the task		
Score	Right	Left	Score	Right	Left
mean of both sides (R+L)/2			mean of both sides (R+L) / 2		

15.3 Escala de evaluación de síntomas extracerebrales (INAS)

Rater: _____ date: _____ Patient code: _____

Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS)

NA: not assessed / no information available Mod: moderate

Part one: clinical findings

Please report the (undoubtedly) occurrence of signs also if abnormal findings occur only on one side

Reflexes

- | | | | | |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1. Biceps (BTR) | <input type="radio"/> normal | <input type="radio"/> hyperreflexia | <input type="radio"/> areflexia | <input type="radio"/> NA |
| 2. Patellar (PTR) | <input type="radio"/> normal | <input type="radio"/> hyperreflexia | <input type="radio"/> areflexia | <input type="radio"/> NA |
| 3. Achilles (ATR) | <input type="radio"/> normal | <input type="radio"/> hyperreflexia | <input type="radio"/> areflexia | <input type="radio"/> NA |
| 4. Extensor plantar reflex | <input type="radio"/> none | <input type="radio"/> unilateral | <input type="radio"/> bilateral | <input type="radio"/> NA |

Motor symptoms

- | | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 5. Spasticity | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Gait | <input type="radio"/> |
| Upper Limbs | <input type="radio"/> |
| Lower Limbs | <input type="radio"/> |
| 6. Paresis | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Face/tongue | <input type="radio"/> |
| UL proximal | <input type="radio"/> |
| UL distal | <input type="radio"/> |
| LL proximal | <input type="radio"/> |
| LL distal | <input type="radio"/> |
| 7. Muscle atrophy | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Face/tongue | <input type="radio"/> |
| UL proximal | <input type="radio"/> |
| UL distal | <input type="radio"/> |
| LL proximal | <input type="radio"/> |
| LL distal | <input type="radio"/> |
| 8. Fasciculations | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Face/tongue | <input type="radio"/> |
| Upper Limbs | <input type="radio"/> |
| Lower Limbs | <input type="radio"/> |
| 9. Myoclonus | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Face/tongue | <input type="radio"/> |
| Trunk | <input type="radio"/> |
| Upper Limbs | <input type="radio"/> |
| Lower Limbs | <input type="radio"/> |
| 10. Rigidity (should be obvious without movement of opposite limb) | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Axial | <input type="radio"/> |
| Upper Limbs | <input type="radio"/> |
| Lower Limbs | <input type="radio"/> |
| 11. Chorea/Dyskinesia | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Face/tongue | <input type="radio"/> |
| Neck | <input type="radio"/> |
| Trunk | <input type="radio"/> |
| Upper Limbs | <input type="radio"/> |
| Lower Limbs | <input type="radio"/> |
| 12. Dystonia | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| Face/tongue | <input type="radio"/> |
| Neck | <input type="radio"/> |
| Trunk | <input type="radio"/> |
| Upper Limbs | <input type="radio"/> |
| Lower Limbs | <input type="radio"/> |
| 13. Resting tremor | None | Mild | Mod | Severe | NA |
| | <input type="radio"/> |

Rater: _____ date: _____ Patient code: _____

Sensory symptoms

14. Impaired vibration sense (tested at malleolus ext)	None (8/8)	Mild (>5/8)	Mod (2-5/8)	Severe (<2/8)	NA
Right foot	<input type="radio"/>				
Left foot	<input type="radio"/>				

Ophthalmological findings

Testing of fixation and smooth pursuit

	No	Yes	NA
15. Broken up smooth pursuit	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
16. Square wave jerks on fixation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
17. Downbeat-nystagmus on fixation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
18. Gaze evoked-nystagmus on horizontal testing	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
19. Gaze evoked-nystagmus on vertical testing	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
20. Ophthalmoparesis on horizontal gaze	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
21. Ophthalmoparesis on vertical gaze	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Testing of fast saccades

	No	Yes	NA
22. Slowing of saccades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
23. Hypometric saccades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
24. Hypermetric saccades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Testing of visual function

25. Impaired visual acuity (loss of visual acuity <0.6 for binocular sight in distance testing)	No	Yes	NA
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Part Two: reported abnormalities

26. Double vision	None <input type="radio"/>	Mild <input type="radio"/>	Mod <input type="radio"/>	Severe/constant <input type="radio"/>	NA <input type="radio"/>
27. Dysphagia	None <input type="radio"/>	Mild <input type="radio"/>	Mod <input type="radio"/>	Severe/ tube feeding <input type="radio"/>	NA <input type="radio"/>
28. Urinary dysfunction	None <input type="radio"/>	Mild <input type="radio"/>	Mod <input type="radio"/>	Severe/ catheter <input type="radio"/>	NA <input type="radio"/>
29. Cognitive impairment (according to examiner)	None <input type="radio"/>	Mild <input type="radio"/>	Mod <input type="radio"/>	Severe <input type="radio"/>	NA <input type="radio"/>

30. Other clinical findings or reported abnormalities

(free text) _____

Rater: _____ date: _____ Patient code: _____

INAS count

The INAS can be used for clinical description, but is not used as a scale and it is not appropriate to use sum scores.

