

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“La mutación A431E en PSEN1, altera la regulación de la expresión
génica mediada por miRNAs en células precursoras neurales derivadas
del epitelio olfatorio”**

T E S I S

Que presenta

Biól. Mayte Lizeth Padilla Cristerna

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dr. Daniel Marrero Rodríguez

Ciudad de México

Agosto, 2019

Esta tesis se llevó a cabo de manera conjunta en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco, y en la Unidad de Investigación Médica en Endocrinología Experimental del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN Siglo XXI), bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Meraz Ríos y el Dr. Daniel Marrero Rodríguez, respectivamente.

COMITÉ TUTORIAL

Directores de tesis:

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dr. Daniel Marrero Rodríguez

Asesores:

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Dr. Michael Schnoor

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

La Biól. Mayte Lizeth Padilla Cristerna realizó esta tesis de Maestría con una beca otorgada por CONACYT (No. 631361)

Agradecimientos

Gracias a mi mamá, María Teresa Cristerna Pineda y mis hermanas Airam Aseret y María Teresa Padilla Cristerna, por brindarme palabras de aliento junto a su apoyo sin condición.

Gracias a mi prometido, Efrén Ulloa Peña, por acompañarme durante esta travesía y por regalarme alivio luego de un mal día.

Gracias a mis directores de tesis, al Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, por el tiempo, la atención y la enseñanza brindada a cualquier hora y en repetidas ocasiones durante el día. Por estimular mi razonamiento crítico y convencerme de continuar sin temor. Al Dr. Daniel Marrero Rodríguez, por alentarme a siempre saber más con la exigencia que le caracteriza, por los mensajes y llamadas contestadas para cualquier duda teórica o experimental. Gracias a ambos por hacer este proyecto posible.

Gracias a mi equipo del laboratorio del Departamento de Biomedicina Molecular (CINVESTAV) y de la Unidad de Investigación en Endocrinología Experimental (CMN Siglo XXI), que siempre se preocuparon por ayudarme a obtener mejores resultados. A Lory, por encontrar en ella una amiga y compañera de trabajo, con su apoyo incondicional en lo académico y lo personal. A Pilar, por regalarme su conocimiento práctico y teórico. A Julio, por mantener el material de trabajo disponible todo el tiempo. A Rosalía, por la retroalimentación continua. A Benjamín, por escuchar mis ¡Eureka! y desilusiones constantes. A Miguel, Carlos, Guillermo, Francisco, Nadia y Manuel, por contribuir a un entorno de trabajo lleno de risas. A Gloria y Eduardo, por permitirme transmitir mi saber y aprender a su vez.

Gracias a la Dra. Rosaura Hernández Rivas por su atención durante el desarrollo de este proyecto y darme las facilidades en mi primer acercamiento en la evaluación de la expresión de los miRNAs a lado de Lissuly.

Gracias a mis profesores y compañeros del CINVESTAV, que contribuyeron a mi formación durante la Maestría. Gracias Miguel por estar para mí en las etapas llenas de dificultades.

Índice

1. Resumen	1
1.1 <i>Abstract</i>	2
2. Introducción	4
2.1 Demencia.....	4
2.1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	4
2.1.2 Epidemiología	5
2.1.3 Fisiopatología	6
2.1.4 Mutación “Jalisco”, mutación en PSEN1 (A431E)	15
2.2 La Enfermedad de Alzheimer Familiar como modelo de estudio de la EA	21
2.2.1 Células precursoras neurales	24
2.3 Epigenética: microRNAs.....	31
2.3.1 Biogénesis de los miRNAs	31
2.3.2 Funciones de los microRNAs	37
3. Antecedentes Directos.....	40
3.1 microRNAs en la EAF	40
4. Justificación	41
5. Hipótesis.....	42
6. Objetivos.....	42
6.1 Objetivo general	42
6.2 Objetivos particulares.....	43
7. Materiales y métodos.....	43
7.1 Familia de estudio	43
7.1.1 Criterios de inclusión.....	44
7.1.2 Criterios de no inclusión.....	45
7.1.3 Criterios de exclusión.....	45

7.1.4 Consideraciones bioéticas	46
7.2 Obtención y cultivo de las células precursoras neurales del epitelio olfatorio	46
7.3 Extracción de RNA total	46
7.3.1 Cuantificación, pureza e integridad del RNA.....	47
7.4 Elaboración de los microarreglos de expresión	51
7.4.1 Recomendaciones implementadas del plan de Affymetrix para mantener la consistencia del procedimiento.....	52
7.4.2 Preparación del control de RNA.....	53
7.4.3 Preparación de los controles de RNA Poli(A).....	53
7.4.5 Síntesis de la segunda cadena de cDNA.....	55
7.4.6 Síntesis de cRNA por transcripción <i>in vitro</i>	55
7.4.7 Purificación del cRNA	56
7.4.8 Segundo ciclo de síntesis de cDNA monocatenario.....	58
7.4.9 Hibridación de los microarreglos WT	62
7.4.10 Lavado y tinción de los microarreglos	63
7.4.11 Escáner de los microarreglos.....	63
7.5 Cuantificación de los microRNAs por RT-qPCR	64
7.5.1 Adición de la cola poli(A) y retrotranscripción simultánea.....	65
7.5.2 Diseño de <i>primers</i> específicos para cada miRNA	66
7.5.3 Cuantificación de la expresión de los microRNAs por qPCR.....	67
7.6 Corroboración de la transcripción de la mutación PSEN1 (A431E)	68
7.6.1 Diseño de <i>primers</i>	68
7.6.2 Retrotranscripción del mRNA.....	68
7.6.3 PCR punto final.....	69
7.6.4 Purificación del producto de PCR	71
7.6.5 Secuenciación de la mutación PSEN1 (A431E)	72
7.7 Curva de fusión o disociación (<i>Melt Curve</i>)	73

7.7.1 <i>High Resolution Melt (HRM)</i>	73
8. Resultados.....	74
9. Discusión.....	90
10. Conclusión.....	97
11. Bibliografía.....	98
12. Anexos.....	115

Índice de Figuras

Figura 1. Cambios patológicos en el cerebro de individuos con EA.....	6
Figura 2. Placas amiloides y ovillos neurofibrilares.	7
Figura 3. Diseminación de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares en el cerebro en la progresión de la EA.	8
Figura 4. Los ovillos neurofibrilares están compuestos de proteínas tau hiperfosforiladas.	10
Figura 5. Procesamiento de la proteína precursora amiloide.....	11
Figura 6. Mutaciones en la proteína Presenilina 1.....	15
Figura 7. Mecanismos subyacentes a la neurogénesis y plasticidad del bulbo olfatorio.	25
Figura 8. Información centrípeta y centrífuga desde y hacia el bulbo olfatorio	26
Figura 9. Biogénesis de los microRNAs.	35
Figura 10. Mecanismos de regulación de los miRNAs.....	40
Figura 11. Pedigrí de la familia de estudio y análisis genético..	44
Figura 12. Flujo de trabajo del proceso de amplificación, marcaje, fragmentación e hibridación de las muestras en los microarreglos.	51
Figura 13. Flujo de trabajo del diseño de primers por miRprimer.....	66
Figura 14. Integridad de las muestras de RNA total.	75
Figura 15. El producto de PCR de PSEN1 es específico y del tamaño esperado..	76
Figura 16. El alelo mutado se transcribe independientemente de la edad o presentación de síntomas.....	77
Figura 17. Análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles de expresión de miRNAs en células precursoras neurales que portan la mutación A431E..	78
Figura 18. Mapa de calor del perfil de expresión RNAs codificantes y no codificantes expresados diferencialmente en células precursoras neurales de individuos sanos e individuos afectados por la mutación A431E.....	81
Figura 19. Expresión diferencial de microRNAs en células precursoras neurales de individuos afectados por la mutación A431E.....	82

Figura 20. Mapa de calor del perfil de expresión de miRNAs expresados diferencialmente en células precursoras neurales de individuos sanos e individuos portadores de la mutación A431E.....	83
Figura 21. miRNAs expresados diferencialmente en las células precursoras neurales con la mutación A431E asociados a la edad.	84
Figura 22. Predicción de los genes diana de los miRNAs.	87
Figura 23. miR-146a-5p se sobre-expresa en las células precursoras neurales derivadas de la cavidad nasal de individuos portadores de la mutación A431E (PSEN1).....	88

Índice de Tablas

Tabla 1. Comparación de las propiedades biológicas de las células mesenquimales derivadas de la mucosa olfatoria o de la médula ósea.	29
--	----

Índice de Anexos

Anexo 1. Genes blancos predichos para los miRNAs encontrados alterados en su expresión en las células precursoras neurales PSEN1 (A431).....	115
Anexo 2. Enfermedades asociadas a los genes blanco del perfil de miRNAs alterados en su expresión en la mutación PSEN1 (A431E).....	121
Anexo 3. Procesos biológicos posiblemente alterados en las células precursoras neurales con la mutación en PSEN1 (A431E).	124
Anexo 4. Las vías de los miRNAs en miembros afectados PSEN1 A431E anotados por KEGG a través de DIANA-miRPath v3.0.....	126
Anexo 5. Vías metabólicas que podrían estar alteradas por la regulación de los genes blanco de los miRNAs, en las células precursoras neurales PSEN1 (A431E).....	128
Anexo 6. Secuencia de los primers para la validación de los miRNAs por qPCR	130
Anexo 7. Los miRNAs que están alterados en su expresión en las células precursoras neurales PSEN1 (A431) podrían ser encontrados en otros tejidos y fluidos corporales	131

1. Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo y el principal tipo de demencia en el mundo. El aumento en su incidencia representa un problema creciente de salud pública y las proyecciones de la población mundial y nacional, sugieren que la prevalencia y la incidencia serán mayor sino se desarrollan métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamientos eficaces.

La Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) se presenta en individuos menores a 65 años y se ha reportado que mutaciones en los genes de APP, PSEN1 y PSEN2 podrían ser suficientes para provocar el desarrollo de esta variante de la Enfermedad. La forma esporádica de la EA se relaciona más con la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E, el cual puede incrementar hasta 12 veces el riesgo de desarrollar la enfermedad y se ha usado como un alelo marcador asociado a la enfermedad. En el mismo sentido, todavía hay investigaciones en busca de nuevos marcadores que puedan servir para el diagnóstico y pronóstico de la Enfermedad de Alzheimer y dentro de ellos se encuentran los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son pequeñas moléculas de ~22 ribonucleótidos de longitud caracterizados por su capacidad de regular la expresión génica y las funciones celulares, por lo que su desregulación ha sido relacionada con la formación y progresión de diferentes patologías, incluyendo a la EA. Hasta la fecha, la mayoría de los estudios que involucren a células del linaje neural durante la enfermedad, son realizados en los estadios ya diferenciados, como las neuronas. Son pocos estudios los que han evaluado la desregulación de los miRNAs en células precursoras neurales, por lo que es importante determinar si las mutaciones responsables de los procesos neurodegenerativos tienen un efecto en el perfil de expresión de los miRNAs y conocer su papel en la fisiología celular de las células afectadas.

A pesar de que existen más de 220 mutaciones relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer Familiar, en México sólo se ha reportado una

mutación particular (fundadora) en PSEN1, con un origen en el estado de Jalisco. La mutación PSEN1 (A431E) presenta una sustitución de un nucleótido que provoca un cambio del aminoácido Alanina en la posición 431 por un ácido glutámico dentro de la proteína. Esta mutación, aparte de la demencia tipo Alzheimer, puede provocar paraparesis espástica de las extremidades inferiores en los individuos que la poseen, con un comportamiento autosómico dominante, de penetrancia completa. Los síntomas ocurren cercano a los 50 años y los individuos fallecen aproximadamente a los 55 años. Hasta la fecha no se sabía nada de las alteraciones que esta mutación provoca en la fisiología de las células y que pudieran explicar el desarrollo de la enfermedad. Mediante microarreglos de expresión, encontramos que la mayoría de los transcritos diferenciales entre las células portadoras de la mutación A431E (PSEN1) y las control, se sub-expresan. Entre los transcritos diferenciales, identificamos a 4 miRNAs sobre-expresados (miR-130b, miR-3142, miR-147b y miR-146a) y 3 sub-expresados (miR-32, miR-4521 y miR-1178) cuya expresión nos permite diferenciar la condición portadora mutación del control. Los transcritos que potencialmente podrían ser regulados por estos miRNAs relevamos que estas células podrían estar alteradas durante los procesos de diferenciación hacia el linaje neuronal y glial, su capacidad regenerativa en los cerebros de los pacientes podría estar disminuida debido a un posible arresto celular y las vías de señalización que podrían estar implicadas están relacionadas con proliferación (p53, ciclo celular) y con inflamación (NF- κ B).

1.1 Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder and the main type of dementia in the world. The increase in its incidence represents a growing problem in public health and the projections of the world and national population, suggest that the prevalence and incidence will be greater if diagnosis, prognosis and effective treatment methods are not developed.

Familial Alzheimer's disease (FAD) occurs in individuals younger than 65 years and it has been reported that mutations in the APP, PSEN1 and PSEN2 genes could be enough to cause the development of this variant of the disease. The sporadic form of AD is more related to the presence of the $\epsilon 4$ allele of Apolipoprotein E, which can increase up to 12 times the risk of developing the disease and has been used as a marker allele associated with the disease.

In the same sense, there is still research looking for new markers that can be used for the diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease and within them are the microRNAs (miRNAs). The miRNAs are small molecules of ~22 ribonucleotides in length characterized by their ability to regulate gene expression and cellular functions, so their deregulation has been related to the formation and progression of different pathologies, including AD. In fact, most studies involving neural lineage cells during the disease are performed in differentiated stages, such as neurons. There are few studies that have evaluated the deregulation of miRNAs in neural precursor cells, so it is important to determine if the mutations responsible for neurodegenerative processes have an effect on the expression profile of miRNAs and know their role in cell physiology of the affected cells.

Although there are more than 220 mutations related to FAD, in Mexico only one particular mutation (founder) has been reported in PSEN1, with an origin in the state of Jalisco. The PSEN1 mutation (A431E) presents a substitution of a nucleotide that causes a change of the amino acid Alanine at position 431 by a glutamic acid within the protein. This mutation, apart from Alzheimer's type dementia, can cause spastic paraparesis of the lower extremities in the individuals who possess it, with an autosomal dominant behavior, of complete penetrance. Symptoms occur close to the age of 50 and individuals die at approximately 55 years old.

To date, nothing was known of the alterations that this mutation causes in the physiology of the cells and that could explain the development of the disease. Using microarray expression, we found that most of the differential transcripts

between the carrier cells of the A431E (PSEN1) mutation and the control ones are sub-expressed. Among the differential transcripts, we identified 4 up-regulated miRNAs (miR-130b, miR-3142, miR-147b and miR-146a) and 3 down-regulated miRNAs (miR-32, miR-4521 and miR-1178) whose expression allows us to differentiate the mutation carrier condition from the control. The transcripts that could potentially be regulated by these miRNAs revealed that these cells could be altered during the processes of differentiation towards the neuronal and glial lineage, their regenerative capacity in the brains of the patients could be diminished due to a possible cellular arrest and the pathways of signaling that could be involved are related to proliferation (p53, cell cycle) and inflammation (NF-κB).

2. Introducción

2.1 Demencia

La demencia es un síndrome neurodegenerativo que interfiere progresivamente con la función cognitiva de un individuo, afectando la memoria, el habla, el lenguaje, el juicio, el razonamiento, la planificación y otras habilidades del pensamiento cognitivo, las cuales se ven reflejadas en el rendimiento de las actividades cotidianas, lo que finalmente puede conducir a un estado de discapacidad y dependencia con el desarrollo de la demencia¹⁻³.

2.1.1 Enfermedad de Alzheimer

Dentro de las demencias, la EA es el principal, con aproximadamente el 60-80% de todos los casos y ha sido clasificada de varias formas: a) de acuerdo con la edad de inicio de aparición de los síntomas o b) con respecto a su etiología. En el primer caso, se clasifica de acuerdo a la edad en la que aparecen los primeros síntomas; es decir, si inician después de los 65 años, se denomina Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD, por sus siglas en inglés, *late-onset Alzheimer Disease*) y si los síntomas se presentan antes de esa edad, se denomina Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano (EOAD, por sus siglas en inglés, *early-onset Alzheimer Disease*)². Se estima

que la EOAD aporta, aproximadamente, el 5% de los casos de la EA, aunque clínicamente tanto la LOAD, como la EOAD son similares, generalmente el Alzheimer de inicio temprano está asociado a una progresión más rápida, y más del 75% de los casos de EOAD han sido atribuidos a mutaciones con un patrón de herencia mendeliana dominante⁴⁻⁵. Por otro lado, la clasificación que se ha hecho basándose en la etiología de la enfermedad, se divide en la Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE) (~96%) y en la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) (~4%); en el primer caso el origen es desconocido y se asocia a condiciones multifactoriales; por el contrario, en la EAF se han propuesto que mutaciones en tres genes: Proteína Precursora del Amiloide (APP), Presenilina 1 (PSEN1) y Presenilina 2 (PSEN2), son los implicados en el desarrollo de la enfermedad, ya que estos genes codifican para proteínas involucradas en el procesamiento de APP y en la generación del péptido β A (β -Amiloide), fuertemente implicado en la fisiopatología de la EA. Las mutaciones en estos genes asociadas a la EAF poseen típicamente una penetrancia total, son de herencia autosómica dominante y suelen conducir a la agregación del β A y consecuentemente, al inicio temprano de la enfermedad⁶. Basados en el descubrimiento de las mutaciones en los genes de APP y PSEN que conllevan al desarrollo de EAF, Hardy y Higgins propusieron la hipótesis de la “cascada amiloide”, que sugiere que la sobreproducción del β A y su eliminación deficiente, es suficiente para desencadenar los eventos moleculares que conducen tanto a la formación de las marañas neurofibrilares como a la muerte neuronal⁷.

2.1.2 Epidemiología

De acuerdo con el reporte mundial de la EA, en el 2015 había cerca de 47 millones de adultos mayores que padecían EA y otras demencias, y estiman, que esta cifra se incrementa a 131.5 millones para el 2050⁸, mientras que la OMS prevé que el número de individuos total con demencia para el 2050 alcance los 152 millones debido al aumento poblacional en los países de bajo y medio ingreso económico⁹, como nuestro país.

Por otro lado, en el 2015, se reportó en México una prevalencia del 7.3% y una incidencia de 27.3 (1,000 personas/año) de la población adulta mayor para la EA¹⁰. De acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), en México hay más de 350,000 personas que están afectadas por la EA y mueren por ella anualmente 2,030 pacientes¹¹. Además del impacto en la calidad de vida de quien padece la EA y el impacto social que conlleva, el impacto económico que se deriva del cuidado de los enfermos con demencia es de 6,157 dólares *per cápita*, que será mayor si no se generan estrategias específicas para su diagnóstico temprano, así como la generación de tratamientos oportunos y efectivos, ya que el cambio demográfico en México y en el mundo hacia el envejecimiento poblacional, refleja la transformación de los requerimientos para el cuidado de este grupo de edad debido al aumento en la prevalencia de enfermedades crónicas-degenerativas al envejecer¹⁰.

2.1.3 Fisiopatología

La EA presenta tres anomalías en el cerebro. Primero, el cerebro se atrofia, con circunvoluciones estrechas, surcos ensanchados, un peso cerebral reducido y un agrandamiento de los ventrículos (Figura 1). Aunque estos cambios también pueden observarse en personas mayores que no tienen problemas cognitivos, las anomalías son más leves a diferencia de aquellos que padecen de una EA avanzada¹².

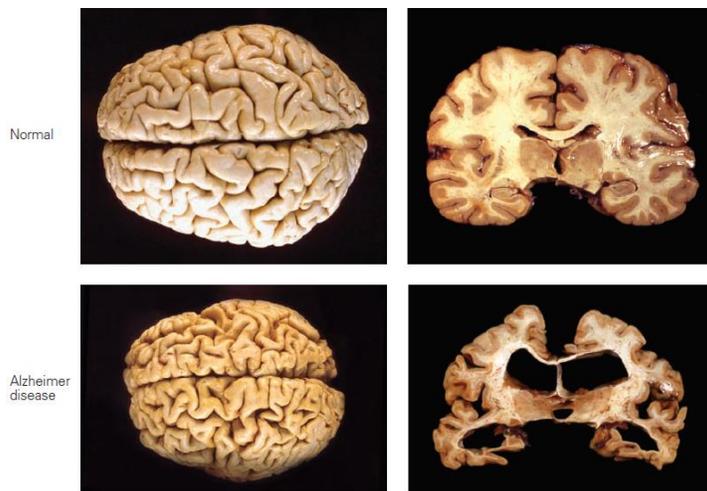


Figura 1. Cambios patológicos en el cerebro de individuos con EA. Se muestra la comparación de un cerebro normal contra un paciente con EA de la misma edad. El cerebro del paciente con EA muestra

marcada contracción y aumento del espacio ventricular¹².

Segundo, la EA se caracteriza por presentar dos lesiones histopatológicas típicas, como son a) los depósitos de proteína β A denominados placas amiloides y b) las marañas u ovillos neurofibrilares compuestos de proteína tau hiperfosforilada² (Figura 2).

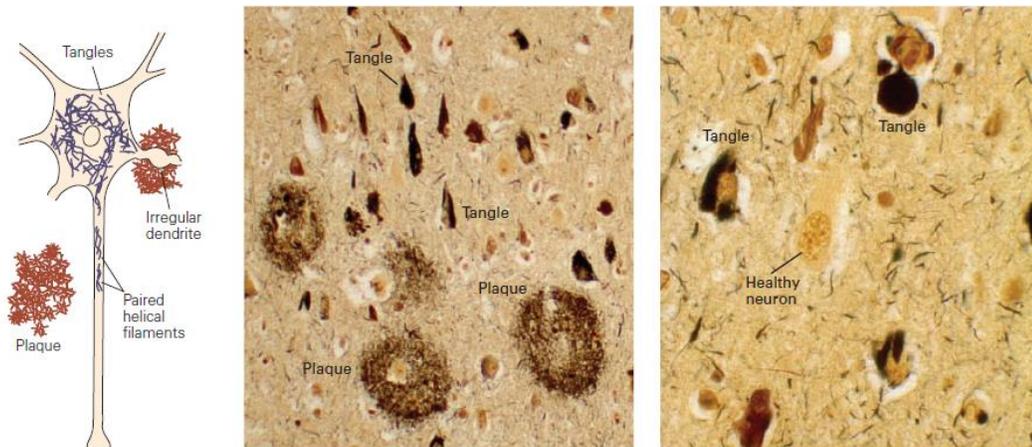


Figura 2. Placas amiloides y ovillos neurofibrilares. En las imágenes se muestra una sección de la corteza cerebral de un individuo con la EA con las características típicas de este padecimiento. A la izquierda, el diagrama muestra una neurona que contiene ovillos neurofibrilares, compuestas de filamentos en forma de hélice pareados en el cuerpo celular y más filamentos helicoidales en el axón. Las placas amiloides se muestran en el neuropilo (región entre varios cuerpos celulares), una de ellas alrededor de una dendrita, que muestra una forma alterada e hinchada. Los ovillos neurofibrilares están compuestos de polímeros anormales de proteína tau hiperfosforilada, y las placas amiloides son depósitos extracelulares de polímeros del péptido β A. La figura central representa una sección de neocorteza de un paciente con Alzheimer teñida con plata. El tejido muestra cuerpos de células neuronales que contienen ovillos neurofibrilares y el neuropilo que contiene placas amiloides. La imagen de la derecha es un acercamiento de la muestra de la

corteza cerebral, donde se muestran los ovillos en los cuerpos neuronales y, además, una neurona sana, sin ovillos¹².

Y tercero, estas alteraciones no ocurren uniformemente en el cerebro, sino que afectan regiones específicas. El área entorrinal, el hipocampo, la neocorteza y el núcleo basal, son especialmente vulnerables al desarrollo de estas estructuras. Las alteraciones en la corteza entorrinal y el hipocampo son probablemente los responsables de los problemas con la memoria, la cual es uno de los primeros síntomas de la EA. Estas alteraciones contrastan con aquellos en los circuitos frontoestriatales que se correlacionan con un declive cognitivo relacionado con la edad en sujetos normales. Anormalidades en el prosencéfalo basal colinérgico pueden contribuir a las dificultades cognitivas que aparecen durante la progresión de la enfermedad. Estas diferencias anatómicas, junto con la muerte neuronal generalizada, sugieren que la EA no es una forma “extrema” de los procesos normales de envejecimiento, como antes se proponía¹² (Figura 3).

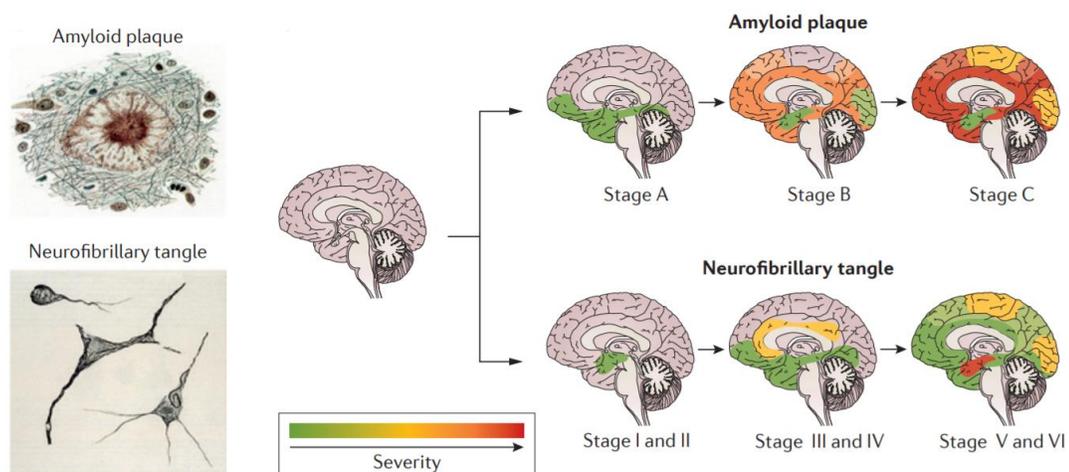


Figura 3. Diseminación de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares en el cerebro en la progresión de la EA. En los casos típicos de la EA, el depósito β A precede a los cambios neurofibrilares y neuríticos con un origen aparente en los lóbulos frontal y temporal, hipocampo y sistema límbico. Con menos frecuencia, la enfermedad parece surgir de otras regiones

de la neocorteza cerebral (lóbulos parietal y occipital) con una relativa preservación del hipocampo. Los ovillos neurofibrilares y la degeneración neurítica comienzan en los lóbulos temporales medios y el hipocampo, y luego se diseminan progresivamente a otras áreas de la neocorteza¹³. La deposición de β A (A, B, y C) y los ovillos neurofibrilares (estadios I-VI) fueron ilustrados de acuerdo con Braak y Braak¹⁴.

2.1.3.1 La proteína Tau y la EA

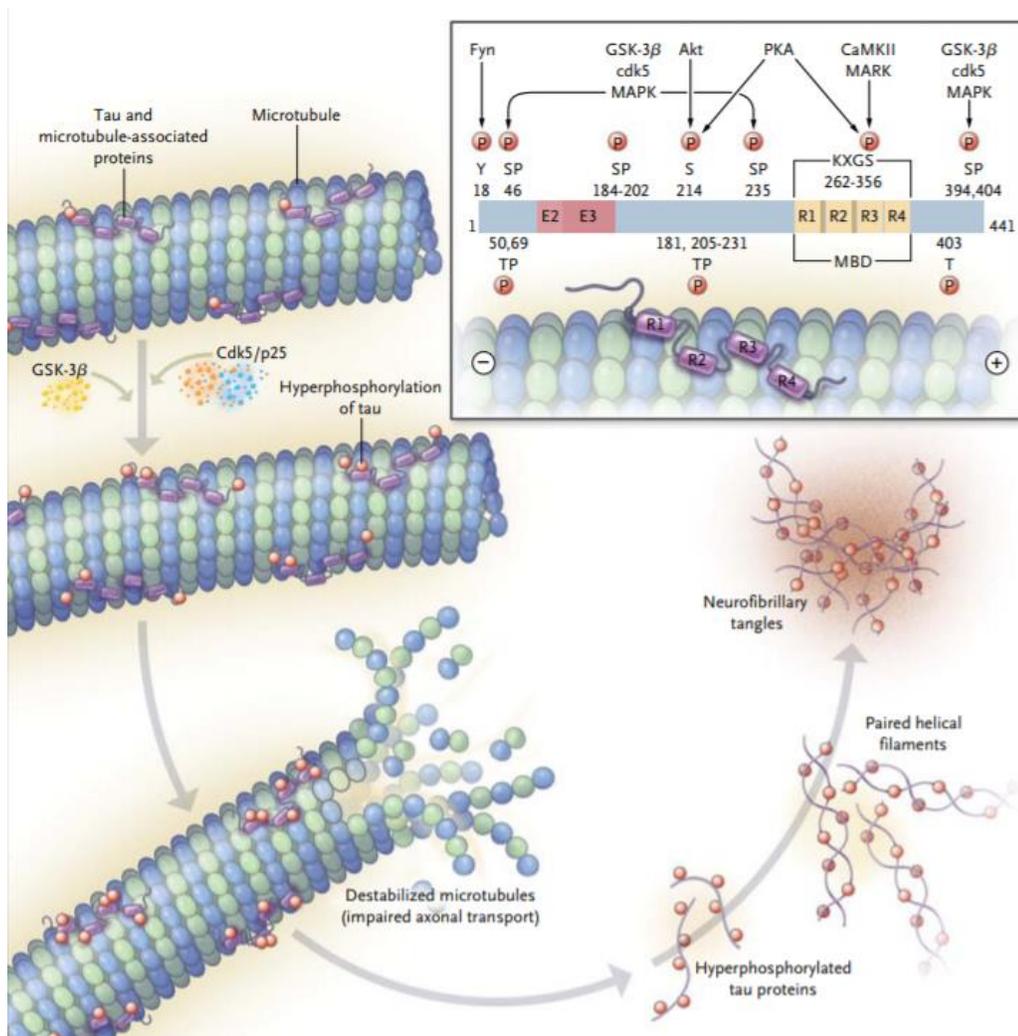


Figura 4. Los ovillos neurofibrilares están compuestos de proteínas tau hiperfosforiladas. Cuatro secuencias repetidas (R1-R4) forman el dominio de unión a microtúbulos (MBD) de Tau¹³.

La fosforilación normal de tau ocurre en los residuos de serina (S) y treonina (T), numerados de acuerdo con su posición en la secuencia completa de tau. Mientras tanto, los residuos de prolina (P) son fosforilados por la cinasa glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β), cinasa dependiente de ciclina (Cdk5) y su subunidad activadora p25, o proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Las cinasas no dirigidas a prolina Akt, Fyn, proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa dependiente de calmodulina/Ca²⁺ 2 (CaMKII) y la cinasa reguladora de la afinidad de microtúbulos (MARK) también se ejemplifican. KXGS (lisina, un aminoácido desconocido u otro, glicina y serina) es un motivo diana. Los sitios que suelen ser hiperfosforilados tienden a flanquear la MBD. La unión de Tau promueve el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos, sin embargo, la actividad de las cinasas excesivas y/o las actividades de fosfatasas reducidas, causan la hiperfosforilación de Tau y como consecuencia, la tau hiperfosforilada pierde su asociación con los microtúbulos normales, los cuales comienzan a desensamblarse y a asociarse con filamentos helicoidales pareados que son secuestrados en los ovillos neurofibrilares (Figura 4)¹³.

2.1.3.2 El beta amiloide y la EA

El β A se expresa de manera ubicua en el cuerpo, sin embargo, las dos formas más comunes del β A son residuos de 40 y 42 aa. En la EA la proporción de estos péptidos es de aproximadamente 1:10 (40 y 42 aa) en la sustancia gris del cerebro¹⁵. Estas dos formas difieren en el extremo C-terminal, donde la longitud es determinada por el sitio de corte de la γ -secretasa (Figura 5).

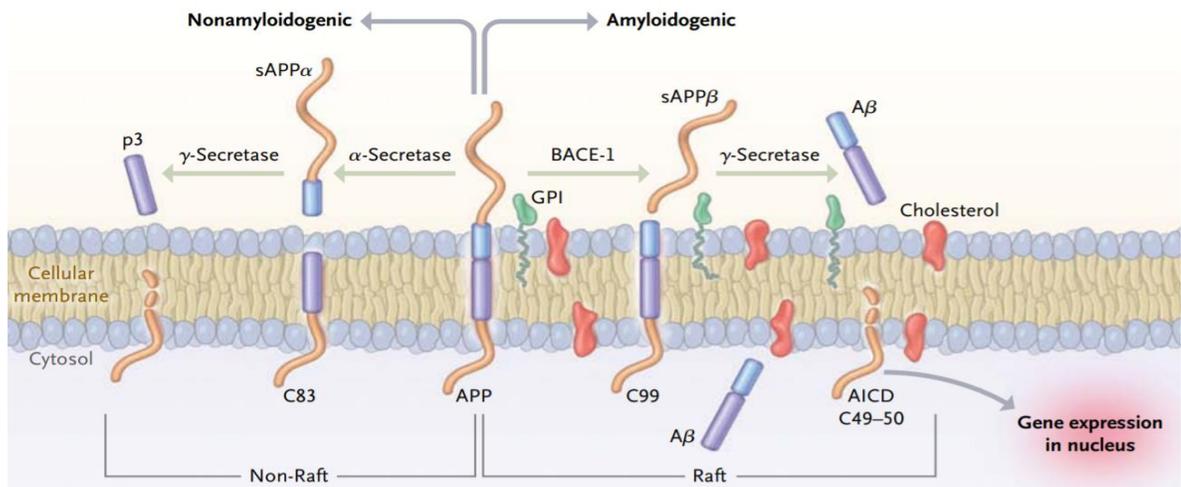


Figura 5. Procesamiento de la proteína precursora amiloide. La escisión que hace la α -secretasa en el interior de la secuencia del péptido β A inicia el proceso no amiloidogénico liberando el dominio extracelular de la proteína precursora (sAPP α) dejando atrás un fragmento carboxi-terminal de 83 aa (C83), que luego es digerido por la γ -secretasa, liberadora del fragmento p3 extracelular (no patogénico). Por otro lado, el procesamiento amiloidogénico es iniciado por la β -secretasa (BACE-1). El fragmento C99 que se queda anclado a la membrana también es un sustrato de la γ -secretasa, generando β A y el dominio intracelular amiloide (AICD). La escisión por la γ -secretasa se produce dentro de la membrana celular en un proceso único denominado “proteólisis intramembrana regulada”. sAPP α y sAPP β son fragmentos de APP secretados después de los cortes de α -secretasa y β -secretasa, respectivamente. AICD es una cola corta (50 aa aprox.) que se libera en el citoplasma después de las segmentaciones progresivas de ϵ a γ por la γ -secretasa. AICD puede dirigirse al núcleo, como un factor de señalización y activador de la transcripción. Las balsas lipídicas son microambientes membranales fuertemente enriquecidos en esfingomielina, colesterol y proteínas ancladas por glicofosfatidil-inositol (GPI), asociadas a la vía amiloidogénica por facilitar la producción y agregación del β A. El β A₄₂ soluble es el más propenso a la agregación¹⁶.

2.1.3.2.1 Enzimas involucradas en la producción del beta amiloide

Como se mencionó anteriormente, la APP puede sufrir escisión en tres lugares diferentes: dentro del dominio β A vía α -secretasa; en el N-terminal del dominio β A a través de la β -secretasa y en el C-terminal del dominio β A por la γ -secretasa. Por lo anterior, los roles de la α , β y γ -secretasa son esenciales en el desarrollo de la EA.

La α -secretasa (ADAM10), es una enzima metaloproteasa que está localizada en la membrana celular y en el aparato de Golgi, que escinde a la APP en el residuo L688 localizado en el centro del dominio β A. El corte en la APP resulta en la generación y secreción de un fragmento de la APP soluble (sAPP α) al cual se le han asociado propiedades neuroprotectoras por observarse niveles disminuidos en líquido cefalorraquídeo de pacientes con la EA comparado con individuos sanos, al mismo tiempo que previene la formación del péptido β A al realizar su corte dentro de su secuencia¹⁷. *In vivo*, se han generado ratones transgénicos que sobre-expresan a la α -secretasa, observando que el incremento de la expresión de la α -secretasa conlleva a la reducción de la formación de péptidos β A y a su deposición en placas neuríticas. Además, también han observado que la cantidad del sAPP β es menor, indicando que hay una competición entre las principales vías proteolíticas para APP. Por el contrario, el ratón *knock out* de α -secretasa muere tempranamente, así que se han caracterizado a ratones transgénicos que expresan una α -secretasa en su forma catalíticamente inactiva que conduce a un aumento en número y tamaño de las placas amiloides en el cerebro de los ratones transgénicos¹⁸.

La privación trófica del NGF (*Neural Growth Factor*) desencadena la escisión de la superficie de APP por β -secretasa, liberando al sAPP β , que es escindido por un mecanismo hasta ahora desconocido, para liberar la porción N-APP, que se une a DR-6 (*Death Receptor 6*) para desencadenar la degeneración por la vía de apoptosis intrínseca a través de la caspasa-6 en axones y la

caspasa-3 en los cuerpos celulares de las neuronas. Además, es posible reducir la degeneración local de axones sensoriales en condiciones privadas de NGF cuando se adiciona un inhibidor (OM99-2) de β -secretasa¹⁹. Aunque el sAPP β y el sAPP α son idénticos en secuencia, parece que las funciones asociadas con neuroprotección son afectadas por las diferencias en los 16 aminoácidos en el extremo C-terminal de esas dos sAPP.

Mientras tanto, la γ -secretasa es una aspartil proteasa transmembranal que está formada por un ensamblaje secuencial de Aph-1 (*Anterior pharynx defective-1*), Nicastrina, Presenilina 1 o 2 y PEN-2 (Potenciador de Presenilina-2). Aph-1 y Nicastrina se unen para formar el andamio, enseguida se incorpora Presenilina 1 y después PEN-2, desencadenando la endoproteólisis de la Presenilina 1 y activándola. Nicastrina es una proteína transmembrana de un solo paso, juega un papel en andamiaje, estabilización enzimática, en el tráfico y en el reconocimiento de sustrato. Aph1 es una proteína transmembrana de 7 pasos, es crucial para el andamiaje y la estabilidad; puede tener un papel adicional en la determinación de la longitud de péptidos dependiendo de la isoforma que se incorpore al complejo de la γ -secretasa. La Presenilina 1 es una proteína transmembrana de 9 pasos y es la subunidad catalítica de la γ -secretasa, que necesita ser endoproteolizada en un fragmento N-terminal/C-terminal para ser enzimáticamente activa. El PEN-2, es una proteína transmembrana de 2 pasos, se requiere para la endoproteólisis de Presenilina y, por lo tanto, contribuye a la regulación de la activación de γ -secretasa. La γ -secretasa corta el fragmento C-terminal de APP seguido por un corte de α y β -secretasa para liberar el dominio citoplasmático de APP (sAPP β y sAPP α), así como el péptido βA_{1-40} y el βA_{1-42} . El corte por la γ -secretasa es influenciado por la Presenilina 1 o 2, pues mutaciones en su secuencia, así como en APP, podrían determinar el lugar en donde se escindiría la APP²⁰.

Haapasalo y Kovacs recopilaron la posible función fisiológica de la escisión de proteínas específicas mediada por PSEN/ γ -secretasa. Por ejemplo, los

dominios intracelulares resultantes de la escisión de diferentes sustratos se han involucrado en la regulación a nivel transcripcional tras su asociación con diferentes factores de transcripción, como APP, alcadeínas, CD44, Notch y sus ligandos Delta y Jagged, E- y N-cadherina, donde las formas de cadherinas de longitud completa están asociadas a adhesión celular, mientras que los dominios intracelulares son capaces de translocar al núcleo y regular la transcripción. Además de Notch, otros sustratos también se han implicado en la regulación del destino celular, por ejemplo, el producto intracelular generado de ErbB4 se ha asociado con la maduración de los oligodendrocitos y la subsiguiente expresión de proteínas asociadas a mielinización, así como su importancia en el mantenimiento del estadio precursor neural mediante el bloqueo de la diferenciación astrocítica. Otro evento es la regulación de la muerte celular, se ha mostrado que LRP1 facilita la endocitosis de APP y promueve la producción del β A y su captación celular, se ha sugerido también su papel sobre la muerte celular isquémica (durante la isquemia cerebral), tras observar la activación del complejo γ -secretasa en el hemisferio isquémico y la translocación nuclear del dominio intracelular de LRP1 en neuronas dentro de la penumbra isquémica, en donde su inhibición disminuía la oclusión de la arteria media cerebral inducida por la activación de la caspasa-3 en un ~50% en ratón. Otros sustratos después de la escisión mediada por γ -secretasa también se han asociado a la regulación del crecimiento de las neuritas, adhesión celular, angiogénesis, tumorigénesis, entre otros. Por lo cual, es evidente que la alteración del procesamiento mediado por γ -secretasa podría afectar la señalización biológica normal de sus sustratos contribuyendo a la neurodegeneración durante el curso de la patogénesis de la EA ²¹.

2.1.2.2 Mutaciones en Presenilina 1 (PSEN1)

Las mutaciones en el gen de Presenilina 1 (PSEN1) son las más comunes en los casos del Alzheimer Familiar y han sido reportadas al menos 253 mutaciones en este gen (Figura 6), donde la mayoría de ellas corresponden principalmente a sustituciones no sinónimas en familias de diferentes orígenes

étnicos y el efecto del ~90% (226) de las mutaciones conlleva al desarrollo de la EA⁵. Además, estas mutaciones se asocian con una marcada heterogeneidad en el fenotipo clínico, en el que el individuo portador de alguna mutación además de tener o no la sintomatología “típica” de la EA, puede cursar con otros padecimientos como parkinsonismo, mioclonía, ataques epilépticos, cambios conductuales del fenotipo de demencia frontotemporal, afasia y ataxia cerebelosa, así como paraparesia espástica^{5, 22}.

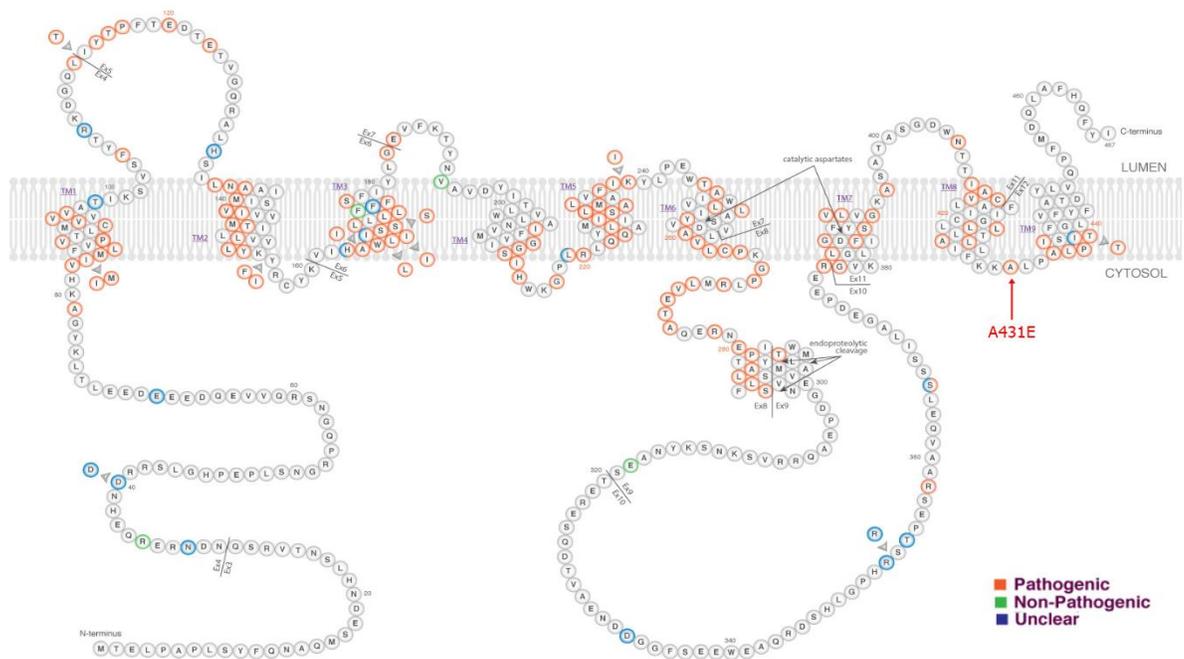


Figura 6. Mutaciones en la proteína Presenilina 1. Imagen tomada de Alzforum, Forest Biometrics Research Institute⁵. La flecha roja indica la localización de la mutación en la familia de estudio en la región citoplasmática.

2.1.4 Mutación “Jalisco”, mutación en PSEN1 (A431E)

En México, la mutación A431E ha sido identificada en la mayoría de los individuos diagnosticados con demencia temprana, principalmente en el estado de Jalisco, de donde se considera una mutación con efecto fundador y ha podido rastrearse en otras familias que radican en el extranjero e incluso, en otras entidades del país de México, incluida la CDMX²³⁻²⁶.

En el año 2001, Rogaeva y colaboradores identificaron a la mutación A431E en el gen de PSEN1, junto con otras mutaciones de nuevo registro. Esta mutación correspondía a una sustitución no sinónima en el nucleótido 1540, provocando el cambio de aminoácido de una Alanina a un Ácido Glutámico (GCA→GAA) y además, fue una de las mutaciones más frecuentes en su grupo de estudio que involucraba a sujetos con una edad promedio de 58 ± 11 años y con un diagnóstico clínico de la EA en su mayoría; sin embargo, no informaron los detalles clínicos ni la historia familiar de los individuos portadores de esta mutación²⁷.

Años más tarde, en el 2006, Yescas *et al.* describieron esta mutación en nueve familias mexicanas, aparentemente no relacionadas y con EOAD. Además, sugirieron que la mutación había sido originada de un ancestro común (efecto fundador) mediante la evaluación de dos microsatélites polimórficos que flanquean al gen PSEN1 (CA y GT), ya que todos los portadores de la mutación compartían el mismo haplotipo encontrado en controles de Jalisco (haplotipo ausente en controles de la CDMX). Por otro lado, todos los análisis de las relaciones genealógicas (o pedigrí) mostraban una transmisión autosómica dominante en al menos tres generaciones, con una edad promedio de presentación de síntomas de 40 años. Clínicamente, todos los pacientes con EOAD habían mostrado una atrofia subcortical mediante tomografía axial computarizada o resonancia magnética, pero solo se identificó que un 75% (9/12) de los pacientes portaban una mutación en el exón 12 del gen de la PSEN1: la mutación A431E, aunque también fue encontrada en el 31.7% (19/60) de los individuos consanguíneos, aún sin síntomas de la enfermedad²³.

En este mismo año, Murrell *et al.* identificaron a 20 pacientes adicionales que también portaban la mutación A431E provenientes de 15 familias (se desconoce si están relacionadas entre sí o con las familias reportadas anteriormente); 14 de las 15 familias eran de ascendencia mestiza mexicana y en 9 de ellas, podría rastrearse su ascendencia al estado de Jalisco, además, estos individuos tenían presentaciones clínicas similares a las reportadas por

Yescas *et al.* y también la edad promedio de inicio de síntomas coincidía (39.5 años); 9 de los 20 pacientes tuvieron paraparesia espástica dentro de los 5 años posteriores a la aparición de los primeros síntomas, pero todas las personas afectadas examinadas en una etapa moderadamente avanzada, mostraron cierto grado de rigidez piramidal en todas las extremidades y, por lo tanto, dicha espasticidad parece ser una cuestión de grado en lugar de estar presente o ausente²⁴; también tenían problemas cognitivos caracterizados por la pérdida de la memoria, y previamente, este grupo de trabajo había observado que los cambios psicológicos, especialmente la depresión, ocurrían de manera temprana en aquellos portadores de la mutación²⁸.