However, the INAS can be transformed in a set of 16 binary variables

- rated as "present", if at least one corresponding item or location is rated as mild OR moderate OR severe.
- rated as "absent" if ALL corresponding items or locations are rated as normal
- rated as missing if at least one corresponding item or location is missing AND other corresponding items or locations rated as normal.

The 16 variables are grouped from the INAS form as follows:

1 Hyperreflexia	items 1, 2, 3
2 Areflexia	items 1, 2, 3
3 Extensor plantar	item 4
4 Spasticity	item 5
5 Paresis	item 6
6 Muscle atrophy	item 7
7 Fasciculations	item 8
8 Myoclonus	item 9
9 Rigidity	item 10
10 Chorea/dyskinesia	item 11
11 Dystonia	item 12
12 Resting tremor	item 13
13 Sensory symptoms	item 14
14 Urinary dysfunction	item 28
15 Cognitive dysfunction	item 29
16 Brainstem oculomotor signs	items 20, 21, 22

These 16 binary variables can be summed up to a simple sum score, the INAS count, that can be used as a semiquantitative variable of extracerebellar involvement in SCA.



Wide Profiling of Circulating MicroRNAs in Spinocerebellar Ataxia Type 7

Verónica M. Borgonio-Cuadra¹ · Claudia Valdez-Vargas^{1,2} · Sandra Romero-Córdoba^{3,4} · Alfredo Hidalgo-Miranda³ · Yessica Tapia-Guerrero¹ · César M. Cerecedo-Zapata⁵ · Oscar Hernández-Hernández¹ · Bulmaro Cisneros² · Jonathan J. Magaña¹

Received: 5 October 2018 / Accepted: 10 January 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7), a neurodegenerative disease characterized by cerebellar ataxia and retinal degeneration, is caused by a CAG repeat expansion in the *ATXN7* gene coding region. Disease onset and progression are highly variable between patients, thus identification of specific/sensitive biomarkers that can improve the monitoring of disease progression is an immediate need. Because altered expression of circulating microRNAs (miRNAs) has been shown in various neurological diseases, they could be useful biomarkers for SCA7. In this study, we showed, to our knowledge for the first time, the expression profile of circulating miRNAs in SCA7. Using the TaqMan profiling low density array (TLDA), we found 71 differentially expressed miRNAs in the plasma of SCA7 patients, compared with healthy controls. The reliability of TLDA data was validated independently by quantitative real-time polymerase chain reaction in an independent cohort of patients and controls. We identified four validated miRNAs that possess the diagnostic value to discriminate between healthy controls and patients (hsa-let-7a-5p, hsa-let7e-5p, hsa-miR-18a-5p, and hsa-miR-30b-5p). The target genes of these four miRNAs were significantly enriched in cellular processes that are relevant to central nervous system function, including Fas-mediated cell-death, heparansulfate biosynthesis, and soluble-N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor pathways. Finally, we identify a signature of four miRNAs associated with disease severity that discriminate between early onset and adult onset, highlighting their potential utility to surveillance disease progression. In summary, circulating miRNAs might provide accessible biomarkers for disease stage and progression and help to identify novel cellular processes involved in SCA7.

Keywords miRNAs · Spinocerebellar ataxia type 7 · Plasma biomarker · PolyQ disease

Verónica M. Borgonio-Cuadra and Claudia Valdez-Vargas contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1480-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bulmaro Cisneros
bcisnero@cinvestav.mx

✉ Jonathan J. Magaña
maganasm@hotmail.com; jmagana@inr.gob.mx

¹ Laboratory of Genomic Medicine, Department of Genetics, National Rehabilitation Institute (INR-LGII), Calz. México-Xochimilco No. 289, Col. Arenal Guadalupe, 14389 Ciudad de México (CDMX), Mexico

² Department of Genetics and Molecular Biology, Center of Research and Advanced Studies (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México (CDMX), Mexico

³ Laboratory of Cancer Genomics, National Genomics Medicine Institute (INMEGEN), Mexico City, Mexico

⁴ Molecular Targeting Unit, Department of Experimental Oncology and Molecular Medicine, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

⁵ Rehabilitation and Special Education Center of Veracruz (CRIS-DIF), Xalapa, Veracruz, Mexico