Al evaluar los niveles de βA_{42} y βA_{40} en plasma o líquido cefalorraquídeo entre los sujetos que tenían mutaciones en APP o PSEN1 (entre ellas A431E) contra los controles, dado que los niveles de este péptido ya se han observado alterados en asociación a otras mutaciones, Ringman *et al.* no encontraron diferencias en la comparación de los niveles de βA_{42} y βA_{40} , a excepción de la proporción $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ que fue mayor en los portadores, mientras que en líquido cefalorraquídeo, se mostraba que los niveles de βA_{42} y la proporción $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ eran menores en los que portaban alguna mutación, además, al ajustar a los individuos por edad, podía observarse una correlación negativa de $\beta A_{42}/\beta A_{40}$. Por otro lado, el grupo presintomático (de acuerdo con la escala CDR, por sus siglas en inglés *Clinical Dementia Rating*) que portaban alguna mutación tenían niveles más altos de plasma de βA_{42} y la proporción $\beta A_{42}/\beta A_{40}$. Los niveles de tau y tau hiperfosforilada también estaban elevados en aquellos individuos presintomáticos. Por lo que estos datos podrían indicar que los niveles de βA_{42} podrían disminuir conforme los individuos con EAF se acercan a la edad de demencia clínica; a su vez, el grupo de investigación propuso, que los niveles de tau podrían ser un indicador sensible de la etapa presintomática²⁹. Con la hipótesis de que el patrón de abundancia relativa refleja la producción y degradación del péptido βA , y que este patrón es distinto cuando se compara la Enfermedad de Alzheimer Esporádica (EAE) *versus* la Familiar, determinaron que los niveles bajos de βA_{42} en el líquido

cefalorraquídeo eran capaces de distinguir a pacientes con EAE y EAF de los controles sanos y pacientes deprimidos; estos tenían niveles bajos de βA_{42} y niveles altos de βA_{16} . Además, los pacientes con EAF mostraron niveles muy bajos de βA_{37} , βA_{38} y βA_{39} , fragmentos que se producen normalmente por la γ -secretasa y por otro lado, se observaron niveles altos de βA_{20} en comparación con los individuos con EAE, lo que sugiere que posiblemente la mutación en el gen de PSEN1 (A431E) modula el sitio de escisión del péptido precursor amiloide (APP) por la γ -secretasa³⁰.

A través de estudios de imagenología, observaron una disminución de extensas áreas de materia blanca, subyacente a la corteza motora en hombres que padecían paraparesis espástica asociada a la mutación en PSEN1 A431E, en comparación con mujeres que poseían otras mutaciones en PSEN1 (incluida A431E) y que no presentaban paraparesis espástica. Por otro lado, aunque no observaron diferencias significativas en los volúmenes de las estructuras cerebrales, encontraron que en todos los individuos con paraparesis espástica podían identificarse microhemorragias (n=3), pero solo una de las mujeres sin paraparesis espástica las tenía también (n=1/7). A su vez, no encontraron diferencias en la deposición del péptido βA en la corteza sensoriomotora, en este contexto, si los volúmenes de materia gris tampoco están alterados, la disminución de la materia blanca en la corteza motora podría explicar las anomalías motoras como un efecto de la mutación en PSEN1 A431E que podría no depender, o al menos no únicamente, del metabolismo de APP sino de otros sustratos³¹.

Hasta ahora, el grupo del Dr. Figuera, es el grupo con mayor contribución en la identificación de individuos portadores de la mutación A431E, puesto que han identificado esta mutación en aproximadamente el 75% (29/39) de los casos índice diagnosticados con Demencia Familiar de Inicio Temprano en el Centro Médico Nacional de Occidente-IMSS. La edad promedio del inicio de los síntomas es de 43.3 años, con una evolución de la enfermedad de 7.5 años y al morir de 48.9 años. A través de genealogías, han identificado a un total de

147 afectados y también a 304 familiares menores de 48 años considerados en riesgo y a 233 descendientes de estos pacientes, en riesgo potencial. Aunque no han especificado el cuadro clínico con el que cursan los portadores de la mutación, reportan que la mutación provoca una variabilidad en su presentación e invita a la caracterización clínica y molecular de estos pacientes, así como a la falta de un diagnóstico presintomático para los adultos en riesgo, dadas las implicaciones en los tiempos de diagnóstico²⁵.

Interesantemente, solo habían sido reportados casos heterocigotos para la mutación; sin embargo, el estado homocigoto de la mutación A431E parece conferir un fenotipo de anticipación, con un inicio clínico más temprano y una progresión más rápida de la neurodegeneración³².

Conforme el pasar de los años, más individuos que portan esta mutación son reportados y aún así, los artículos solo habían sido descriptivos y sin propuestas de los mecanismos moleculares que podrían estar conllevando al desarrollo de la enfermedad. Hasta ahora, nuestro grupo de investigación es quien ha reportado la caracterización clínica más completa de los individuos portadores de la mutación A431E, así como uno de los mecanismos moleculares que están afectados. Los sujetos con la mutación A431E incorporaban la paraparesis espástica en su cuadro clínico y coinciden con estudios anteriores observando una alta desmielinización. Las imágenes de la resonancia magnética muestran atrofia cortical grave e hiperintensidades extensas de la materia blanca periventricular, que está presente incluso antes de la paraparesis espástica, así como la hiperreflexia (reacción anormal y exagerada a la estimulación). Además, estas hiperintensidades correlacionan también con la disfunción olfatoria y el deterioro visual encontrado en los pacientes evaluados. Por otro lado, se encontró que la mutación A431E en PSEN1, provocaba un efecto moderado en la actividad del complejo sustrato-y secretasa, con una disminución significativa en la procesividad del sustrato (APP) en comparación con los controles (*in vitro*). En contraste con la mutación A431V (cambio a valina en lugar del ácido glutámico), tanto las vías βA_{49} y

βA_{48} mostraron una mayor disminución en la procesividad, resultando en la producción de los péptidos neurotóxicos más largos βA_{43} y βA_{42} . También se evaluó el procesamiento de APP en otras mutaciones causantes de paraparesis espástica y encontraron que todas esas mutaciones aumentaban la liberación del péptido βA_{43} en comparación con las mutaciones que conllevan al desarrollo de un Alzheimer Familiar “típico”. Este abordaje del estudio es importante, porque probablemente el perfil de isoformas del βA podrían ayudarnos a predecir entre la variedad de fenotipos que podría desarrollar un individuo con mutaciones asociadas a la EAF e inclusive en la EA, y no solo la evaluación común de la relación $\beta A_{42}/\beta A_{40}$ como se acostumbra, proponiendo así un modelo en donde los cambios cuantitativos de todas las isoformas podrían explicar mejor la fisiopatología de la EA en lugar de evaluar sólo los cambios cuantitativos de las isoformas más comunes. Cabe resaltar también, que la mutación A431E altera los cortes endoproteolíticos (ϵ -) y tipo carboxipeptidasa (γ -), lo que indica que existe una alta probabilidad de que otros sustratos, además de APP, estén implicados y participando en el desarrollo de aspectos importantes de la enfermedad²⁶.

La cantidad relativa de la PSEN1 mutante y de tipo silvestre incorporado en el complejo γ -secretasa, así como el potencial de la proteína mutante para afectar a este complejo enzimático, son factores importantes para la comprensión de la EAF causada por la mutación A431E en PSEN1, por lo anterior, otro grupo de investigación generaron una línea celular con la mutación A431E en el gen de PSEN1 en células de neuroglioma humano (H4), en las cuales la expresión de la PSEN1 recombinante mutante en presencia de la PSEN1 de tipo silvestre endógena, está bajo el control de un represor de tetraciclina. Tras medir los niveles de βA_{42} y βA_{40} en función de la relación de la expresión de la proteína PSEN1 tipo silvestre a la proteína mutante en el complejo de la γ -secretasa, demostraron que todas las células que poseían la mutación exhiben un comportamiento dominante negativo para βA_{42} y la producción total del βA . En contraste, la sobre-expresión de PSEN1 silvestre no tuvo efecto en βA_{42} ni en la producción total del βA . En la EAF causada por

mutaciones en PSEN1, la estabilidad relativa de la variante mutante de PSEN1, podría afectar el grado del efecto dominante negativo y, por lo tanto, contribuir significativamente a la gravedad de la enfermedad y la edad de aparición, sugiriendo que el aumento de la relación de la proteína de tipo silvestre a la PSEN1 mutante podría promover la normalización de la función de la γ -secretasa³³.

2.2 La Enfermedad de Alzheimer Familiar como modelo de estudio de la EA

La γ -secretasa participa en la escisión de muchas proteínas críticas para la homeostasis cerebral, por lo tanto, las manifestaciones en individuos que conllevan a una disfunción del complejo de la γ -secretasa, han contribuido al entendimiento de la EA a través de distintos modelos animales y celulares, incluyendo cambios bioquímicos y patológicos que se cree son los responsables de las manifestaciones clínicas de la EA que comienzan años o incluso décadas con antelación.

De hecho, la mayoría de los modelos de la Enfermedad de Alzheimer se basan en las mutaciones que determinan el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer Familiar. Sin embargo, un modelo es útil solo si conduce al desarrollo de una terapia efectiva o proporciona una mejor comprensión sobre los mecanismos biológicos que subyacen a los síntomas de la enfermedad y aunque aún no se ha producido un modelo que recapitule todos los aspectos de la EA, ya existen animales transgénicos que ofrecen reproducciones de un subconjunto de características de la EA³⁴.

Debido a la existente preocupación para caracterizar modelos de la enfermedad de Alzheimer y con el fin de comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad, así como para identificar modelos adecuados para investigar posibles terapias, se creó Alzforum, como una de las plataformas que ha recopilado y organizado la información sobre modelos animales (en rata y ratón) de la EA, denotando los fenotipos relacionados con la EA que muestran estos modelos, cuyos fenotipos comúnmente seleccionados involucran

aquellos modelos que generan la formación de placas neuríticas, ovillos neurofibrilares, pérdida neuronal y/o sináptica, gliosis o alteraciones cognitivas. Este recurso transmite lo que se conoce sobre cada uno de los modelos y nos facilita la comparación entre ellos, resaltando una vez más, que estos modelos son usados para evaluar eventos específicos de la patología⁵.

A menudo, las manipulaciones genéticas se pueden realizar más rápidamente en moscas y gusanos que en mamíferos y además pueden generar información que podría ser traducida a nuestra especie. El modelado genético en invertebrados generalmente se basa en dos métodos distintos, ya sea la manipulación de los genes ortólogos que están asociados con vías causantes de enfermedades y/o la expresión de proteínas humanas relacionadas con la patología, logrando así determinar aquellas características de la enfermedad que se han conservado durante la evolución, desde el efecto neurotóxico del péptido β A, así como diversos comportamientos durante la neurodegeneración, incluyendo la locomoción, el aprendizaje y la memoria, modelos utilizados también como una herramienta para la búsqueda de fármacos³⁴.

En rata o ratón, un modelo aceptable para la EA debe mostrar la neuropatología progresiva y los déficits cognitivos que son observados en el humano, por lo que se han desarrollado numerosos ratones transgénicos, que hasta la fecha solo han podido explorar un aspecto particular de la EA, ayudando al entendimiento de la deposición de las placas amiloides, la hiperfosforilación de Tau, la activación de la microglía, el daño oxidativo, la pérdida sináptica y el deterioro cognitivo progresivo, por mencionar algunos. Desafortunadamente, ninguno de los modelos disponibles ha ayudado a alcanzar una amplia explicación del origen de la enfermedad, especialmente para la EA del tipo esporádica, particularmente por la complejidad de su etiología. Por lo que otro tipo de modelos, como los sistemas celulares han comenzado a utilizarse para dilucidar las bases moleculares del desarrollo de

la enfermedad en el humano, de esta forma, las células pluripotentes inducidas (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cell*) surgen como una buena alternativa³⁴.

En la última década, las células pluripotentes inducidas han revolucionado la utilidad de los modelos *in vitro* de enfermedades neurológicas. En particular, los ensayos clínicos para la EA han fracasado, pues la brecha que existe entre las especies involucrada en el proceso de los descubrimientos iniciales usando los modelos de roedores a los estudios en humanos es muy grande. Además de que, la estratificación de pacientes es insuficiente debido a la falta de evaluación de marcadores fenotípicos y genéticos. Por lo que las iPSCs podrían ayudar en la comprensión de los diferentes posibles subtipos de la EA³⁵.

Algunos grupos de investigación ya han reportado la generación de iPSCs a partir de fibroblastos de pacientes con mutaciones en A246E (PSEN1) y N141I (PSEN2), en donde las neuronas diferenciadas *in vitro* muestran un aumento de la secreción del βA_{42} , recapitulando su mecanismo patológico de la EAF con mutaciones en PSEN³⁶. Se ha sugerido que los modelos celulares y la tecnología de iPSC puede ser usada para observar fenotipos relevantes de la EA, a pesar de que puede llevar décadas para que la enfermedad se manifieste en los pacientes, al obtener resultados con variaciones en los niveles de βA , TAU, GSK3 β en los fibroblastos que fueron diferenciados a neuronas, obtenidos de pacientes con EAF y EAE con respecto a los controles, similares a los niveles que se observan en los pacientes³⁷. Por otro lado, Solinsky *et al.* determinaron el impacto de la Alopregnanolona (Fase 1b para la EA) en Neural Stem Cells (NSCs) que fueron diferenciadas a partir de iPSCs derivadas de células T de pacientes con la mutación A431E en PSEN1. La Alopregnanolona en modelos de roedores se ha observado que promueve la proliferación y la diferenciación neuronal de las NSCs y mejora la función mitocondrial. En este estudio encontraron que este fármaco aumentó la respiración mitocondrial basal en un 25-38% y aumentó el número de células proliferativas determinadas por Ki67 entre un 12 y 52%, concluyendo que este

fármaco contribuye con la proliferación de las NSCs y su fenotipo metabólico, sugiriendo que las iPSCs podrían ayudar a monitorear la respuesta a la terapia³⁸. Pese a los resultados prometedores, aún se debate sobre qué tan reproducible es la funcionalidad de las células neurales a partir de iPSCs, así como la implicación de la reprogramación génica sobre los mecanismos moleculares de la enfermedad.

2.2.1 Células precursoras neurales

Las células troncales (o *Stem Cells*) tienen la capacidad de dividirse para renovarse (producir células troncales adicionales con las mismas propiedades y potencial) y algunas veces, tras las divisiones se producirán células hijas que son capaces de diferenciarse en múltiples tipos celulares. Las células troncales pueden ser “células precursoras pluripotentes” que dan origen a todos los tipos de células dentro de un organismo o “células precursoras multipotentes” que tienen la capacidad de diferenciarse en un subconjunto de tipos celulares³⁹.

Las células progenitoras o precursoras neurales (NPC, por sus siglas en inglés *Neural Progenitor/Precursor Cell*) son las células progenitoras del SNC (Sistema Nervioso Central) que dan origen a muchos, si no todos, los tipos de células gliales y neuronales que conforman al SNC. Las NPCs están presentes en el SNC de los embriones en desarrollo, pero también se encuentran en el cerebro adulto neonatal y maduro y, por lo tanto, no son células estrictamente embrionarias³⁹.

Se han propuesto dos mecanismos principales de neurogénesis. El primero es la renovación continua de las neuronas receptoras olfatorias desde las células basales a nivel del neuroepitelio olfatorio y la sinaptogénesis que se produce entre los axones de las células receptoras olfatorias y las células mitrales a nivel glomerular. El segundo, es la neurogénesis continua desde la zona subventricular (SVZ, *Sub Ventricular Zone*) del ventrículo lateral, lo que conlleva a la generación de neuroblastos que migran a lo largo de la corriente migratoria rostral y que se diferencian en interneuronas dentro del bulbo

olfatorio. Incluso, se ha propuesto la existencia de un mecanismo intrínseco del bulbo olfatorio⁴⁰ (Figura 7).

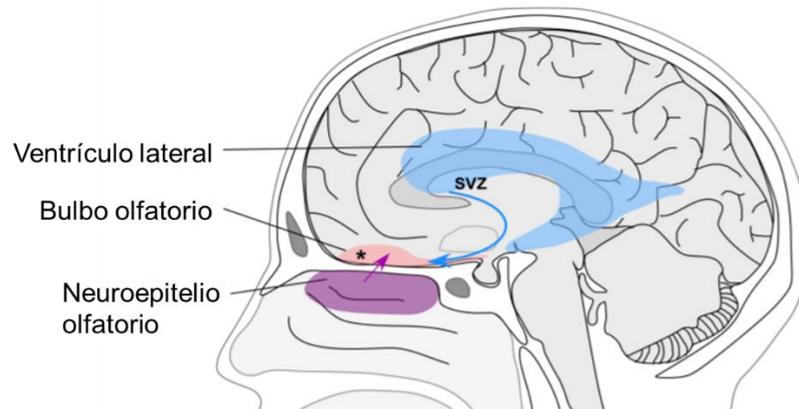


Figura 7. Mecanismos subyacentes a la neurogénesis y plasticidad del bulbo olfatorio. Imagen tomada de Huart *et al.*⁴⁰.

El olfato juega un papel importante en nuestra interacción con el medio ambiente, pero este sistema no solo actúa para la detección de peligros potenciales en el medio ambiente, como el humo, gases o polvo. El bulbo y el epitelio olfatorio desempeña un papel central en el procesamiento de la información olfativa y son aparentemente la única interfaz entre la periferia y el sistema nervioso central. El tracto olfatorio transmite información a un gran número de regiones cerebrales dentro del lóbulo frontal y la superficie dorsomedial del lóbulo temporal, a menudo denominada corteza olfativa primaria. En la Figura 8 podemos observar un esquema en donde A) los odorantes que llegan a la hendidura olfatoria estimulan a las neuronas receptoras olfatorias (ORN) ubicadas en el neuroepitelio olfativo. Los axones de las ORN hacen sinapsis con las neuronas de segundo orden al nivel del bulbo olfatorio. La información olfativa se transmite luego a la corteza olfatoria primaria (POC) (compuesta por la corteza piriforme, la corteza entorrinal, la corteza periamigdalóide, la región anterior del núcleo olfativo y el tubérculo olfativo). La corteza olfatoria primaria luego se proyecta, entre otras áreas, a la corteza orbitofrontal (OFC, *orbitofrontal cortex*), la corteza insular (IC, *insular*

cortex), el tálamo (Th, *Thalamus*), el hipocampo (H, *Hippocampus*) y el hipotálamo (Hy, *Hypothalamus*); Mientras que B) el bulbo olfatorio recibe información centrífuga, por ejemplo, de la extremidad horizontal de la banda diagonal (HDB, *Horizontal Diagonal Band*), la amígdala (AM, *Amygdala*), la corteza olfativa primaria (POC, *Primary Olfactory Cortex*), el hipocampo, el locus cerúleo (LC, *Locus Coeruleus*) y los núcleos del rafé (RN, *Raphe Nuclei*)⁴⁰.

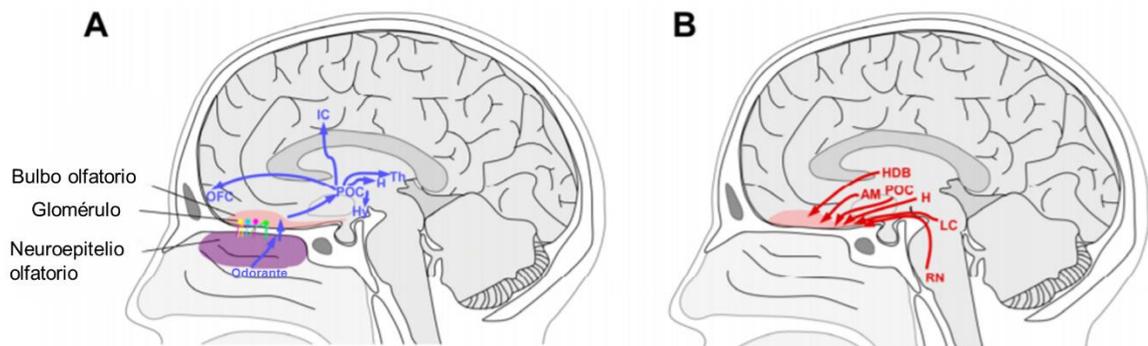


Figura 8. Información centrípeta y centrífuga desde y hacia el bulbo olfatorio. Imagen tomada de Huart *et al.*⁴⁰.

El volumen del bulbo olfatorio varía en función de la sensibilidad olfativa y disminuye en pacientes con trastornos olfativos (como la pérdida olfativa post-infecciosa o post-traumática). Sin embargo, su volumen puede aumentar durante la recuperación del trastorno olfativo, destacando su plasticidad⁴¹. Se ha evaluado el transcriptoma del bulbo olfatorio humano adulto y los procesos biológicos relacionados con la expresión de los genes encontrados, los cuales incluyen genes que participan en el: desarrollo del sistema nervioso, desarrollo neuronal y en la neurogénesis, sugiriendo así que la neurogénesis, en esta región, continúa a lo largo de la vida adulta⁴². Los tejidos epiteliales olfativos poseen una firma “única” de expresión génica en comparación con otros tejidos provenientes del proyecto “*illumina Body Map*”, en el cual se incluyen muestras de: tejido adiposo, linfóide, de cerebro, mama, pulmón, colon, corazón, riñón, hígado, ovario, próstata, músculo esquelético, testículos y sangre, determinada por una correlación promedio entre estas muestras y el epitelio olfatorio de 0.74 ± 0.1 . Así mismo, se identificaron 196 genes que no

codifican para receptores olfativos que se sobre-expresan más de 6 veces en el epitelio olfativo humano con respecto a estos tejidos⁴³. Estos genes principalmente incluyen a factores de transducción de señales olfativas, como OMP, CNGA2, CNGA4, GNG13, ANO2, RTP1 y RTP2; así como genes que codifican a canales de calcio controlados por voltaje, como KCNK10, KCNH3 y KCNH4, con funciones asociadas a la proliferación celular⁴⁴, también hay acarreadores de soluto como SVOPL y SLC38A8, que funcionan como transportadores de aminoácidos en las neuronas, claves en el ciclo cerebral de glutamina-glutamato⁴⁵; también se sobre-expresan factores de transcripción con poca o ninguna implicación olfativa conocida, aunque destacan a ASCL3, por su papel en la determinación del destino celular, incluidos los linajes neuronales⁴⁶, también se encontró a otros factores de transcripción adicionales como UNCX, lo que sugiere una regulación en la proliferación y supervivencia de las células precursoras neurales del epitelio olfatorio⁴⁷.

Estudios desde hace más de 30 años han establecido que el olfato suele estar alterado en enfermedades neurodegenerativas, como la EA⁴⁸ y que este déficit olfativo puede presentarse incluso desde etapas tempranas con un deterioro cognitivo leve⁴⁹.

Actualmente la pérdida del olfato se estudia como un biomarcador temprano para la EA; se ha observado cómo el olfato empeora progresivamente a medida que los pacientes avanzan desde un deterioro cognitivo leve hasta etapas avanzadas de la EA, destacando así su papel potencial para identificar a la EA en las etapas preclínicas⁵⁰. El sistema olfatorio tiene un gran potencial como herramienta para examinar los procesos neurodegenerativos, puesto que las neuronas sensoriales olfativas se reemplazan por neurogénesis de manera continua a lo largo de la vida adulta a partir de precursoras neurales ubicados en las membranas apical y basal, sugiriendo que quizá la capacidad regenerativa de estas células también pudiera estar afectada en esta enfermedad. El neuroepitelio olfativo contiene células precursoras capaces de

proliferar *in vitro* y diferenciarse en múltiples tipos de células, incluidas las neuronas y la glía. Debido a que no hay un método disponible para evaluar a las células en el cerebro de un sujeto vivo, recientemente Benítez-King y cols. desarrollaron un método para obtener precursores neurales viables del epitelio olfatorio, mediante exfoliación de la región anterior del cornete medial lateral de la cavidad nasal⁵¹ y desde entonces, el epitelio olfatorio ha estado recibiendo más atención por su uso potencial en la investigación de enfermedades neurodegenerativas ya que se ha logrado reflejar algunos cambios patológicos del cerebro en estas células. Por ejemplo, en el estudio de Ayala-Grosso y cols., obtuvieron biopsias de la mucosa olfatoria de sujetos con la EA y encontraron una mayor acumulación de β A en comparación con biopsias de individuos con deterioro cognitivo leve y más del 90% de estos sujetos padecían de hiposmia o anosmia. Tras evaluar la migración de las células de la mucosa olfatoria *in vitro*, mostraron que la amplitud máxima ocupada por las células de los controles era mayor que las células derivadas de los individuos con la EA o deterioro cognitivo leve. El perfil fenotípico de estas células mostró que arriba del 95% correspondían a una población de células mesenquimales reconocida por los anticuerpos CD90, CD73 y CD29, y que co-expresaban marcadores de precursores neurales, como Nestina. Para determinar si la condición de la EA afectaba su proliferación, después de un día de cultivo, realizaron el ensayo de incorporación de EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) con un pulso de 24 hrs; aproximadamente, del 85 al 90% de las células, incorporaron el marcador con éxito. Sin embargo, la proporción de células que se encontraban proliferando era mayor en los controles con respecto a las provenientes de los individuos con deterioro cognitivo leve o con la EA, apoyando la idea de que existe una capacidad de proliferación reducida en las células provenientes de los pacientes, aún en etapas preclínicas⁵². En la Tabla 1 se muestran las características principales de las células mesenquimales obtenidas de la cavidad nasal (Modificado de Lindsay & Barnett⁵³).

Tabla 1. Comparación de las propiedades biológicas de las células mesenquimales derivadas de la mucosa olfatoria o de la médula ósea.

Características	*OM-MSCs	*BM- MSCs	Referencia
Marcador de superficie			
<i>Expresan la mayoría de los marcadores clásicos de las MSCs con diferencia en:</i>			
Nestina	+++	+	52, 54-58
CD200, CD146	-	+	54, 59
Expresión de miRNAs			
<i>miRNAs expresados diferencialmente:</i>			
140-5p, 10b-5p, 335-5p, 3665, 3188, 2861, 428, 762, 874, 1915, 638, 425-5p, 140-5p, 224-5p, 140-3p, 939, 1225-5p	+	+++	60, 61
4291, 20a-5p, 25-3p, 106b-5p, 301a-3p, 195-5p, 497-5p, 93-5p, 3529-3p, 146a-5p	+++	+	
Citocinas/Quimiocinas			
CXCL12	+++	+	61
IL-6, IL-8, CCL2, IL-10, TGF- β	+	+++	58, 61
Propiedades biológicas			
Eficiencia clonal, proliferación	+++	+	54, 55
Osteogénesis, adipogénesis	+	+++	54, 55, 59
Condrogénesis	+/-	+++	54, 55, 59
Mielinización (<i>in vitro</i>)	+++	+/-	55, 61

*OM-MSCs (*Olfactory Mucosa-Mesenchymal Stromal Cells*) y BM-MSCs (*Bone-Marrow- Mesenchymal Stromal Cells*)

Por otra parte, además de las lesiones ocasionadas por el β A, las ocasionadas por tau hiperfosforilado también son producidas de forma temprana en el epitelio olfatorio. En el estudio de Arnold *et al.* encontraron presente al β A como agregados punteados y pequeños en el 71% en pacientes con la EA, mientras que tau hiperfosforilada fue evidente en neuritas distróficas en el 55% de los casos. El β A en el epitelio olfatorio correlacionó mejor con las lesiones corticales causadas por β A en el cerebro⁶².

Los efectos tóxicos del β A también se han observado tras la aplicación de β A₄₂ en el bulbo olfatorio de ratones y en ratones transgénicos, por ejemplo, la actividad de las células provenientes de la capa granular del bulbo olfatorio registrada en ratones y ratas después de la aplicación de oligómeros de β A₄₂ provoca una disminución en su actividad neuronal (determinada por ondas de baja frecuencia) y esta actividad puede recuperarse al nivel de las frecuencias registradas para los controles si se hace un lavado para disminuir la cantidad de β A. Además, la actividad neuronal disminuye conforme aumenta la edad y depende de la concentración de los oligómeros de β A₄₂ que son inyectados; aun así, una sola inyección intrabulbar de los oligómeros de β A₄₂ induce una pérdida del olfato dependiente del paso del tiempo, probada por la alteración de la capacidad de los ratones para encontrar una pieza oculta de chocolate, cuya capacidad se ve severamente comprometida conforme el paso del tiempo después de la inyección intrabulbar del β A. También encontraron que después de 4 semanas de la inyección, había depósitos de β A, evidenciados por el colorante rojo de tiazina en el bulbo olfatorio de estos ratones a diferencia de los ratones controles y también podían encontrarse estos depósitos en el bulbo olfatorio de modelos de ratón para la enfermedad de Alzheimer, como son los ratones triple transgénicos 3xTg-AD (APP Swedish, MAPT P301L y PSEN1 M146V) caracterizados por la formación de las placas neuríticas y las marañas neurofibrilares⁶³. Por otra parte, Yao *et al.* mostraron que los ratones doble transgénicos APP/PSEN1 (APP K594M/N595L y PSEN1 Δ E9) caracterizados por presentar un incremento gradual en el número de placas amiloides en el cerebro, conforme avanzan en edad, tenían disfunción olfatoria, la cual fue evaluada a través de diferentes pruebas de comportamiento olfativo. En estos ratones, se observaron depósitos amiloides que se encontraban distribuidos ampliamente en todo el circuito del sistema olfatorio, sugiriendo que estos depósitos podrían estar participando en la atrofia neuronal, las anomalías dendríticas, así como las pérdidas axonales y la sinapsis, observadas en estos ratones, pudiendo ser que el β A, sea una base patológica de la disfunción olfatoria relacionada con la EA⁶⁴. Por lo tanto, este tejido periférico podría ser

usado como un modelo para evaluar funciones del sistema nervioso central y podría proporcionarnos información relevante relacionada con la neuropatología observada en la EA y particularmente de la EAF.

2.3 Epigenética: microRNAs

Entre los mecanismos reguladores de la renovación y diferenciación de las células troncales neurales o precursoras neurales, están las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA, las modificaciones de las histonas y los RNAs no codificantes, los cuales desempeñan un papel fundamental en la regulación de su proliferación y diferenciación⁶⁶.

Los diferentes tipos de RNA representan alrededor del 62% del genoma y pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo a su tamaño: largos (> 200 nucleótidos) y pequeños (< 200 nucleótidos). El grupo de los largos incluye a RNAs codificantes y no codificantes, mientras que el grupo de los pequeños se compone de RNAs no codificantes. Hasta la fecha, existen más de 11366 RNAs pequeños no codificantes, que a su vez pueden clasificarse en cuatro grupos principales: 1) RNAs de transferencia (tRNAs), 2) pequeños RNAs nucleares (snRNA), 3) pequeños RNA nucleolares (snoRNAs) y 4) los microRNAs (miRNAs)⁶⁶.

Entre las especies de pequeños RNAs no codificantes mejor estudiada, se encuentran los miRNAs. Los miRNAs, son pequeños RNAs de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud cuya función particular es regular la expresión génica. Hasta el día de hoy, se han descrito 1917 precursores de miRNAs y 2654 miRNAs maduros (GRCh38) en el humano. Estos números cambian continuamente, como resultados del desarrollo de nuevos experimentos de secuenciación, los cuales modifican constantemente el repositorio de las bases de datos (www.mirbase.org).

2.3.1 Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs involucra múltiples etapas en las cuales el transcrito primario es procesado para producir al miRNA maduro, desde el núcleo hasta el citoplasma (Figura 9). La localización genómica de los miRNAs

es muy variada, ya que pueden encontrarse en regiones intergénicas, intrónicas y exónicas; los miRNAs encontrados en las regiones intergénicas pueden ser monocistrónicos (con sus propios promotores) o policistrónicos, donde varios miRNAs se transcriben como un grupo de transcritos primarios con un promotor compartido; los miRNAs intrónicos pueden encontrarse en los intrones de genes anotados y es probable que se transcriban desde el mismo promotor del gen anotado y se procesen a partir de los intrones del transcrito primario de ese gen; los miRNAs exónicos son los más raros y con frecuencia se superponen con un exón e intrón de un gen. Con respecto a su localización, los miRNAs pueden encontrarse como un solo miRNA o poseer patrones de agrupamiento dentro de los cromosomas^{67, 68}.

La producción de los miRNAs comienza con la síntesis de un miRNA primario (pri-miRNAs) cuyo tamaño puede variar desde cientos de nucleótidos hasta varias kilobases⁶⁹. Los miRNAs se transcriben principalmente por la RNA polimerasa II como miRNAs primarios (pri-miRNAs) que contienen una capucha y una cola poli(A), propiedades de los genes transcritos de la clase II. Lee *et al.* determinaron esta característica, tras observar que el tratamiento con α -amanitina disminuye los niveles de los pri-miRNAs, sabiendo que este fármaco es un inhibidor selectivo de la RNA polimerasa II⁷⁰. Sin embargo, aunque la RNA polimerasa II podría ser la enzima principal de su síntesis, la RNA polimerasa III también contribuye con su transcripción⁷¹. La identificación de la capucha 7-metil guanósina del pri-miRNA se observó tras el enriquecimiento de los pri-miRNAs, pero no de los pre-miRNAs ni los miRNAs maduros, tras un ensayo de *GST-Pulldown* en el que se utilizó una proteína de afinidad hacia la capucha como lo es eIF4E (fusionado con GST, *Glutathione-S-Transferase*), se observó que solo los microRNAs que no han sido procesados contienen una estructura de capucha, como lo es el pri-miRNA. Luego se tomó un enfoque similar para verificar la presencia de la cola poli(A) al extremo 3' del pri-miRNA, en el ensayo se demostró que todos los pri-miRNAs analizados contenían una cola poli(A). El ensayo se realizó

utilizando un enriquecimiento selectivo del RNA poliadeninado empleando perlas de celulosa oligo-dT⁷⁰.

La horquilla del pri-miRNA se elimina en el núcleo de las células, por el complejo del microprocesador, que comprende a la RNasa III Drosha y a la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (DGCR8), por sus siglas en inglés *DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*, un producto de un gen ausente en el síndrome DiGeorge. Drosha reconoce la unión del RNA bicatenario y monocatenario en la base de la horquilla del pri-miRNA, mientras que dos proteínas DGCR8 se unen al tallo del pri-miRNA y aseguran que se lleve a cabo la escisión adecuada, generando al extremo de la horquilla un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3', un fosfato en el 5' y un grupo hidroxilo en el 3', productos típicos de la RNasa III (dado por el dominio RNasa III, que puede dimerizarse para formar una estructura que se une a RNA bicatenario y lograr escindir los fosfodiésteres en cada hebra), esta nueva molécula, denominada pre-miRNA tiene un tamaño aproximado de 70 nt^{69, 72 - 74}. La Exportina 5 reconoce el saliente de los 2 nt y transporta al pre-miRNA al citoplasma⁷⁵; sin embargo, *knock-outs* de esta proteína solo han logrado reducir la exportación nuclear de los pre-miRNAs, pero no eliminar su exportación, lo que sugiere que existen mecanismos alternos de exportación nuclear aparte de la Exportina 5 (no descritos todavía)⁷⁶.

Una vez en el citoplasma, la enzima RNasa III Dicer que reconoce a los RNAs de doble cadena y que además posee motivos de RNasa III e incluye un dominio helicasa, se une al pre-miRNA mediante el reconocimiento del fosfato 5', el saliente 3' y la estructura de la horquilla⁷⁷⁻⁷⁹. Dicer funciona como una "regla molecular" que mide y corta al pre-miRNAs en una longitud específica y produce un dúplex de miRNA maduro con otro saliente típico de 2 nucleótidos en el extremo 3' determinado principalmente por la distancia (~22 nt) desde el extremo 5' ⁸.

En vertebrados, el corte por Dicer se modula por la proteína de unión al RNA sensible a la transactivación (TRBP, *Trans-Activation Responsive (TAR) RNA-*

binding protein)) y por la proteína activadora de la cinasa inducida por interferón (PACT, *Protein ACTivator of the Interferon-induced Protein Kinase*), que contribuyen al reconocimiento del sustrato, así como a la escisión durante la producción del miRNA maduro, cuyos efectos podrían conllevar a la generación de iso-miRNAs^{81, 82}. La regulación de la expresión génica se lleva a cabo principalmente por una endonucleasa, denominada Argonauta (AGO). Esta endonucleasa utiliza una cadena del dúplex del miRNA maduro como guía para encontrar a los RNAs mensajeros (mRNAs), que contienen secuencias complementarias al miRNA. Una cadena del miRNA maduro (la cadena “guía”) se carga en la proteína Argonauta, mientras que la otra cadena (“cadena pasajera”) se descarta⁸³. Se da preferencia de carga a la hebra que posee el extremo 5’ menos estable al emparejamiento y también se ha observado la preferencia a la hebra que posea una A o U como nucleótido 5’ terminal. El miRNA maduro comprende una hebra 5p o una hebra 3p, que surgen del brazo 5’ o 3’ del pre-miRNA, respectivamente⁸⁵. Cada una de estas hebras necesita incorporarse al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*, compuesto por Dicer, TRBP y la proteína Argonauta) para ser funcional. Cada una de las formas maduras del miRNA puede regular a diferentes genes (Gebert & MacRae⁸⁵).

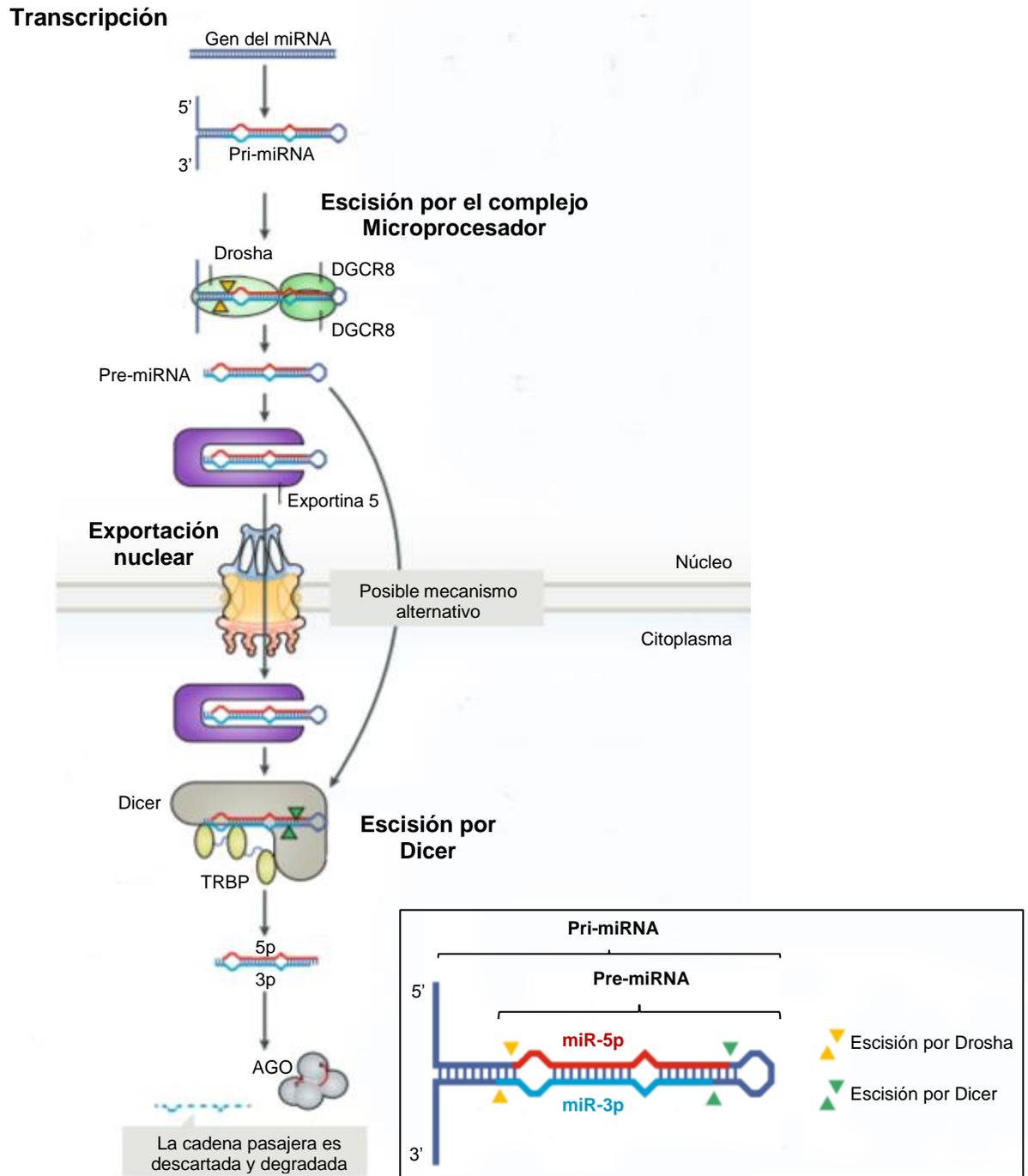


Figura 9. Biogénesis de los microRNAs. Figura modificada de Gebert & MacRae⁸⁵.

Los pasos en los procesos de biogénesis de miRNAs han permitido analizar el papel que desempeñan los microRNAs en el cerebro, por ejemplo, uno de los primeros estudios fue el de Giraldez y cols., que utilizó una versión mutada de

Dicer incapaz de unirse al precursor de miRNA en el pez cebra, provocando defectos morfológicos en el cerebro⁸⁶, revelando así el papel clave en la regulación del desarrollo cerebral que poseen los miRNAs.

Los miRNAs son abundantes en el sistema nervioso, donde desempeñan funciones clave en el desarrollo, como en la plasticidad neural, en donde estos miRNAs tienen la capacidad de suprimir a mRNAs específicos de linaje y cambiar el destino de las poblaciones de células precursoras entre neuronas y glía, así como una fuerte regulación de la apoptosis y proliferación durante el desarrollo neural⁸⁷.

La eliminación de miRNAs puede conllevar a diferentes alteraciones. Bartel *et al.* publicaron una compilación de los diferentes fenotipos observados en animales *knock-outs* de uno o más miembros de una familia de miRNAs, desde aquellos con penetrancia parcial o completa que provocan la muerte del embrión o la muerte postnatal antes del destete, otros con una vida útil reducida, peso corporal disminuido, defectos cardiacos, disfunción respiratoria, reducción de la regeneración de las uniones musculares y neuromusculares, involución tímica prematura, desarrollo y respuesta reducida de células inmunes (por ejemplo Th1, Th17), números reducidos de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, aumento o disminución de tumorigénesis, deterioro locomotor progresivo, aumento de resorción ósea y aumento del flujo de salida de colesterol en suero, entre muchos otros trastornos⁸⁸. Así mismo, se han reportado procesos asociados al desarrollo de la EA en donde se incluye a la regulación mediada por miRNAs durante la síntesis de la APP, el procesamiento de APP mediante el aumento de miRNAs cuyo blanco es ADAM10 (α -secretasa)^{89,90}, la disminución de aquellos cuyo objetivo es la proteína BACE1 (β -secretasa)⁹¹⁻⁹⁴ provocando un aumento en la actividad de la vía amiloidogénica, así como miRNAs que conllevan a la hiperfosforilación de Tau mediante la sub-expresión de miRNAs que regulan negativamente a cinasas involucradas en su fosforilación. *Knock-outs* de miRNAs también conllevan al desarrollo anormal del cerebro, aumento o

disminución en la degradación del β A en el cerebro, retraso del crecimiento, defectos en la neurogénesis, con un aumento de las células gliales radiales y disminución de las neuronas corticales, así como una corteza cerebral más delgada⁸⁸.

2.3.2 Funciones de los microRNAs

La función principal y más conocida de los miRNAs es el silenciamiento de la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante el complejo RISC. Este silenciamiento requiere la identificación del mRNA blanco (o *target*). Al identificar el *target*, los nucleótidos 2-8 del extremo 5' del miRNA (región semilla), generalmente se combinan perfectamente con el mRNA y son suficientes para activar el silenciamiento. Los miRNAs que comparten la misma región semilla, secuencia altamente conservada y que ha sido utilizada para clasificar familias de miRNAs, suelen compartir los *targets*. El miRNA maduro (5p o 3p) guía al RISC a la secuencia complementaria localizada con mayor frecuencia en la región 3' UTR del mRNA diana. Sin embargo, se han descrito zonas de unión del miRNA a regiones promotoras, 5' UTR y regiones de codificación (o marco de lectura abierto)⁹⁵ (Figura 10).

Los mecanismos más estudiados, son aquellos por los cuales los miRNAs reprimen la expresión de proteínas, ya sea mediante la degradación del mRNA o por la inhibición del proceso de traducción del mRNA. El miRNA puede desencadenar la degradación de mRNA diana mediante la activación de la vía endonucleolítica, sobre todo si la complementariedad entre las dos moléculas de RNA es total; aunque la mayoría de los apareamientos son parciales, los miRNAs pueden inducir una degradación significativa de sus dianas a pesar del emparejamiento imperfecto entre las bases del miRNA y el mRNA. Normalmente, el RISC (*RNA-induced silencing complex*, compuesto por *Dicer*, *TRBP* y la *proteína Argonauta*), conduce el mRNA diana a la maquinaria de degradación; este proceso consiste primero en una de-adenilación del mRNA, a continuación, la eliminación del extremo 5' (o *decapping*), y, finalmente se lleva a cabo la degradación del mRNA por medio de las exonucleasas^{86, 96}.

En el caso de la inhibición de la traducción del mRNA para producir su proteína, se ha propuesto la interrupción de las diferentes etapas de la traducción producida por la interacción de los diversos factores del RISC con los requeridos para cada fase, conduciendo a una inhibición de la iniciación, elongación y terminación o a la degradación de la proteína emergente^{86,96}. De acuerdo con estudios proteómicos, la desestabilización y degradación del mRNA es el mecanismo principal mediado por miRNAs en la disminución de la producción de proteínas⁹⁷⁻⁹⁹.

Varios estudios han reportado que hay otras formas poco convencionales en que los miRNAs pueden ejercer funciones reguladoras. Por ejemplo, la codificación de péptidos a partir de pri-miRNAs; se ha encontrado que estos pri-miRNAs pueden codificar a péptidos cortos como miPEP-171b y miPEP-165a (miPEP, *miRNA encoded peptides*), que funcionan incrementando la transcripción de su propio pri-miRNA conllevando a un aumento en la expresión de los miRNAs maduros correspondientes¹⁰⁰. Existen miRNAs capaces de interactuar con otras proteínas de unión a RNA que no es Argonauta y que actúan como señuelo, interfiriendo con su función; las ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP, heterogeneous ribonucleoprotein) ejercen su función post-transcripcional de una manera secuencia-específica y su interacción con un miRNA puede conducir a la liberación del mRNA blanco de la hnRNP¹⁰¹. También pueden actuar como ligandos de los TLRs (Toll-like receptors) e iniciar la cascada de señalización de la respuesta inflamatoria¹⁰² o causar neurodegeneración¹⁰³. Vasudevan *et al.* identificaron que el efecto de miRNAs específicos puede depender del ciclo celular, induciendo la traducción de los mRNA diana cuando se detiene el ciclo celular, pero reprimiendo la traducción en células en proliferación¹⁰⁵. Aunque no se han identificado miRNAs dentro del genoma mitocondrial, se ha demostrado que los miRNAs son capaces de translocarse a la mitocondria y regular la expresión de genes mitocondriales, estos miRNAs son conocidos como mitomiRs¹⁰⁶. Los miRNAs también pueden activar la transcripción después de ser traslocados hacia el

núcleo y reconocer sitios dentro de la región promotora ¹⁰⁶: Además, también son capaces de inhibir la maduración de otros miRNAs tras la regulación negativa de la transcripción de pri-miRNAs ¹⁰⁸. El funcionamiento de los miRNAs también puede ser interrumpido por RNAs esponjas, transcritos que poseen múltiples sitios para un miRNA, el aumento en la concentración de un RNA diana reduciría la disponibilidad del miRNA específico, disminuyendo la probabilidad de que los mRNA que son dianas del mismo miRNA sean regulados, como lo pueden ser los lncRNA (*long non-coding RNAs*), pseudogenes e incluso otros mRNA ⁸⁵ (Figura 10) Es muy probable que a medida que las investigaciones avancen sobre los mecanismos de regulación, se sumen más ejemplos a estos anteriormente mencionados.

Los miRNAs también pueden entrar a circulación en una forma extracelular altamente estable. Algunos investigadores los han sometido a condiciones en las que normalmente la mayoría de los RNAs se degradarían; la presencia de RNasa en el plasma, la incubación a temperatura ambiente y ciclos de congelación-descongelación tienen un efecto mínimo en los niveles de los miRNAs endógenos a diferencia de los miRNAs sintéticos que son degradados con facilidad ¹⁰⁸. Se postula que los miRNAs circulantes están protegidos por la encapsulación en vesículas como lo son los exosomas, pero también se encuentran como complejos ribonucleoproteicos, como lo es con Argonauta, la proteína efectora clave del silenciamiento mediado por miRNA, esto aumenta la posibilidad de que las células liberen en la circulación un complejo funcional de silenciamiento inducido por miRNAs ¹⁰⁹ (Figura 10).

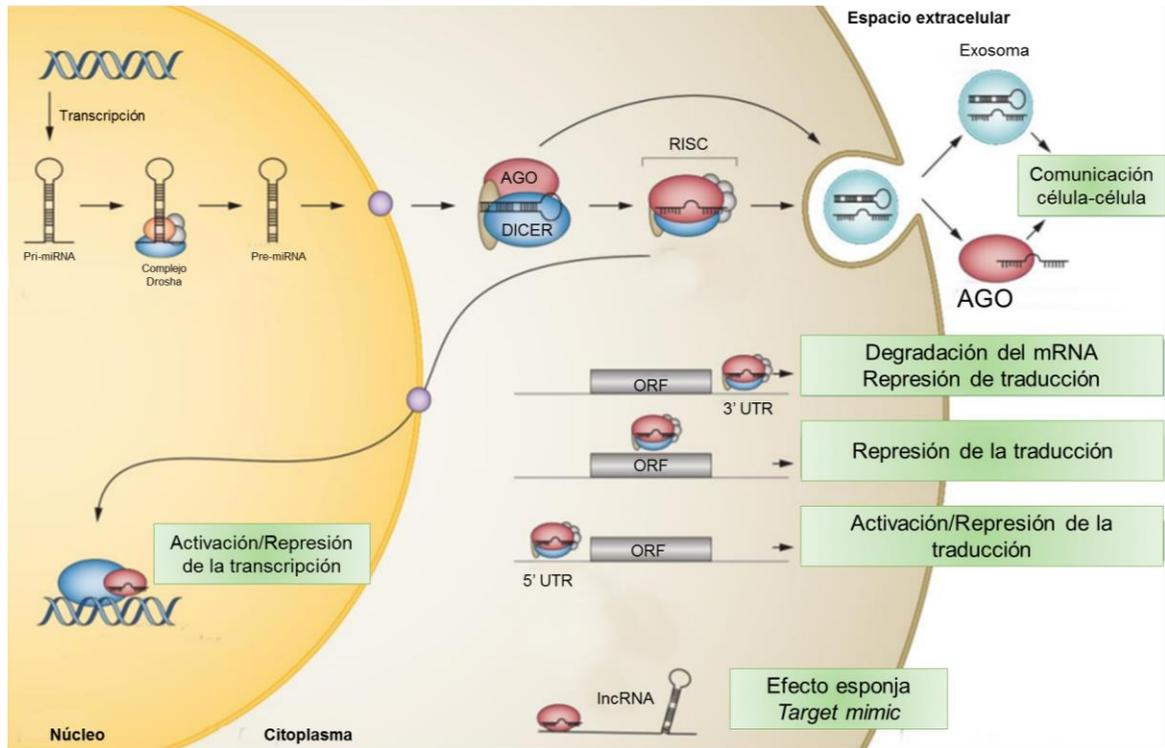


Figura 10. Mecanismos de regulación de los miRNAs. Figura modificada de Schwarzenbach *et al.* ¹¹⁰.

3. Antecedentes Directos

3.1 microRNAs en la EAF

Existen solo un par de estudios enfocados a evaluar las alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs en mutaciones causantes de la EAF. Uno de ellos fue un trabajo de investigación realizado con una familia china en la que 4 integrantes de la familia tenían la mutación G378E en PSEN1, aunque 2 de ellos aún no tenían los signos clínicos de la EA; también se incluyeron a 2 controles negativos para la mutación. La expresión de los miRNAs fue evaluada del líquido cefalorraquídeo a través de microarreglos. Los resultados mostraron a 25 miRNAs que fueron significativamente sobre-expresados y no hubo ninguno cuya expresión se alterara a la baja; los niveles de miR-30a-5p, miR-4758-3p y let-7a-3p fueron quienes tuvieron la mayor expresión en comparación con los controles negativos para la mutación. Mientras que, en aquellos que solo portaban la mutación y que no estaban afectados, sus

niveles de miR-345-5p estaban altos pero bajos para el miR-4795-3p. Mientras que la comparación entre los individuos afectados y los portadores de la mutación, no tuvieron diferencia significativa. Los principales procesos biológicos para las alteraciones de los niveles de expresión de los miRNAs previamente mencionados, incluyeron a la actividad de factores de transcripción (GO:0003700) y la vía que podría tener un papel importante en la EAF causada por la mutación G378E es la de FOXO, tras ser el resultado luego de evaluar mediante diferentes algoritmos a los mRNA blanco de los miRNAs con diferencias significativas, vía involucrada en la apoptosis, la reparación del DNA, el metabolismo y el ciclo celular por ejemplo¹¹¹.

Con la premisa de que células inmunes disfuncionales que incluyen a monocitos (en la periferia) y a la microglía (en el SNC) se ha documentado en pacientes con EA, siendo los miRNAs poderosos moduladores de la inmunidad, regulando la actividad proinflamatoria y contribuyendo a los mecanismos de eliminación del β A. Fung *et al.* emplearon un modelo murino con la mutación N141I en el gen de PSEN2 y generaron iPSCs a partir de fibroblastos de individuos portadores de esa mutación que luego fueron diferenciadas a microglía. Encontraron que los ratones PSEN2^{N141I/wt} presentaban un perfil de citocinas exagerado, similar al *knock-out* de PSEN2; Mientras que la microglía PSEN2 N141I derivada de las iPSCs no inducían la expresión del miR-146a (anti-inflamatorio) después de la exposición a un estímulo inflamatorio. Por lo que a través de los modelos murinos y de iPSCs podría sugerirse que la mutación en PSEN2 N141I conduce a perfiles alterados de microRNAs que regulan genes en el contexto de la inflamación¹¹².

4. Justificación

Los miRNAs son reguladores cruciales de las funciones celulares a través de la modificación de la transcripción de genes y, en particular, en las células del linaje neural, sabiendo que la mayoría de los miRNAs conocidos hasta el momento, han podido ser identificados en el cerebro, aumentando con ello, la evidencia del importante papel que tienen como reguladores de funciones

fundamentales y complejas. Hasta la fecha existen pocos estudios enfocados a evaluar la expresión de estas moléculas y el papel que pudieran tener en las células precursoras neurales derivadas de individuos afectados por la Enfermedad de Alzheimer Familiar. Por tal motivo, es importante obtener el patrón de expresión de los miRNAs en las células precursoras neurales y evaluar si la mutación, responsable del proceso neurodegenerativo de la EAF, tiene un efecto en el perfil de expresión de estas moléculas e identificar su posible correlación con la patología. Hasta la fecha existe un solo reporte de análisis de la expresión de miRNAs en células iPSC derivadas de fibroblastos de individuos con EAF en donde se demuestra un patrón alterado en la expresión de estas moléculas. El trabajo que aquí se presenta es el primer estudio en evaluar el efecto de la mutación A431E en la PSEN1, causante de la EAF en población mexicana, sobre la expresión de los miRNAs y sus genes blancos en células precursoras neurales, derivado del epitelio olfatorio de individuos portadores y afectados. Los resultados de este proyecto ayudarán a determinar cuáles miRNAs y cuáles genes blanco están alterados como consecuencia de la mutación y con ello, conocer las vías de señalización afectadas y contribuir al entendimiento de la fisiología de estas células y tratar de correlacionarlo con el cuadro clínico provocado por esta mutación.

5. Hipótesis

La mutación A431E en el gen de la proteína PSEN1, altera el perfil de expresión de los miRNAs y sus moléculas blanco en las células precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Analizar el perfil de expresión diferencial de los miRNAs y de sus moléculas blanco, en células precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer Familiar, que portan la mutación A431E en PSEN1.

6.2 Objetivos particulares

1. Aislar el RNA total de las células precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio de individuos que portadores la mutación e individuos controles sin la mutación.
2. Determinar si el alelo mutado con respecto al alelo normal se transcribe de manera bi-alélica, alelo específico o mono-alélica con respecto a la edad o el inicio sintomatológico.
3. Hacer el análisis comparativo de la expresión diferencial de los microRNAs y de sus targets en las células precursoras neurales derivadas de los individuos portadores de la mutación A431E.
4. Validar la expresión diferencial de los miRNAs que obtengan significancia estadística (Fold change > 2 o < -2 , $p < 0.05$, $q < 0.05$), en las células que llevan la mutación versus las células normales, mediante RT-qPCR.
5. Realizar un análisis bioinformático para los miRNAs diferenciales y sus targets con significancia estadística y evaluar la posible consecuencia fisiológica de su desregulación.

7. Materiales y métodos

Esta tesis se llevó a cabo de manera conjunta en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Zacatenco y la Unidad de Investigación Médica en Endocrinología Experimental del Hospital de Especialidades, Centro Médico Siglo XXI.

7.1 Familia de estudio

Se incluyó a los miembros de una familia con diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer Familiar que poseen la mutación A431E en PSEN1 (Figura 11), así como controles consanguíneos y controles externos (sin parentesco) que no poseen la mutación y por lo tanto son asintomáticos. Dentro del grupo de individuos portadores de la mutación A431E (PSEN1) se incluyeron a dos individuos que aún no presentan signos de la enfermedad (asintomáticos) (IV-

1 y III-10), uno que muestra ligeros signos de la presencia de la enfermedad (pre-sintomático) (III-4) y uno con claros signos de la enfermedad (sintomático) (III-3).

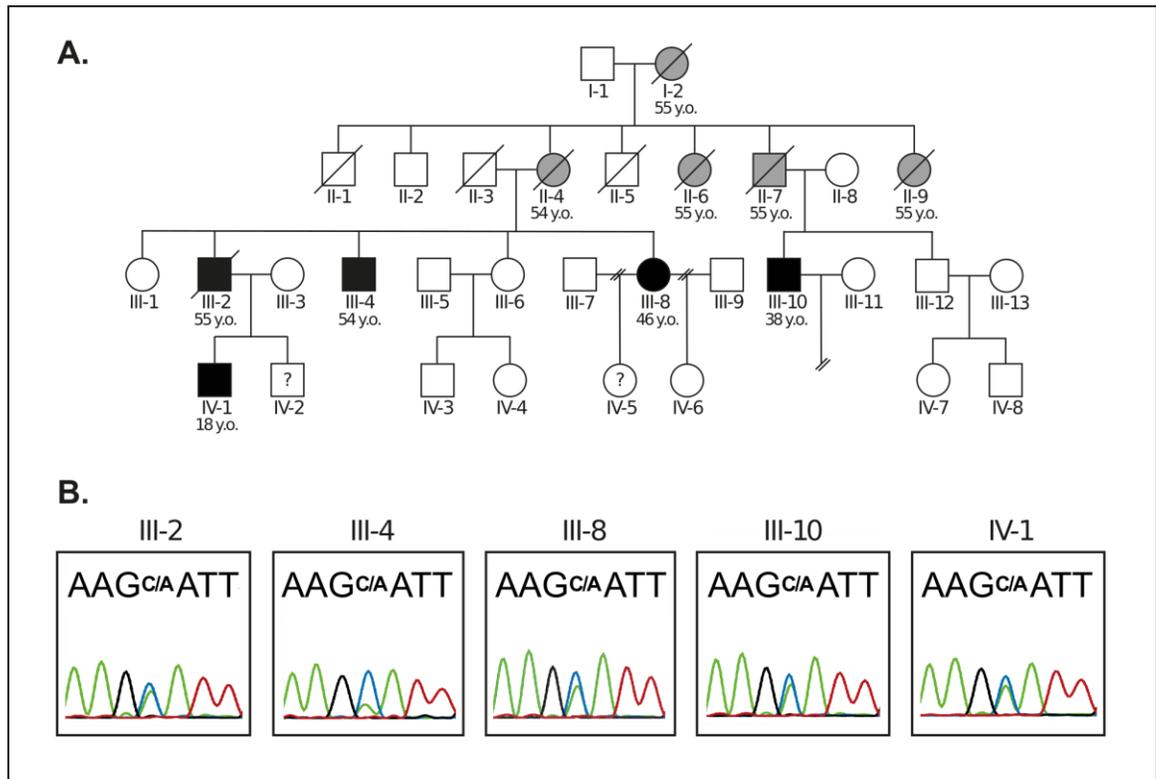


Figura 11. Pedigrí de la familia de estudio y análisis genético. A. Pedigrí de la familia de estudio. Mujeres \circ y hombres \square no portadores de la mutación, portadores A431E \bullet \blacksquare , genotipo desconocido \circ \square ? ? , individuos fallecidos \blacksquare ? ? ? . **B.** El análisis de la secuencia muestra un cambio de C \rightarrow A, en el exón 12, del gen de PSEN1, el cual provoca un cambio de aminoácido de Alanina (GCA) a Ácido Glutámico (GAA) en la posición del amino ácido 431 de la proteína Presenilina 1 PSEN1(A431E). Obtenido de Santos-Mandujano²⁶

7.1.1 Criterios de inclusión

- a) Sexo indistinto.

- b) Mexicanos por nacimiento y en caso de tener ascendencia extranjera, deberá contar con un mínimo de tres generaciones de mestizaje.
- c) Tener historia familiar de dos o más familiares con diagnóstico de EA o demencia.
- d) Inicio temprano de los síntomas (antes de los 65 años).
- e) Los controles consanguíneos se agruparán por grupos de edad al igual que los controles externos (no consanguíneos), que no posean la mutación A431E en el gen de PSEN1 y no muestren síntomas de deterioro cognitivo.
- f) Que acepten participar en el estudio.

7.1.2 Criterios de no inclusión

- a) Antecedentes familiares de enfermedades neurodegenerativas: demencia, depresión o Parkinson (igual o mayor a tres generaciones) para los controles externos.
- b) Tener alguna enfermedades crónico-degenerativas como diabetes e hipertensión arterial sistémica (en controles).
- c) Presentar rinitis alérgica, pólipos nasales o alguna otra enfermedad de vías respiratorias superiores (en controles).
- d) Estar en tabaquismo activo (en controles).
- e) Estar en consumo actual o previo de drogas inhaladas como solventes o cocaína (en controles).
- f) Que no acepten participar en el estudio

7.1.3 Criterios de exclusión

- a) Muestra insuficiente
- b) Muestra contaminada

7.1.4 Consideraciones bioéticas

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada sujeto incluido en el estudio y se siguieron los procedimientos éticos por el Comité de Bioética de Salud en Seres Humanos (COBISH) del CINVESTAV.

7.2 Obtención y cultivo de las células precursoras neurales del epitelio olfatorio

Estas células fueron obtenidas y cultivadas de acuerdo con el protocolo reportado por Benítez-King y cols.⁵¹; Las células se exfoliaron de la región anterior del cornete medial lateral, utilizando un cepillo pequeño (2.4 cm de longitud y 3 mm de diámetro aprox.), a través de movimientos circulares para exfoliar células de la pared lateral de la cavidad y septo nasal. Las células se cultivaron en medio DMEM/F-12 (*Dulbecco's modified Eagle* y F-12), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de estreptomina y 100 IU/mL de penicilina. Estas condiciones de cultivo permiten seleccionar arriba del 80% de células precursoras neurales, de acuerdo con los autores.

7.3 Extracción de RNA total

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo celular p100. Cuando la confluencia celular era de ~ 80%, el medio de cultivo era retirado y las células eran lavadas con PBS 1X. Las células eran tratadas con 0.25% de tripsina-verseno (1X) a 37 °C durante 3 minutos, en donde la disociación celular podía observarse bajo un microscopio. Se añade medio de cultivo fresco, para inactivar la tripsina, y las células en suspensión se transfieren a un tubo para ser centrifugadas a 1,500 rpm durante 5 minutos.

El botón celular resultante fue homogeneizado con 500 µL de Trizol para el lisado de las células y posteriormente, para la separación del RNA, se le añadieron 100 µL de cloroformo y se mezcló por vórtex. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugaron por 15 minutos a 12,500 rpm. Se genera la separación de las muestras en tres fases;

la fase acuosa, la interfase y la fase orgánica; en la fase acuosa está contenido el RNA, en las otras fases se retienen el DNA y las proteínas.

El RNA fue purificado utilizando el kit miRNeasy a partir de la fase acuosa. A esta fase, se le añadió 1.5 volúmenes de 100% de etanol y se mezcló por pipeteo. Enseguida, se transfirió a una columna spin RNeasy (sin exceder 700 μL totales) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos y se desechó el filtrado. Para la eliminación de biomoléculas, como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, etc., se le añadió 700 μL del Buffer RWT (contiene sal de guanidina y etanol) a la columna spin RNeasy y se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 15 segundos y se desechó el filtrado. Para eliminar los residuos de sales, se añadió 500 μL de Buffer RPE (compuesto esencialmente por etanol al 70%) a la columna spin RNeasy y se centrifugó una vez más a 10,000 rpm durante 15 segundos. Finalmente, la columna spin RNeasy se colocó en un tubo Eppendorf como recipiente final de colecta del RNA, al cual, se le añadieron 33 μL de agua libre de RNasas, directamente sobre la membrana de sílice al interior de la columna, permitiendo que se hidratara durante 5 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm por un minuto para eluir el RNA.

7.3.1 Cuantificación, pureza e integridad del RNA

La cuantificación del RNA total se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 2000, que toma un espectro de la solución de referencia (o blanco) en la que está suspendida nuestra molécula de interés, almacenando estos datos como una serie de intensidades luminosas por longitud de onda. Cuando la medición de una muestra es tomada, la intensidad de la luz transmitida, a través de la muestra, también es almacenada y así, la intensidad de la muestra y la de referencia, son usadas simultáneamente, para calcular la absorbancia de la muestra a través de la siguiente ecuación:

$$Absorbancia = - \frac{Absorbancia_{muestra}}{Absorbancia_{referencia}}$$

Concomitantemente, la ecuación de Beer-Lambert se usa para correlacionar la absorbancia calculada con la concentración:

$$A = (\epsilon)(b)(c)$$

Donde A = la absorbancia representada en unidades de absorbancia; ϵ = el coeficiente de absorbancia molar dependiente de la longitud de onda (o coeficiente de extinción) con unidades de litro / mol-cm; b = la longitud del camino en cm; y c = la concentración del analito en moles / litro o molaridad (M).

La absorbancia también fue usada para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos, cuya absorbancia es de 260 nm y la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}) de ~2 (1.8-2.1) refleja una solución de RNA de alta pureza. Si la relación es menor a este rango, es posible que indique la presencia de proteínas, fenol u otro contaminante cuya absorbancia sea o esté cercana a los 280 nm. La relación entre 260 nm y 230 nm (A_{260}/A_{230}) es usada como una medición secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos, cuyo rango de pureza esperado oscila entre 2 y 2.2.

Otro parámetro importante de la calidad del RNA, es la validación de la integridad del RNA, pues un RNA integro es una clave importante para un análisis exitoso de expresión génica. Tradicionalmente se ha evaluado su integridad mediante electroforesis en gel; la presencia de tres bandas características sugiere un RNA de alta calidad, para el RNA eucariótico, la banda superior representa al rRNA 28S (~4.8 kb), la banda media representa al rRNA 18S (~2 kb) y la tercera banda representa al rRNA de 5.8S (154 nt) y 5S (117 nt), la intensidad esperada entre la banda del rRNA 28S y rRNA18S debe ser 2 a 1, indicativo de la integridad del mRNA presente en la muestra. Sin embargo, esta relación a menudo es imprecisa para determinar la integridad del RNA, por lo que se han desarrollado otros sistemas que se usan como estándar para la evaluación de la integridad, como el Bioanalizador 2100 de Agilent. Este sistema realiza una separación electroforética sobre chips microfabricados, en donde la muestra del RNA es separada y

subsecuentemente detectada tras inducir la emisión de fluorescencia. Una vez que se llenan los pozos y los canales por un gel y colorante fluorescente, el chip se convierte en un circuito eléctrico integrado. Los electrodos de 16 pines del cartucho del Bioanalizador están dispuestos de manera que encajen en los pocillos del chip y cada electrodo está conectado a una fuente de alimentación independiente que proporciona el máximo control. Las biomoléculas cargadas, como el RNA, son impulsadas electroforéticamente por un gradiente de voltaje, similar a la electroforesis en gel de agarosa y que debido a una relación masa-carga constante, las moléculas están separadas por tamaño. Las moléculas fluorescentes se intercalan en el RNA y estos complejos son detectados por fluorescencia inducida por láser. Los datos son visualizados en imágenes tipo gel (bandas) y electroferogramas (picos), realizados con la ayuda de un *ladder* que contiene componentes de tamaños conocidos y una curva estándar del tiempo de su migración.

Aunque la relación entre las moléculas del RNA ribosomal posee un papel importante en la determinación del nivel de degradación de la muestra en electroforesis en gel, este sistema realiza un análisis más detallado contemplando la traza electroforética, ya no solo por la proporción de las bandas ribosómicas, sino que incluye productos de degradación. Así, las tecnologías de Agilent introdujeron un algoritmo denominado RIN (*RNA Integrity Number*), que nos permite clasificar el RNA total eucariótico, basado en un sistema numérico del 1 al 10, siendo 1 el perfil más degradado y 10, el perfil más intacto.

El kit que se usó para determinar el RIN fue el Agilent RNA 6000 Pico (Num. Cat. 5067- 1513), ya que la concentración de muestra requerida es muy pequeña (50 – 5000 pg/ μL) y podría estar limitada a los ensayos posteriores.

El uso del chip involucra la preparación de un gel compuesto por 65 μL de un gel pre-filtrado y 1 μL de un colorante fluorescente. De esta preparación, 9 μL eran colocados en los pocillos marcados con la letra **G** y distribuidos en los microcanales del chip aplicando vacío con una jeringa de 1 mL. A su vez, 9 μL

de una solución acondicionadora del RNA fue colocada en el pocillo marcado con CS, así como 5 μL de un marcador (*lower marker*) en cada uno de los pocillos para las muestras numeradas del 1-11 y en el pocillo marcado con una escalera (*ladder* ) , este marcador es un control estándar interno usado para alinear los datos del *ladder* con el rango del tamaño de los fragmentos de cada una de las muestras. Finalmente, se coloca 1 μL del *Ladder* en el pocillo marcado con la escalera  , 1 μL por cada muestra en pocillos independientes a una concentración de 5 ng/ μL ; tanto el *Ladder* como las muestras fueron ser previamente desnaturalizadas antes de colocarlas en el chip a 70 °C durante 2 minutos; 1 μL del marcador fue colocado en cada pocillo en el que no se colocó ninguna muestra. Inmediatamente, el chip fue colocado en el vórtex IKA proporcionado por el fabricante durante 1 minuto a 2400 rpm, y al terminar, fue colocado en el Bioanalizador para su análisis.

Nuestro punto de corte para la calidad de las muestras de RNA a trabajar incluyó a RNAs cuya relación de absorbancias estuviera dentro del rango considerada como pura, así como un RIN ≥ 8 , es decir, un RNA con una alta integridad, con la finalidad de garantizar la reproducibilidad de nuestros resultados.

7.4 Elaboración de los microarreglos de expresión

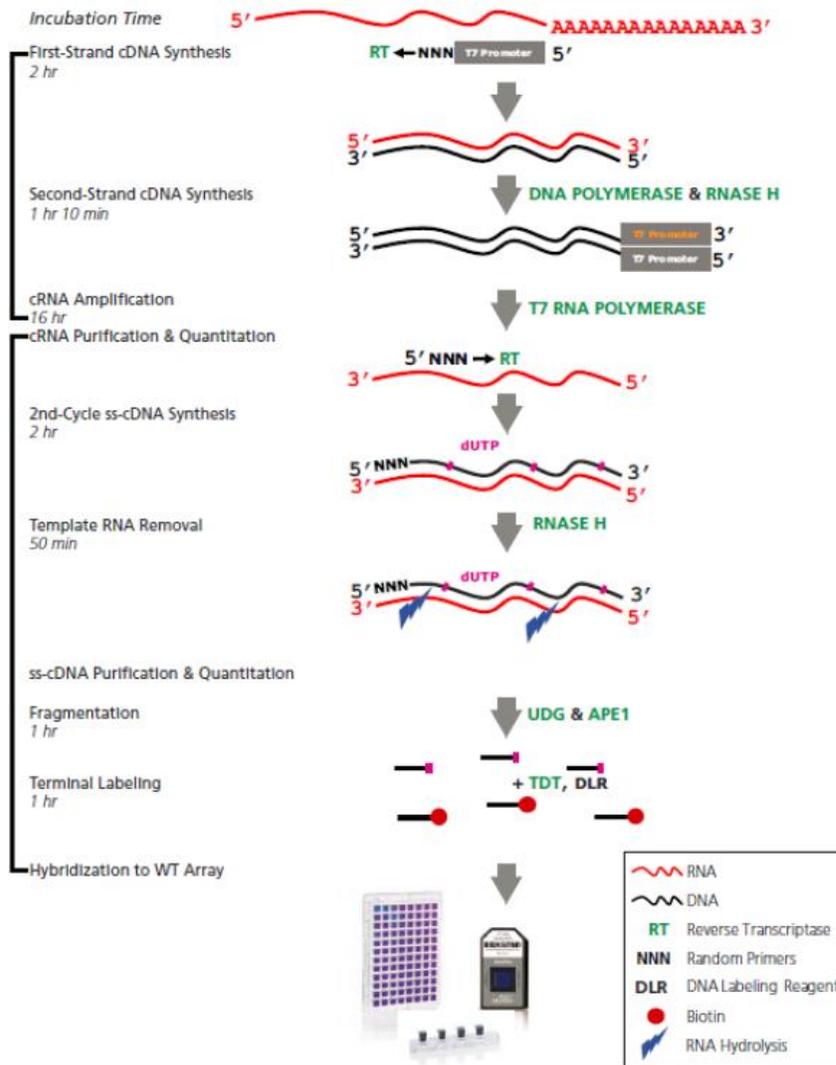


Figura 12. Flujo de trabajo del proceso de amplificación, marcaje, fragmentación e hibridación de las muestras en los microarreglos.

Para el análisis de la expresión de los miRNAs y sus *targets*, se utilizó la plataforma *Affymetrix*, con el microarreglo “*GeneChip Human Gene 2.0 ST*” y el kit de reactivos *Whole Transcript (WT) plus*, pues este kit nos permite preparar las muestras de RNA para el análisis de la expresión del transcriptoma completo y está optimizado para su uso en los microarreglos *GeneChip™ Sense Target (ST)*.

Este kit genera dianas de DNA de la hebra sentido (*ST Sense Target*) que son amplificadas y biotiniladas a partir del RNA total, sin la necesidad de una etapa de selección o enriquecimiento del mRNA, ni la eliminación previa de RNA ribosomal.

El procedimiento parte del RNA extraído con los criterios de inclusión ya mencionados, de la selección de la hebra sentido, su fragmentación, marcaje e hibridación con los oligonucleótidos dispuestos en el microarreglo, y una vez que haya ocurrido la hibridación sobre el microarreglo, el chip se lava y seca, para obtener la imagen producida por los *spots* que fueron reconocidos por el escáner y la cuantificación de su intensidad, para comenzar el análisis de la expresión génica (Figura 12).

7.4.1 Recomendaciones implementadas del plan de Affymetrix para mantener la consistencia del procedimiento

Se verificó la calidad del RNA mediante un espectrofotómetro, con las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , para determinar que la calidad del RNA se encontrara dentro de los rangos de pureza, al ser libre de contaminantes proteicos, fenol, etanol y sales.

También se evaluó que las preparaciones del RNA total fueran libres de DNA genómico mediante el Bioanalizador 2100,

A su vez, la integridad de las muestras de RNA se determinaron con un Bioanalizador 2100 a través del RIN, puesto que la retro-transcripción de un RNA degradado podría generar cDNA imperfectos o moléculas ausentes. Además, este sistema también nos permitió evaluar que las preparaciones del RNA total fueran libres de DNA genómico, ya que su presencia podría causar una sobreestimación de la cantidad de RNA y además podría ser amplificado junto con el RNA, conllevando a mediciones imprecisas del transcriptoma.

Con respecto a las mezclas de reacción, estas fueron preparadas sobre hielo y en el orden en el que se redacta, incluyendo un 5% de volumen para corregir pérdidas por pipeteo. Las incubaciones se llevaron a cabo en un termociclador

activando el calentamiento de la tapa a menos que se indique lo contrario, puesto que podrían ocurrir fluctuaciones en las concentraciones debidas a la condensación y afectar el rendimiento de las diferentes reacciones de síntesis. A su vez, cada mezcla de reacción comenzó a ser preparada ~15 minutos antes de que terminara el ciclado de un procedimiento anterior.

7.4.2 Preparación del control de RNA

La preparación de un control de RNA es usado como una reacción de control positivo para verificar que los reactivos funcionan como se espera, este RNA total proviene de células HeLa (1 mg/mL) y está incluido en el kit, cuya preparación se llevó a cabo de acuerdo al fabricante: Se colocaron 2 μ L del RNA control en 78 μ L de agua libre de nucleasas para un volumen total de 80 μ L (25 ng/ μ L), cuya concentración fue verificada en un Nanodrop.

7.4.3 Preparación de los controles de RNA Poli(A)

Estos controles de RNA Poli-A son recomendados para todas las reacciones que serán hibridadas con los microarreglos GeneChip™ y por lo cual, también fueron incluidos, ya que son un conjunto de controles premezclados del kit de control de RNA *GeneChip™ Poly-A*, diseñados específicamente para proporcionar controles positivos exógenos para monitorear toda la preparación del ST, por lo que fueron agregados antes de la primera síntesis de cDNA.

Los microarreglos GeneChip™ contienen un conjunto de oligonucleótidos para varios genes de *Bacillus subtilis* que están ausentes en muestras eucariontes (lys, phe, thr y dap) y son provistos por el fabricante; estos fueron sintetizados *in vitro* y las transcripciones poliadeniladas para estos genes fueron premezclados en concentraciones escalonadas, por lo que forman parte del control de calidad al verificar que las intensidades de hibridación concuerden a las concentraciones brindadas y así, validar el proceso del marcaje independientemente de la calidad de las muestras de RNA de partida.

Este control de RNA Poli-A es provisto en una solución concentrada, así que fue diluido a través de diluciones seriadas con el “*Poly-A Control Dil Buffer*” para poder añadirlo directamente a las muestras de RNA y lograr las

concentraciones finales referidas como una proporción del número de copias. Estas diluciones seriadas fueron realizadas para una cantidad de 100 ng de RNA total de partida, siguiendo la recomendación en la guía de Affymetrix. La primera dilución fue de 1:20, la segunda dilución de 1:50, la tercera dilución de 1:50 y la cuarta dilución de 1:10. Después, se preparó una mezcla por muestra de RNA total, que contenía 2 μL del RNA total de estudio (50 ng/ μL), 2 μL de la cuarta dilución y 1 μL de agua libre de nucleasas. A su vez, también se preparó el RNA control proveniente de HeLa, combinando 2 μL del RNA total (25 ng/ μL), 2 μL de la cuarta dilución (sustituyendo a 1:20 con respecto a la de 100 ng) y 1 μL de agua libre de nucleasas.

7.4.4 Síntesis de la primera cadena de cDNA

En este procedimiento de transcripción reversa, el RNA total es preparado con iniciadores que contienen una secuencia promotora T7. La reacción sintetiza cDNA monocatenario con la secuencia promotora T7 en el extremo 5'.

Los cálculos que se mostrarán enseguida fueron realizados para las 8 muestras que comprenden este trabajo.

1. Se preparó la mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena combinando 33.6 μL de “*First-Strand Buffer*” y 8.4 μL de “*First-Strand Enzyme*”, se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.
2. Enseguida, se transfirieron 5 μL de esta mezcla a cada tubo que contenía el RNA total/Control de RNA Poli-A (5 μL) generando un volumen final de 10 μL , se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.
3. Se incubó durante 1 hora a 25 °C, seguido de 1 hora a 42 °C y 2 min a 4 °C. Inmediatamente después de la incubación, se dio un *spin*, se colocó la muestra en frío durante 2 minutos y se prosiguió con la síntesis de la segunda cadena de cDNA, puesto que colocar la mezcla de reacción de la síntesis de la segunda cadena en un tubo caliente o dejar la reacción de la primera cadena más de 10 minutos a 4° podría reducir el rendimiento de cRNA.

7.4.5 Síntesis de la segunda cadena de cDNA

En este procedimiento, el cDNA monocatenario es convertido a un cDNA de doble cadena, que actúa como plantilla para la transcripción *in vitro*. La reacción utiliza una DNA polimerasa y una RNasa H para degradar la segunda cadena de cDNA.

1. Sobre hielo, se preparó la mezcla de reacción de síntesis de la segunda cadena de cDNA mezclando 151.2 μL de “*Second-Strand Buffer*” y 16.8 μL de “*Second-Strand Enzyme*”, se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.
2. Enseguida, se transfirieron 20 μL de esta mezcla a cada tubo que contenía la primera cadena de cDNA de cada muestra (10 μL), generando un volumen final de 30 μL , se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.
3. Se inhabilitó la tapa caliente del termociclador y se incubó durante 1 hora a 16 °C, seguido de 10 minutos a 65 °C y 2 min a 4 °C. Inmediatamente después de la incubación, se dio un *spin*, se colocó la muestra en frío y se prosiguió con la síntesis del cRNA.

7.4.6 Síntesis de cRNA por transcripción *in vitro*

El RNA antisentido o complementario (cRNA, *complimentary RNA*) fue sintetizado y amplificado por transcripción *in vitro* (IVT, por sus siglas en inglés *In Vitro Transcription*) mediante la T7 RNA polimerasa y como templado al cDNA de la segunda cadena.

1. La mezcla de reacción para la IVT fue preparada a temperatura ambiente, combinando 201.6 μL de “*IVT Buffer*” y 50.4 μL de “*IVT Enzyme*”, se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.
2. Enseguida, se transfirieron 30 μL de esta mezcla a cada tubo que contenía la segunda cadena de cDNA de cada muestra (30 μL), generando un volumen final de 60 μL , se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.

3. Finalmente, se incubó durante 16 horas a 40 °C y al terminar la incubación, se esperó a que el termociclador bajara su temperatura a 4 °C para continuar con su purificación.

7.4.7 Purificación del cRNA

Las enzimas, las sales, los fosfatos inorgánicos y los nucleótidos no incorporados son removidos para preparar el cRNA para la segunda síntesis de la primera cadena de cDNA.

Antes de comenzar la purificación del cRNA, algunos reactivos fueron preparados; El agua libre de nucleasas fue precalentada en un termobloque a 65 °C durante ~10 min. Las perlas de purificación se equilibraron a temperatura ambiente y se mezclaron por vórtex previo a su uso para asegurar que estuvieran totalmente dispersas. Se prepararon diluciones frescas de 80% de etanol para los lavados proveniente de etanol grado biología molecular y agua libre de nucleasas.

1. Se añadieron 100 µL de las “*Purification Beads*” a cada tubo que contenía las diferentes muestras de cRNA (60 µL), se mezclaron por pipeteo y se incubaron por 10 minutos para que el cRNA se uniera a las perlas.
2. Los tubos se colocaron en un soporte magnético para que las perlas fueran capturadas, la captura completa se llevó a cabo dentro de ~5 minutos, la mezcla se observaba transparente y se formaba un botón de perlas contra los magnetos. Cuidadosamente se aspiró y descartó el sobrenadante sin perturbar la unión de las perlas con el magneto.
3. Se realizaron un total de 3 lavados con 200 µL de etanol al 80%; se añadió el etanol, se incubó por 30 segundos y se aspiró lentamente para desecharlo, al completar los 3 lavados, se removió completamente el etanol y se dejó el tubo con la tapa abierta en el soporte magnético por 5 minutos y de requerirse tiempo adicional, no se dejó sobre secar las perlas porque eso podría reducir la eficiencia de elusión.

4. Inmediatamente, se removieron los tubos del soporte magnético y se le añadieron a cada muestra 27 μL de agua libre de nucleasas precalentada y se incubaron por 1 minuto. Se mezclaron por pipeteo y se volvieron a colocar los tubos en el soporte magnético para capturar a las perlas, dejando al sobrenadante que contiene el cRNA eluído. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo sobre hielo para proceder a la evaluación de la distribución del tamaño y el rendimiento del cRNA usando el Bioanalizador.

7.4.7.1 Evaluación del tamaño de distribución y rendimiento del cRNA

El rendimiento del cRNA depende de la cantidad y calidad del RNA total (no rRNA) de partida. Debido a que esta proporción del RNA total es afectada por factores asociados al tipo de célula, órgano u organismo del que proviene. Por lo cual se recomienda que, para la mayoría de los tejidos o tipos celulares, se parta de 100 ng de un RNA total para proveer > 20 μg de cRNA, cuya recomendación fue aplicada en este protocolo.

El rendimiento del cRNA (o concentración) fue valorada usando la absorbancia de la solución a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop; se colocaron 1.5 μL de cada muestra de cRNA y la concentración resultante fue usada para preparar los 15 μg necesarios en la reacción de síntesis del segundo ciclo de cDNA.

Por otro lado, el perfil de distribución de los tamaños esperados de cRNA fue de 50 a 4500 nt, con una abundancia mayor entre los tamaños de 200 y 2000 nt. Para analizar los tamaños del cRNA se usó el Bioanalizador 2100 de Agilent, con el kit RNA 6000 Pico y cargando 5 ng de cRNA en los chips del Bioanalizador se verificó que la distribución de los tamaños de cRNA obtenidos fueran similares a los esperados.

7.4.8 Segundo ciclo de síntesis de cDNA monocatenario

En este procedimiento, la cadena sentido de cDNA fue sintetizado por la transcripción reversa del cRNA usando los “*2nd- Cycle Primers*” provistos en el kit. La cadena sentido de cDNA contiene dUTPs en proporción a dTTPs.

1. Se requirieron 15 µg de cRNA para este segundo ciclo de la síntesis de la primera cadena de cDNA, por lo que se prepararon diluciones de las muestras de cRNA de 625 ng/µL en 24 µL.
2. Se le añadieron 4 µL de “*2nd- Cycle Primers*” a cada muestra de cRNA, se homogeneizaron usando vórtex y se les dio un *spin*.
3. Se incubaron durante 5 minutos a 70 °C, 5 minutos a 25 °C y 2 minutos a 4 °C. Paralelamente a la incubación, se preparó la mezcla de reacción del segundo ciclo de la primera cadena de cDNA (cadena sentido) con 67.2 µL del “*2nd-Cycle ss-cDNA Buffer*” y 33.6 µL de “*2nd-Cycle ss-cDNA Enzyme*”, se homogeneizó usando vórtex y se dio un *spin*.
4. Enseguida, se transfirieron 12 µL de esta mezcla a cada muestra de cRNA que contenía los “*2nd-Cycle Primers*” (28 µL) para un volumen final de 40 µL, se homogeneizaron usando vórtex y se les dio un *spin*.
5. Se incubaron durante 10 minutos a 25 °C, 90 minutos a 42 °C, 10 minutos a 70 °C y 2 minutos a 4 °C. Al terminar la incubación, se les dio un *spin* a las muestras y se colocaron sobre hielo para proseguir con la hidrólisis de RNA usando RNasa H.

7.4.8.1 Hidrólisis de RNA

En este paso, se utilizó una RNasa H para hidrolizar el templado de cRNA y mantener solo el cDNA monocatenario.

1. Se añadió 4 µL de RNasa H a cada muestra del segundo ciclo de la primera cadena de cDNA (40 µL) para un volumen final de reacción de 44 µL, se homogeneizaron por vórtex y se les dio un *spin*.
2. Al instante, cada muestra fue incubada durante 45 minutos a 37 °C, 5 minutos a 95 °C y 2 minutos a 4 °C.

3. Enseguida, se le añadieron 11 μL de agua libre de nucleasas a cada muestra de cDNA hidrolizada (44 μL) para un volumen final de la reacción de 55 μL , se homogeneizaron por vórtex y se les dio un *spin*. Se colocaron sobre hielo para proceder con su purificación.

7.4.8.2 Purificación del cDNA monocatenario

Después de hidrolizar el cDNA monocatenario, este fue purificado para remover las enzimas, sales y dNTPs no incorporados para preparar el cDNA para su fragmentación y marcaje.

1. Se añadieron 100 μL de las “*Purification Beads*” a cada tubo que contenía las diferentes muestras de cDNA (55 μL) y se mezclaron por pipeteo. Enseguida se les añadieron 150 μL de etanol absoluto a cada muestra que contenía el cDNA y las perlas (155 μL), se mezclaron por pipeteo y se incubaron por 20 minutos para que el cDNA se uniera a las perlas.
2. Los tubos se colocaron en un soporte magnético para que las perlas fueran capturadas, la captura completa se llevó a cabo dentro de ~5 minutos, la mezcla se observaba transparente y se formaba un botón de perlas contra los magnetos. Cuidadosamente se aspiró y descartó el sobrenadante sin perturbar la unión de las perlas con el magneto.
3. Se realizaron un total de 3 lavados con 200 μL de etanol al 80%; se añadió el etanol, se incubó por 30 segundos y se aspiró lentamente para desecharlo, al completar los 3 lavados, se removió completamente el etanol y se dejó el tubo con la tapa abierta en el soporte magnético por 5 minutos y de requerirse tiempo adicional, no se dejó sobre secar las perlas porque eso podría reducir la eficiencia de elusión.
4. Inmediatamente, se removieron los tubos del soporte magnético y se le añadieron a cada muestra 30 μL de agua libre de nucleasas precalentada y se incubaron por 1 minuto. Se mezclaron por pipeteo y se volvieron a colocar los tubos en el soporte magnético para capturar

a las perlas, dejando al sobrenadante que contiene el cDNA eluído. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo sobre hielo para proceder a la evaluación de la distribución del tamaño y el rendimiento del cDNA usando el Bioanalizador.

7.4.8.3 Evaluación del tamaño de distribución y rendimiento del cDNA

Para la mayoría de los tejidos o tipos celulares, los 15 µg usados de cRNA nos proporcionarían entre 5.5 y 15 µg de cDNA monocatenario aproximadamente. Sin embargo, solo se necesitaron 5.5 µg de cDNA monocatenario para fragmentarlo de acuerdo con el fabricante.

La concentración del cDNA fue realizada por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop; se colocaron 1.5 µL de cada muestra de cDNA y la concentración resultante fue usada para preparar los 5.5 µg necesarios para su fragmentación.

Por otro lado, se espera un tamaño promedio del cDNA de ~400 nt, que fue determinado en un Bioanalizador 2100 de Agilent, con el kit RNA 6000 Pico y se cargó 5 ng de cDNA en los chips del Bioanalizador para verificar los tamaños del cDNA de las muestras.

7.4.8.4 Fragmentación y marcaje del cDNA monocatenario

En este procedimiento, el cDNA de la cadena sentido que ya había sido purificado, fue fragmentado por la enzima UDG (*Uracil-DNA Glycosylase*) y por la APE 1 (*Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1*) que rompen la cadena de DNA en los residuos dUTP, que fueron incorporados durante el segundo ciclo de síntesis de cDNA.

1. Se prepararon diluciones del cDNA a 176 ng/ µL en un volumen de 31.2 µL para obtener los 5.5 µg que se fragmentaron como se muestra a continuación.
2. La mezcla de reacción se preparó combinando 84 µL de agua libre de nucleasas, 40.32 µL de “10X cDNA Fragmentation Buffer”, 8.4 µL de la

enzima UDG (10 U/ μ L) y 8.4 μ L de la enzima APE 1 (1000 U/ μ L), se homogeneizó usando vórtex y se le dio un *spin*.

3. Se transfirieron 16.8 μ L de esta mezcla a cada muestra de cDNA purificada (31.2 μ L) para un volumen final de 48 μ L, se homogeneizaron usando un vórtex, se les dio un *spin*.
4. Se incubaron durante 1 hora a 37 °C, 2 minutos a 93 °C y 2 minutos a 4 °C. Las muestras después de la incubación se colocaron sobre hielo para preparar las diluciones correspondientes para determinar el tamaño de los fragmentos de cDNA en un Bioanalizador.

7.4.8.4 Determinación de los tamaños de los fragmentos de cDNA

Los fragmentos del cDNA esperados oscilaban entre 40 y 70 nt aproximadamente. Este perfil de tamaños fue determinado Bioanalizador 2100 de Agilent, con el kit RNA 6000 Pico con 5 ng del cDNA fragmentado. Tras determinar que la mayoría de los fragmentos se encontraba entre el rango antes mencionado, se procedió con el marcaje de estos fragmentos.

7.4.8.5 Marcaje del cDNA

El cDNA fragmentado fue marcado con la enzima TdT (por sus siglas en inglés *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) usando un reactivo de marcaje de DNA unido covalentemente a la biotina, propiedad del fabricante.

1. Se preparó la mezcla de reacción para marcaje del cDNA, combinando 100.8 μ L de “5X TdT Buffer”, 8.4 μ L de “DNA Labeling Reagent (5 mM)”, 16.8 μ L de la enzima TDT (30 U/ μ L), se homogeneizó usando vórtex y se le dio un *spin*.
2. Se transfirieron 15 μ L de esta mezcla a 45 μ L de cada muestra del cDNA monocatenario fragmentado, para obtener un volumen final de 60 μ L, se homogeneizaron usando vórtex y se les dio un *spin*.
3. Enseguida, las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C, 10 minutos a 70 °C y 2 minutos a 4 °C. Al terminar la incubación, se les dio un *spin* nuevamente a las muestras y se almacenaron a -20 °C hasta su hibridación en los chips.

7.4.9 Hibridación de los microarreglos WT

Antes de comenzar con la hibridación de los microarreglos; se encendió el horno de hibridación, se ajustó la temperatura a 45 °C y las RPM a 60. Se encendió la rotación y se dejó que el horno se precaliente; Se equilibraron los chips a temperatura ambiente y a su vez, se etiquetaron con el nombre que identificara cada muestra que se hibridaría, esta información también fue registrada en la AGCC (por sus siglas en inglés, *Affymetrix GeneChip Command Console*).

1. Se prepararon las muestras de cDNA fragmentado y marcado, de manera que contuvieran 3.5 µg en 41 µL debido al formato del chip usado.
2. Después, se preparó la mezcla de reacción de hibridación a temperatura ambiente, combinando 21 µL de “*Control Oligo B2 (3 nM)*”, 63 µL de “*20X Hybridization Controls*” (precalentado durante 5 min a 60 °C), 630 µL de “*2X Hybridization Mix*”, 88.2 µL de DMSO y 113.4 µL de agua libre de nucleasas, la mezcla se homogeneizó usando vórtex y se le dio un *spin*.
3. Se transfirieron 109 µL de esta mezcla de reacción de hibridación a los tubos donde se contenían los 3.5 µg del cDNA fragmentado y marcado (41 µL), para obtener un volumen final de 150 µL, cada muestra homogeneizó usando vórtex y se les dio un *spin*.
4. Se incubaron durante 5 minutos a 99 °C y 5 minutos a 45 °C, al terminar, se le dio un *spin* y se procedió a inyectar este coctel en los chips.
5. El reverso del chip tiene dos septos, en el septo superior derecho se le insertó una punta de pipeta para ventilar (eliminación o disminución de la formación de burbujas) y en el septo inferior izquierdo, se inyectaron 130 µL del coctel de hibridación.
6. Se removió la punta de pipeta del septo superior derecho y se cubrió con “*1/2” Tough-Spots*” para minimizar la evaporación y/o prevenir pérdidas.

7. Finalmente, se colocaron los chips dentro de las bandejas del horno de hibridación y se incubaron con rotación a 60 rpm durante 16 horas a 45 °C.

7.4.10 Lavado y tinción de los microarreglos

1. Se removieron los chips del horno y los “1/2” *Tough-Spots* colocados al reverso.
2. Se extrajo el coctel de hibridación de cada chip y se transfirieron a tubos para su almacenamiento a -20 °C.
3. Se rellenó cada chip con el “*Wash Buffer A*” y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente antes de lavar y teñir.
4. Se preparó la estación de fluidos colocando los siguientes viales:
 - a. Tubo ámbar que contuviera 600 µL del “*Stain Cocktail 1*” en el soporte de la muestra 1 (de la estación de fluidos).
 - b. Tubo transparente que contuviera 600 µL del “*Stain Cocktail 2*” en el soporte de la muestra 2 (de la estación de fluidos).
 - c. Tubo ámbar que contuviera 800 µL del “*Array Holding Buffer*” en el soporte de la muestra 3 (de la estación de fluidos).
5. Los chips se lavaron de acuerdo al tipo de microarreglo y los componentes de hibridación, lavado y tinción usados, en este caso, se lavó con el protocolo “FS450_0002”.
6. Antes de escanear el chip, se verificó que no tuvieran burbujas de aire, en caso de tenerlas, se rellenó con “*Array Holding Buffer*” y se retiró hasta que no tuviese más burbujas. Después se cubrieron ambos septos con “3/8” *Tough-Spots* y se inspeccionó que la superficie del vidrio de los chips no tuviera polvo u otra partícula que pudiera interferir con el escáner, de ser necesario, se limpió cuidadosamente el vidrio.

7.4.11 Escáner de los microarreglos

Se escanearon los chips en un GeneChip Scanner 3000 para crear los archivos .dat (*Image Data*), después que el *software* de AGCC alinea una

cuadrícula en los archivos de los datos de imagen y calcula la intensidad de cada celda, generó otro tipo de archivo.cel (*Cell Intensity Data*) que es el necesario para el análisis de la expresión génica.

7.4.12 Análisis de expresión

Para el análisis estadístico, se empleó el programa *Transcriptome Analysis Console (TAC) Software*, proporcionado por *Applied Biosystem*, para realizar el control de calidad de la matriz y la normalización de los datos, la realización de pruebas estadísticas para la identificación de los transcritos con expresión diferencial y la obtención de la secuencia para diseñar experimentos de validación. El análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*) fue utilizado para identificar a los genes que son expresados diferencialmente entre las células precursoras neurales que portan la mutación A431E (PSEN1) y las células normales con un *fold-change* > 2 o $< - 2$ y un valor de $p < 0.05$. Para controlar la tasa de los falsos-positivos, se ajustó el valor p mediante el valor q o FDR (*False Discovery Rate*) de Benjamini Hochberg, contemplando como significativos a aquellos que obtuvieran un FDR < 0.05 .

7.5 Cuantificación de los microRNAs por RT-qPCR

Aunque los resultados del microarreglo nos pueden dar un panorama general sobre la expresión de una molécula, es necesario que los resultados provistos por el microarreglo sean corroborados por otros métodos. Para ello, se llevó a cabo el protocolo de RT-qPCR propuesto por Cirera & Busk¹¹³. Se trabajó con RNA total de las muestras, se incorporó una cola poli(A) en el extremo 3' de los miRNAs empleando una polimerasa poli(A) y se generó simultáneamente el cDNA con un *primer* que posee una secuencia poli(T) y una secuencia adaptadora. Para determinar la expresión relativa de los miRNAs en la condición A431E vs los controles, se realizaron las reacciones de qPCR con SYBR Green con dos *primers* específicos para cada miRNA.

7.5.1 Adición de la cola poli(A) y retrotranscripción simultánea.

Todos los reactivos estuvieron en hielo a menos que se indique lo contrario.

Los volúmenes indicados a continuación están calculados para una reacción:

1. Se preparó la mezcla de reacción para la retrotranscripción de los miRNAs, combinando 1 μL del *buffer* 10x de la polimerasa poli(A) de *E. coli*, así como 1 μL de 1 mM ATP, 1 μL del RT *primer* 5'CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTVN a 10 μM , 1 μL de una mezcla de dNTPs (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP), 0.5 μL (200 U/ μL) de la transcriptasa reversa M-MuLV, 0.2 μL (5000 U/mL) de la polimerasa poli(A) de *E. coli* y 4.3 μL de agua libre de RNasas, se homogeneizó y se le dio un *spin*
2. Se transfirieron 9 μL de esta mezcla a 1 μL de cada muestra del RNA total (100 ng), para obtener un volumen final de 10 μL , se homogeneizaron y se les dio un *spin*.
3. Enseguida, las muestras se incubaron durante 1 hora a 42 °C y 5 minutos a 95 °C para inactivar la reacción. Las muestras después de la incubación se colocaron sobre hielo, se determinó su concentración en un Nanodrop y se prepararon diluciones a 100 ng/ μL para la cuantificación de la expresión de cada miRNA por qPCR.

7.5.2 Diseño de *primers* específicos para cada miRNA

El diseño de los *primers* se llevó a cabo con el programa miRprimer ¹¹⁴. Este algoritmo genera una serie de *primers* basados en el diseño manual de Cirera & Busk ¹¹³, que consiste en encontrar la mejor secuencia 3' terminal para el *primer* y luego hacer el *primer* más largo hacia el extremo 5' hasta alcanzar

una T_m de 59 °C. El *primer* puede ser alargado con una cola de bases adicionales en el extremo 5' si la plantilla del miRNA es muy corta para construir un *primer* con una T_m de 59 °C. También toma en cuenta las estructuras secundarias, así como la probabilidad de la formación de dímeros y de la auto-complementariedad, asignando un puntaje de acuerdo con estos parámetros. Para terminar, los *primers forward* y *reverse* se combinan en todos los pares posibles y se les asigna una puntuación de acuerdo con la complementariedad entre los pares y los parámetros anteriores (Figura 13).

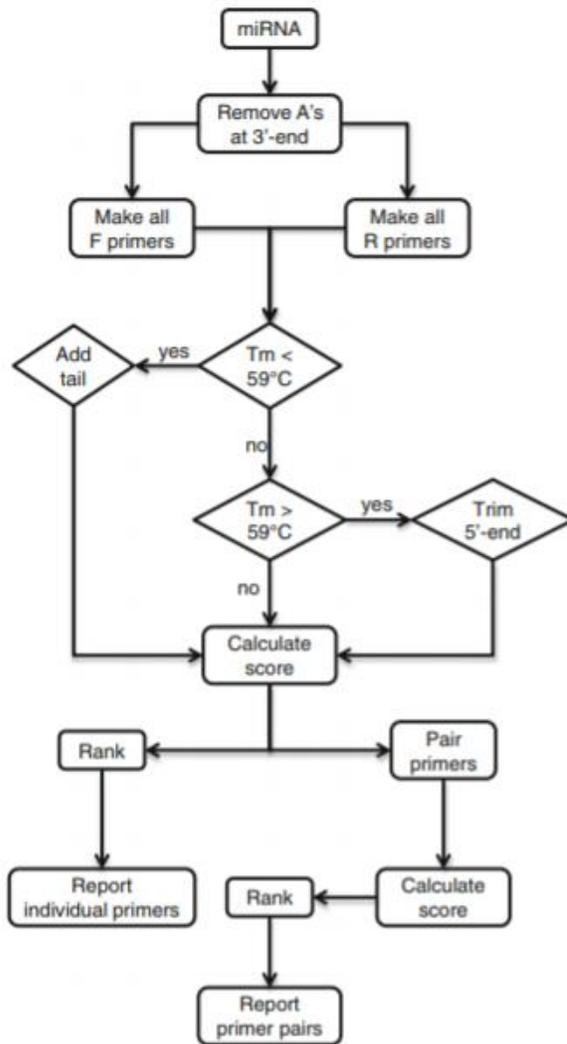


Figura 13. Flujo de trabajo del diseño de primers por miRprimer. F

primer: Forward primer, R primer: reverse primer; A: Adenina; T_m : melting temperatura.

Los *primers* que se sintetizaron fueron aquellos pares basados en el mejor puntaje asignado de acuerdo con las diferentes combinaciones resultantes (Anexo 6).

7.5.3 Cuantificación de la expresión de los microRNAs por qPCR

Uno de los métodos para analizar los datos de qPCR es la cuantificación relativa. La cuantificación relativa describe el cambio en la expresión de un gen blanco en una célula tratada con una condición particular y una célula control, sin tratar, como referencia, o bien el tiempo 0 de un tratamiento, etc., o en este contexto, relativo a las células que portan *versus* las que no portan la mutación A431E (PSEN1). Los cambios relativos en la expresión génica usando qPCR requieren ciertas ecuaciones, como el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El ciclo de umbral (C_T , *threshold cycle*) indica el número de ciclo fraccional en el que la cantidad amplificada objetivo alcanza un umbral fijo. Para ello, se han propuesto a los genes *housekeeping* como controles internos de la qPCR, dado que su expresión no suele afectarse cuando las células son expuestas a diferentes condiciones experimentales. Los datos resultantes usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ son presentados como veces de cambio en la expresión del gen normalizada a un gen de referencia ¹¹⁵. Para nuestros experimentos, se eligió al gen RNU6:

- *Forward*: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATA-3'
- *Reverse*: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'

Tomados de Wang *et al.* ¹¹⁶

Todos los reactivos estuvieron en hielo a menos que se indique lo contrario. Los volúmenes proporcionados indican lo necesario para una reacción.

1. Se preparó la mezcla de reacción para la cuantificación de los miRNAs por qPCR, combinando 0.8 μ L de una mezcla de los *primers forward* y *reverse* a 10 μ M, así como 5 μ L de 2x SybrGreen Universal Master Mix y 3.2 μ L de agua libre de RNasas, se homogeneizó y se le dio un *spin*.
2. Se transfirieron 9 μ L de esta mezcla a 1 μ L de cada muestra del cDNA (100 ng), para obtener un volumen final de 10 μ L, se homogeneizaron y se les dio un *spin*.
3. Inmediatamente, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Se incluyó una *Curva Melt* que parte de 60° C un minuto, 95 °C 15

segundos y 60 °C 1 minuto para corroborar la amplificación específica del miRNA.

7.5.3.1 Análisis estadístico

Los datos provistos por el instrumento de qPCR fueron exportados a Excel, el cambio de expresión en miR-146a-5p fue normalizado con U6. El qPCR se llevó a cabo con duplicados técnicos de cada cDNA sintetizado de cada muestra y los datos eran analizados usando la ecuación $2^{-\Delta\Delta C_T}$, donde $\Delta\Delta C_T = (C_{T, miRNA} - C_{T, U6})_{A431E} - (C_{T, miRNA} - C_{T, U6})_{Control}$

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism v. 8. Se utilizó la prueba *t* de Student y los grupos de valores se expresaron como la media \pm DE. Se consideró estadísticamente significativo a un valor de $p < 0.05$.

7.6 Corroboración de la transcripción de la mutación PSEN1 (A431E)

7.6.1 Diseño de *primers*

Se diseñaron *primers* que flanquearan a la mutación A431E (PSEN1) a nivel del RNA, contemplando los parámetros de complementariedad, la posible formación de estructuras secundarias, el porcentaje de GC, así como el tamaño del producto de PCR con ~150 pb. Estos *primers* fueron diseñados en Primer-BLAST en donde además de contemplar los parámetros anteriores, se corroboró su especificidad para el mRNA de PSEN1. El par de *primers* elegido se muestra a continuación: *Forward* 5'-GTGTTCTGGTTGGTAAAGCCTC-3', *Reverse* 5'-TGATGGAGATTGGAAGAGCTGG-3', cuyo producto esperado es de 150 pb y su T_m es de 60 °C.

7.6.2 Retrotranscripción del mRNA

Se llevó a cabo la retrotranscripción del RNA mediante el kit “*SuperScript™ VILO™ Master Mix*” de ThermoFisher Scientific, que ha sido optimizado para generar la primera cadena de cDNA para su uso en una RT-qPCR de dos pasos, permitiéndonos así, evaluar la expresión de cualquier mRNA tras la retrotranscripción de todos los mRNA de manera inespecífica, en comparación

con los de un paso, cuyas reacciones son específicas del mRNA de interés. Esta mezcla contiene a la enzima “*SuperScript™ III RT*” y a un Inhibidor de ribonucleasa recombinante RNaseOUT™ que nos ayuda a proteger al RNA de la degradación por ribonucleasas. La *SuperScript™ III RT* posee una actividad reducida de RNasa H y una mayor estabilidad térmica. También contiene *random primers*, MgCl₂ y dNTPs, ya optimizados para la RT-qPCR.

El volumen de la reacción de RT fue escalada a un volumen final de 30 µL. Los volúmenes indicados a continuación están calculados para una reacción:

1. Se preparó la mezcla de reacción combinando 6 µL del “*SuperScript™ VILO™ Master Mix*” y 23 µL de agua libre de nucleasas, se homogeneizó por pipeteo y se le dio un *spin*.
2. Se transfirieron 29 µL de esta mezcla a 1 µL de cada muestra del RNA total (100 ng), para obtener un volumen final de 30 µL, se homogeneizaron y se les dio un *spin*.
3. Inmediatamente, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 25 °C, seguido de una hora a 42 °C y la reacción se terminó con 5 minutos a 85 °C y una etapa infinita a 4 °C.
4. Las muestras después de la incubación se colocaron sobre hielo, se determinó su concentración en un Nanodrop y se prepararon diluciones a 100 ng/µL para corroborar la amplificación mediada por los *primers* diseñados para PSEN1, así como la amplificación específica y la formación de dímeros mediante PCR punto final y qPCR.

7.6.3 PCR punto final

Se determinó a través de PCR punto final el producto amplificado por los *primers* diseñados para el mRNA de PSEN1 visualizados en un gel de agarosa al 2% para todas las muestras. Se empleó el kit “*GoTaq Green Master Mix*” de Promega para la reacción de PCR. Este kit contiene una solución premezclada y lista para ser usada desde la preparación de la mezcla de PCR hasta su evaluación en geles de agarosa: contiene una DNA polimerasa Taq, dNTPs, MgCl₂ y *buffers* a concentraciones óptimas para una amplificación eficiente de

las plantillas del cDNA (o gDNA) mediante la PCR. Además, contiene dos colorantes (azul y amarillo) que nos permiten controlar el progreso de los productos de PCR durante la electroforesis: el azul migra en un rango de 3-5 kb de fragmentos de DNA y el amarillo migra más rápido que los *primers* (<50 pb).

Utilizamos como control interno de la reacción de PCR a *primers* que amplifican al gen de la subunidad 18S ribosomal (RPS18), obtenidos de Marrero *et al.* ¹¹⁷: *Forward* 5'-AATCCACGCCAGTACAAGATCCCA-3' *Reverse* 5' TTTCTTCTTGGACACACCCACGGT-3', la T_m de este par de *primers* es de 60°C y el producto esperado es de 240 pb.

Todos los reactivos estuvieron en hielo, los volúmenes indicados a continuación están calculados para una reacción:

1. Se preparó la mezcla de reacción para la amplificación de PSEN1 y de RPS18 de manera independiente, combinando para cada uno de ellos 15 μ L del "GoTaq® Green Master Mix", 1 μ L del *primer forward* y 1 μ L del *primer reverse* a 10 μ M del mRNA en cuestión, así como 12 μ L de agua libre de nucleasas, se homogeneizó y se le dio un *spin*.
2. Se transfirieron 29 μ L de estas mezclas a 1 μ L de cada muestra del cDNA (100 ng), para obtener un volumen final de 30 μ L, se homogeneizaron por pipeteo y se les dio un *spin*.
3. Inmediatamente, las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C, y una extensión de 72 °C.
4. Previamente a que terminara la reacción, se preparó un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio, para la resolución del producto de PCR de 150 pb para cada una de las muestras y este fue visualizado mediante un transiluminador de UV.

7.6.4 Purificación del producto de PCR

Se realizó una purificación de los productos de PCR previamente a la reacción de secuenciación, mediante el sistema *QIAquick* de QIAGEN, diseñado para una rápida limpieza del DNA. Este sistema utiliza la tecnología de las columnas con las propiedades de unión selectiva a una membrana de sílica. El DNA se adsorbe a la membrana de sílica en la presencia de altas concentraciones de sal, en donde los contaminantes pasan a través de la columna. Esta adsorción a la superficie de la sílica ocurre solamente en la presencia de la alta concentración de sales caotrópicas, modificando la estructura del agua y promoviendo su unión a la membrana de sílica. La membrana de sílica *QIAquick* está adaptada para purificar únicamente DNA desde soluciones acuosas (como la reacción de PCR) o desde los geles de agarosa.

Todos los reactivos estuvieron en hielo, los volúmenes indicados a continuación están calculados para una reacción:

1. Se añadieron 5 volúmenes del *Buffer* PB a 1 volumen de la muestra de PCR y se mezcló por pipeteo y se le dio un *spin*.
2. Se colocó el volumen final a una columna *QIAquick* dispuesta en un tubo de 2 mL y se centrifugó durante 60 segundos a 12,500 rpm.
3. Se desechó el flujo resultante después de la centrifugación y se colocó nuevamente la columna *QIAquick* en el tubo de 2 mL. Para lavar, se añadió 0.75 mL del *Buffer* PE a la columna y se centrifugó nuevamente durante 60 segundos a 12,500 rpm. Se desechó una vez más el flujo resultante y para remover completamente el etanol del *Buffer* PE se repitió este paso.
4. Finalmente, la columna se colocó en un tubo Eppendorf como recipiente final de colecta del producto de PCR purificado, a la cual, se le añadieron 33 μ L de agua libre de nucleasas directamente sobre la membrana de sílice al interior de la columna, permitiendo que se hidrate durante 5 minutos y centrifugándose a 12,500 rpm por un minuto para eluir el producto de PCR.

7.6.5 Secuenciación de la mutación PSEN1 (A431E)

Para determinar que la mutación en PSEN1 (A431E) se transcribe en las células precursoras neurales derivadas de la cavidad nasal, se utilizó el kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*” y se purificaron la reacción de secuenciación mediante columnas de gel Centri-Sep™ de ThermoFisher Scientific, puesto que proveen una excelente recuperación de fragmentos de DNA mayores a 16 pb, removiendo >98% de sales, dNTPs y otras impurezas de bajo peso molecular. Esta es hidratada con agua o algún *buffer* de elección y es centrifugada para remover el fluido intersticial, después, la muestra es agregada a la columna y vuelve a centrifugarse, dejándonos coleccionar la muestra purificada.

La preparación se llevó a cabo sobre hielo y los cálculos mostrados a continuación son por 1 Reacción:

1. Se preparó la mezcla para la reacción de secuenciación por Sanger, combinando 2 µL del “*BigDye™ Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer*”, 2 µL del *BigDye™ Terminator v3.1*, 1 µL del *primer Forward* (10 µM) y 3 µL de agua libre de nucleasas, se homogeneizó y se le dio un *spin*.
2. Se transfirieron 8 µL de esta mezcla a 2 µL de cada muestra de los productos de PCR purificados (1 ng/µL) para obtener un volumen final de 10 µL, se homogeneizaron por pipeteo y se les dio un *spin*.
3. Enseguida, las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C y 1 minuto a 60 °C.
4. La reacción de secuenciación fue purificada mediante columnas de gel Centri-Sep™, esta columna se hidrató con 800 µL de agua libre de nucleasas y se mantuvo por al menos 30 minutos hidratándose a temperatura ambiente.
5. Se removieron las burbujas de aire formadas en el gel de la columna por inversión o tocando bruscamente a la columna. Una vez que el gel estuvo libre de burbujas, este se colocó en un tubo de 2 mL y se le retiró

la tapa de la columna y el tope al extremo inferior de la columna para permitir el drenado del agua con la cuál se hidrató mediante su centrifugación a 2500 rpm durante 2 minutos.

6. La columna fue transferida a un nuevo tubo de colecta de 2 mL y se añadieron los 10 μ L de la reacción de secuenciación cuidadosamente a la parte superior del gel y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm durante 2 minutos.
7. Finalmente, la muestra se secó en una centrífuga de vacío sin aplicar calor. Esta muestra fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su secuenciación llevada a cabo por la Unidad de Genómica en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) del CINVESTAV, Zacatenco.

7.7 Curva de fusión o disociación (*Melt Curve*)

La curva derivativa de la gráfica de la curva de disociación contrasta el derivativo negativo ($-Rn'$) de la fluorescencia normalizada de cada pocillo vs la temperatura. Es decir, evalúa la disociación del DNA de doble cadena durante el calentamiento: a medida que aumenta la temperatura, la doble cadena comienza a desnaturalizarse (o disociarse), lo cual conlleva a un aumento en la intensidad de la fluorescencia. La temperatura a la que se desnaturaliza el 50% del DNA se conoce como temperatura de fusión/disociación. Esto nos permite visualizar el rango de cambio en la fluorescencia normalizada durante el cambio de temperatura, con la visualización de la formación de picos. Cada pico presente dentro de la gráfica corresponde al rango máximo de cambio en la fluorescencia para un particular pozo (o muestra), en el cual el programa estima la T_m para cada muestra. Picos inesperados pueden indicar una posible contaminación, dímeros o una amplificación no específica ¹¹⁸.

7.7.1 High Resolution Melt (HRM)

Un objetivo de este trabajo de tesis es determinar el patrón de expresión del alelo mutado con respecto al normal. Nuestra propuesta es hacerlo mediante *High Resolution Melt*, en donde una región de interés es amplificada por PCR en la presencia de un fluoróforo de unión al DNA de doble cadena. El producto

es gradualmente disociado y la fluorescencia emitida es medida a través de un termociclador de qPCR para generar una curva característica, resultando en un perfil de fusión (disociación) que refleje una mezcla de los amplicones presentes. Aspectos como el contenido de GC, longitud, secuencia y heterocigosidad podrían añadir diferencias en las curvas de fusión para cada amplicón. El perfil resultante puede proveer información para la identificación de mutaciones, genotipificación, metilación e inclusive, la evaluación de la expresión alélica ¹¹⁸.

Debido a la importancia que radica en el análisis de la *Melt Curve* en esta metodología, los *primers* diseñados para amplificar la región que contiene a la mutación PSEN1 (A431E) fueron probados en qPCR por SybrGreen, solo para determinar que no había formación de dímeros, ni la amplificación de productos inespecíficos observados por más de un pico. La metodología de HRM no fue empleada todavía, pero es una perspectiva para cumplir a corto plazo.

8. Resultados

Como se redactó con anterioridad en los métodos, la calidad e integridad del RNA de cada muestra a incluir en el estudio de expresión mediante microarreglos, se evaluó mediante el RIN. En este proyecto, el RIN de cada muestra estuvo por encima de 8, valor que había sido elegido como nuestro punto de corte para un RNA que se encuentra mayormente integro (Figura 14).

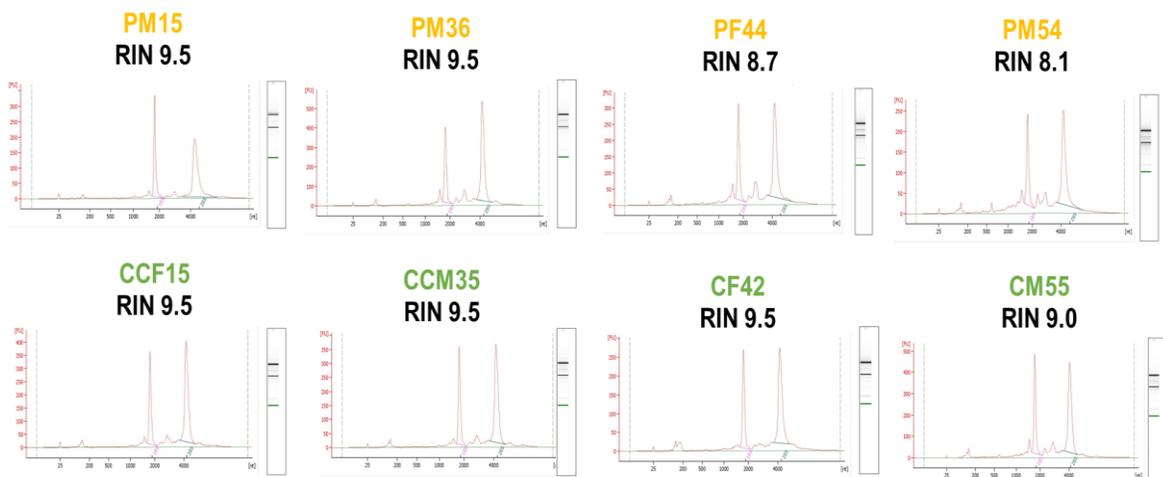


Figura 14. Integridad de las muestras de RNA total. Se muestran los electroferogramas en donde se observan las diferentes especies de RNAs contenidos en las extracciones de RNA total, desde los RNA ribosomales hasta los RNAs pequeños <200 nt, así como la imagen tipo gel en donde sobresalen las bandas de los RNA ribosomales. No se observa la presencia de gDNA.

Debido al desconocimiento del patrón de expresión del alelo mutado con respecto al del alelo normal, diseñamos *primers* flanqueantes a la mutación en el codón 431 del gen de PSEN1 (GCA → GAA), con la intención de determinar si el alelo mutado se expresa de manera bi-alélica (ambos alelos por igual), alelo-específica (un alelo más que el otro) o mono-alélica (solo uno de los alelos). Estos *primers* cumplieron con las características necesarias (Figura 15) para poder determinar la expresión alélica por HRM (*High Resolution Melt*), análisis post-PCR capaz de detectar un cambio de base en una secuencia debido a las variaciones en la desnaturalización durante la curva de fusión/disociación (*Melt Curve*), utilizada como herramienta principalmente para la genotipificación, búsqueda de mutaciones y la expresión génica/alélica. Desafortunadamente, aunque no se pudo llevar a cabo esta metodología, logramos concluir a través de la secuenciación de estos productos de PCR en los portadores de la mutación que el alelo mutado se transcribe independientemente de la edad o la presencia de síntomas, excluyendo así el patrón de expresión mono-alélica (Figura 16).

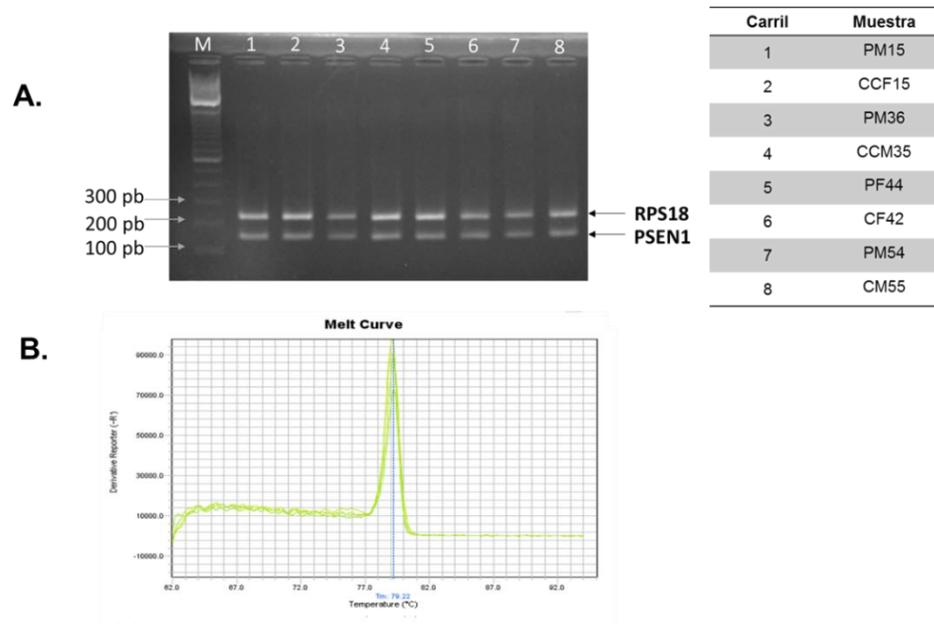


Figura 15. El producto de PCR de PSEN1 es específico y del tamaño esperado. A. El análisis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% muestra a los productos esperados para RPS18 y PSEN1, que son de 240 pb y 150 pb, respectivamente. B. El análisis de la formación de dímeros o productos inespecíficos mediante una Melt Curve por qPCR demostró que no hay formación de dímeros ni de productos inespecíficos al observarse solo un pico.

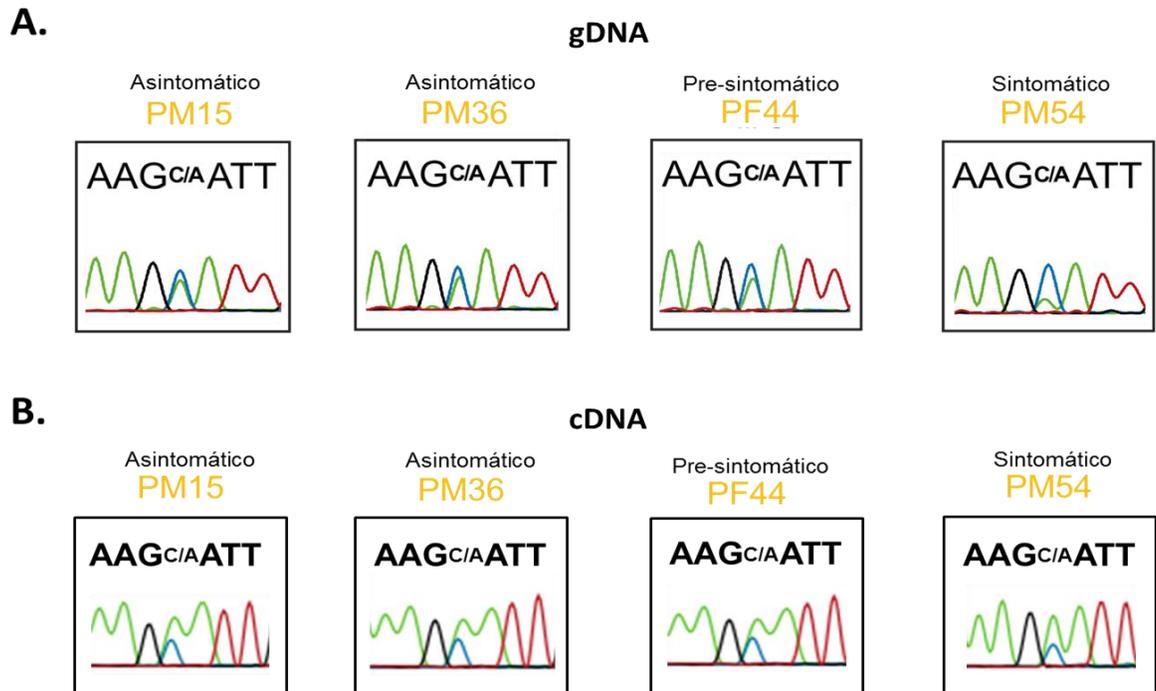


Figura 16. El alelo mutado se transcribe independientemente de la edad o presentación de síntomas. A. Se muestra la presencia de la mutación A431E (GCA → GAA) en el gDNA (Santos-Mandujano et al., 2019), así como su transcripción en todos los casos (B).

Con el fin de obtener una visión general de las posibles diferencias en el transcriptoma de las células precursoras neurales que portan la mutación A431E en PSEN1 en comparación con el grupo control, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Components Analysis*) con los resultados de expresión obtenidos en el chip “*GeneChip Human Gene 2.0 ST*”. El PCA es un eje principal de rotación de las variables originales que preserva la variación de los datos, donde el total de la variancia de las variables originales es igual a la variancia total de los componentes principales. Utiliza una transformación lineal que convierte n variables originales (típicamente genes o transcritos) en n nuevas variables que se denominan Componente Principal y tienen tres propiedades importantes: los componentes principales

1) se ordenan por la cantidad de variación explicada, 2) no están correlacionados y 3) explican toda la variación de los datos (Partek, 2019).

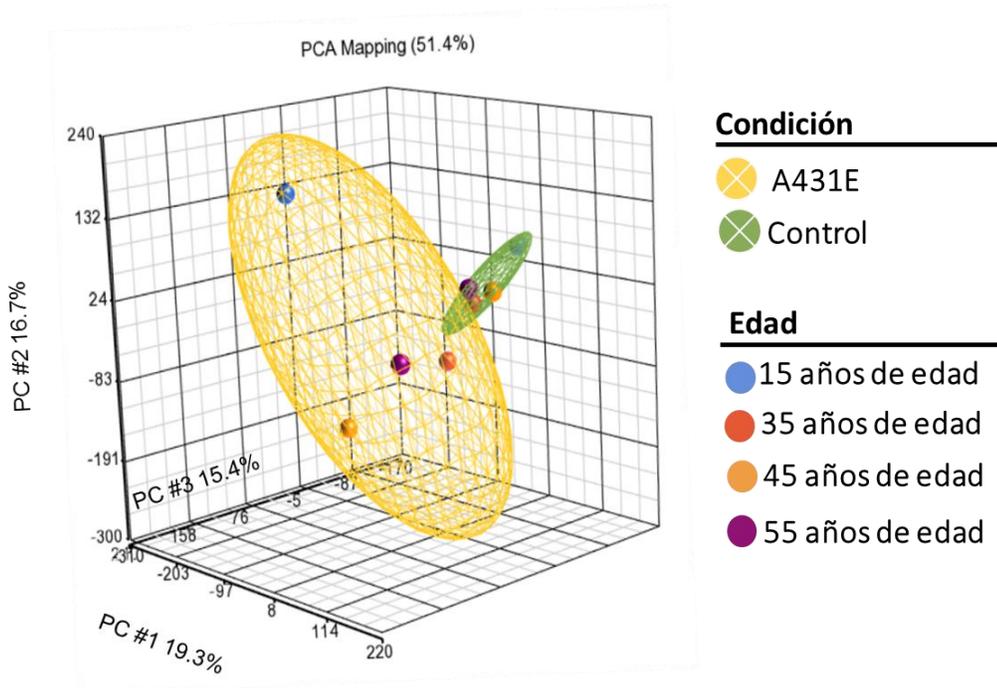


Figura 17. Análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles de expresión de miRNAs en células precursoras neurales que portan la mutación A431E. En el diagrama de dispersión, cada punto representa una muestra. El color de cada punto representa el grupo de edad al que pertenecen y el color de los elipsoides representa el perfil de expresión de las células que provienen de los individuos portadores de la mutación A431E de color amarillo, mientras que el elipsoide de control verde representa al perfil de expresión de las células provenientes de los individuos control. Gráfica realizada con Partek.

El PCA es un ejemplo de análisis de datos exploratorios y es útil para identificar valores atípicos y efectos importantes en los datos. Desde el diagrama de dispersión, podemos observar que la mutación es la principal fuente de variación con respecto a la edad, puesto que en el grupo control, el perfil de expresión es similar entre sí independientemente de la edad de los individuos en las que fueron aisladas las células (Figura 17).

El análisis de varianza (ANOVA, inglés *Analysis of Variance*) es una técnica muy poderosa para identificar genes expresados diferencialmente en un experimento multifactorial como este. En este conjunto de datos, el ANOVA se utilizó para generar una lista de genes que son significativamente diferentes entre las células precursoras neurales que portan la mutación A431E (PSEN1) y las células normales con un *fold-change* > 2 o < -2 y un valor de $p < 0.05$, ajustado por un FDR (*valor q*) < 0.05 .

De manera complementaria, se confirmaron estas diferencias de expresión entre las células que portan la mutación y las controles, a través del agrupamiento jerárquico en un mapa de calor (Figura 18). La agrupación jerárquica es un método estadístico utilizado para asignar objetos similares en grupos llamados “*clusters*”. Normalmente se realiza en los resultados de análisis estadísticos, como una lista de genes de interés del investigador o en todos aquellos que poseen una expresión diferencial. Esta agrupación es una técnica no supervisada, puesto que no tienen en cuenta la identidad o los atributos de las muestras cuando se agrupan. Esto significa que las variables experimentales, como el tratamiento, el fenotipo, el tejido, etc., no guían ni sesgan la creación de agrupaciones. Al principio, cada fila y/o columna se considera un grupo y después los dos grupos más similares se combinan y continúan combinándose hasta que todos los objetos están en el mismo grupo. El agrupamiento jerárquico produce un árbol (denominado dendrograma) que muestra la jerarquía de los *clusters* (Partek, 2019).

Este agrupamiento jerárquico, nos muestra una matriz de la expresión de los transcritos codificantes y no codificantes que se expresan diferencialmente entre la condición portadora de la mutación A431E y la control en el estadio precursor neural, permitiéndonos discernir a través de este perfil de expresión a las células que provienen de los portadores A431E de los controles, independientemente de que sean sintomáticos o asintomáticos o que los controles sean consanguíneos o externos (sin parentesco). Además, dentro de estos dos grupos, el agrupamiento jerárquico no nos permite observar que

exista una mayor similitud en la expresión de estos transcritos de acuerdo con la edad que tenían los individuos cuando se aislaron las células precursoras neurales, a excepción de las células aisladas a partir de los individuos más longevos con aproximadamente 55 años, tanto para la condición control como la portadora A431E (CM55 y PM54, respectivamente), que se ubican a una mayor distancia (disimilitud) con respecto a su grupo.

El número total de transcritos que están alterados son 324, de los cuales 45 son transcritos computados (prefijos XM_ o XR), es decir, RefSeqs (Secuencias de referencia) que son producidos por el canal de anotaciones del genoma de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) o copiados de las presentaciones anotadas computacionalmente al INSDC (*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*). Estos RefSeqs se derivan de la secuencia del genoma y tienen niveles variables de transcripción. Representan las transcripciones predichas anotadas en los *contigs* RefSeq del NCBI y pueden diferir de las presentaciones de mRNA de INSDC o de los registros de RefSeq curados posteriormente (con los prefijos de acceso NM_ o NR_). Los canales de anotación del genoma están automatizados y sus productos predichos pueden o no estar sujetos a una curación manual ¹¹⁹.

Los transcritos computados no fueron tomados en cuenta para el análisis bioinformático, dejando así un total de 279 transcritos alterados, observándose que la mayoría de los transcritos se expresan hacia la baja en las células precursoras neurales portadoras de la mutación A431E (Figura 18), de los cuales el 24% (68) se encuentra sobre-expresado y el 76% (211) sub-expresado. De estos 279 transcritos alterados en su expresión, 8 corresponden a lncRNAs, 264 a mRNAs y 7 a miRNAs. De los 7 miRNAs anteriormente mencionados; 4 microRNAs están alterados en su expresión hacia al alta (miR-130b, miR-3142, miR-147b 7 miR-146a) y 3 microRNAs hacia la baja (miR-32, miR-4521 y miR-1178) (Figura 19). Este perfil de expresión de miRNAs en las células precursoras neurales, nos permite

también distinguir si fueron aisladas a partir de un individuo portador de la mutación A431E o no.

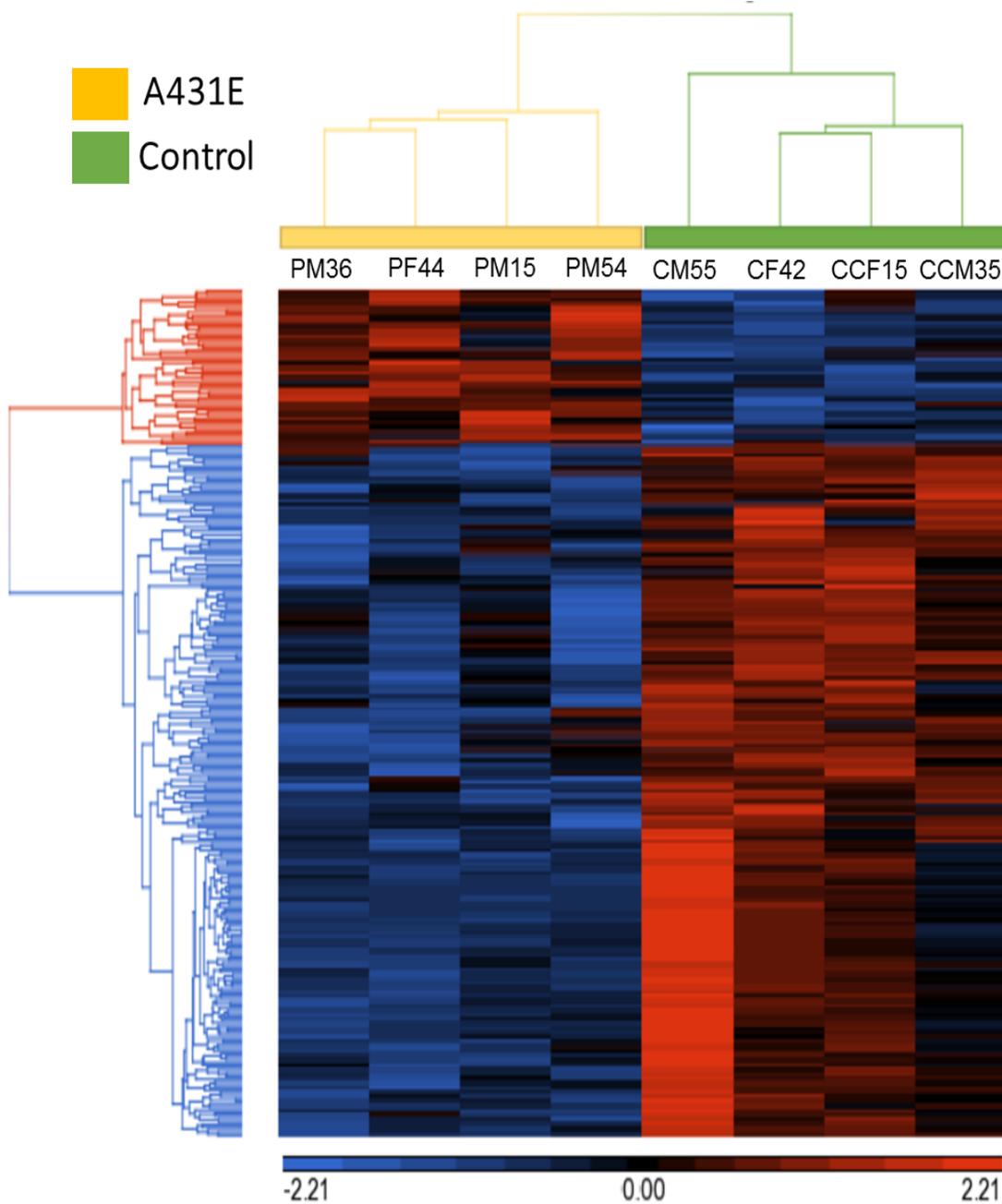


Figura 18. Mapa de calor del perfil de expresión RNAs codificantes y no codificantes expresados diferencialmente en células precursoras neurales de individuos sanos e individuos afectados por la mutación A431E. El conjunto de datos representado pertenece a aquellos transcritos

expresados diferencialmente. Cada gen está representado en una fila y cada muestra en una columna. La distancia entre dos grupos fue calculada por Average Linkage, donde la distancia promedio entre todos los pares de objetos en los dos grupos diferentes se utiliza como la medida de la distancia entre los dos grupos. Los genes sin diferencias en la expresión tienen un valor de cero y están representados por el color negro. Los genes con la expresión incrementada tienen valores positivos y están de color rojo, mientras que aquellos con la expresión reducida tienen valores negativos y son de color azul. El color del dendrograma superior hace alusión a la expresión diferencial que tienen las células portadoras A431E vs las células controles. Las muestras con la mutación A431E son de color amarillo y las muestras controles son de color verde. Los datos fueron estandarizados de manera que el promedio de cada transcrito fuera cero y la desviación estándar sea 1, provocando que todos los transcritos tengan el mismo peso. Gráfica realizada con Partek.

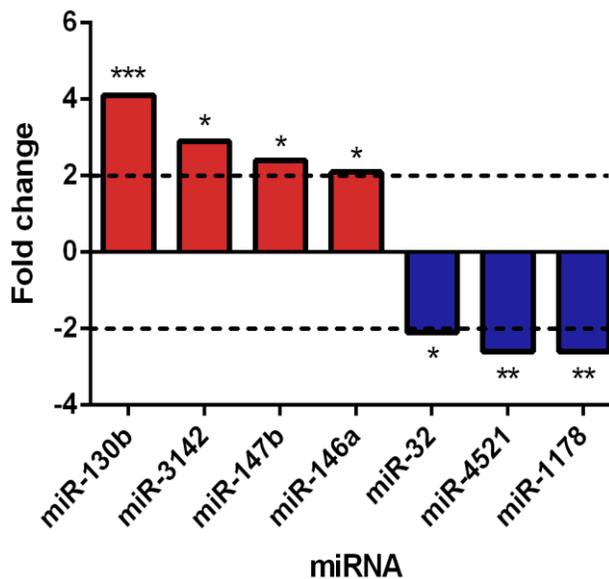


Figura 19. Expresión diferencial de microRNAs en células precursoras neurales de individuos afectados por la mutación A431E. Se muestran en barras de color rojo, aquellos miRNAs cuya expresión es al menos 2 veces mayor en las células que portan la mutación A431E que en los controles y de manera contraria, se muestran las barras en color azul si la expresión de los miRNAs es al menos 2 veces menor. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

de los miRNAs es al menos 2 veces menor. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

De manera interesante, estos miRNAs podrían tener un papel importante durante el envejecimiento y la neurodegeneración, puesto que vemos cómo su expresión permite una agrupación dependiente de la edad en la condición control, mientras que en los portadores de la mutación A431E, podemos observar cómo la expresión de este grupo de miRNAs es diferente en las células PF44 provenientes de los individuos asintomáticos en comparación con los pre- y sintomáticos (Figura 20).

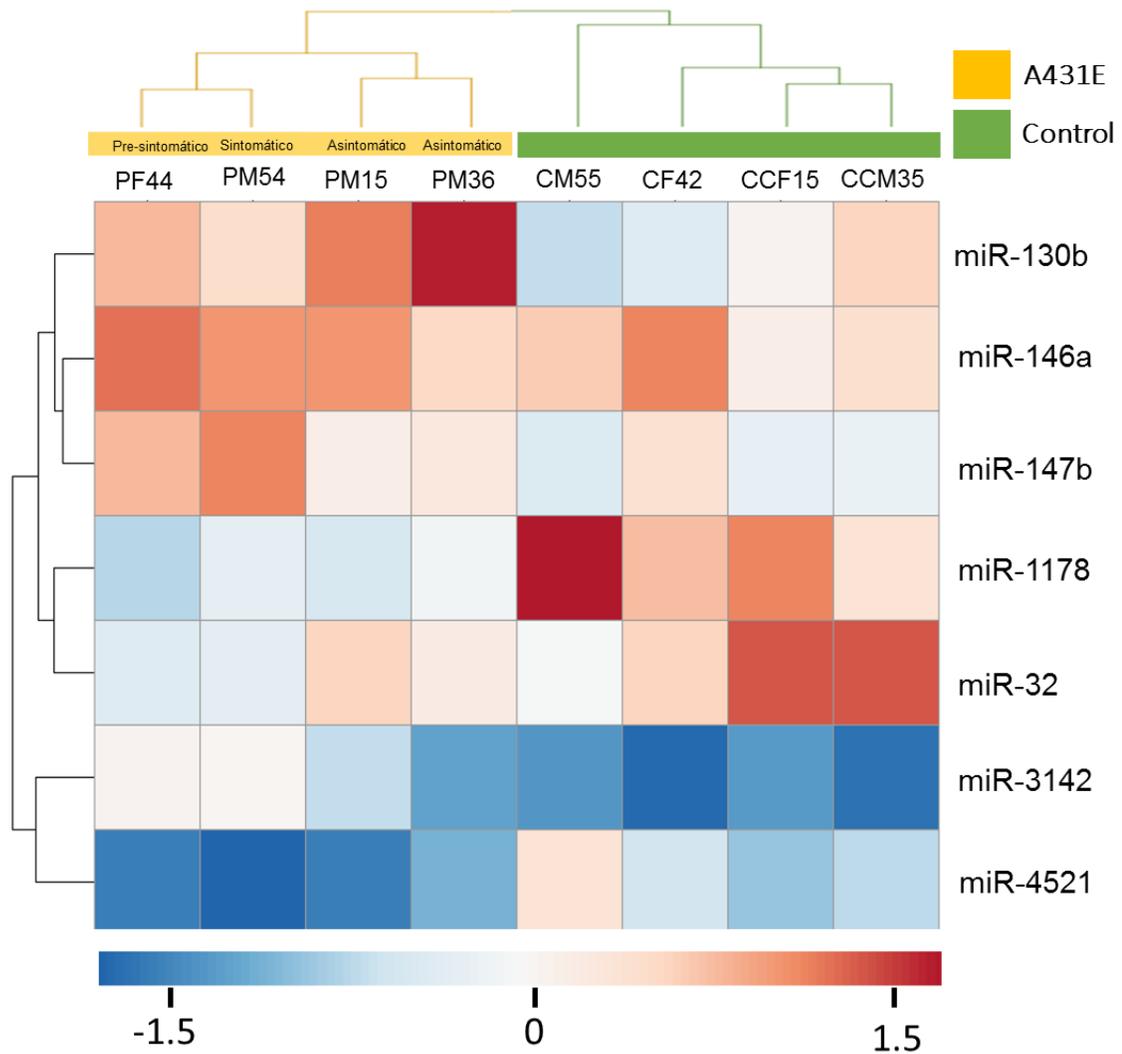


Figura 20. Mapa de calor del perfil de expresión de miRNAs expresados diferencialmente en células precursoras neurales de individuos sanos e individuos portadores de la mutación A431E. En amarillo se encuentran los

individuos portadores de la mutación A431E y en verde los controles. En la matriz, se representa con el rojo aquellos miRNAs que están sobre-expresados en los portadores de la mutación y en azul, aquellos que están sub-expresados. Gráfica realizada en ClustVis, también con un método de agrupamiento por promedios (*Average Linkage*), el valor z es dependiente del nivel de expresión (intensidad) obtenida a partir del microarreglo por cada microRNA.

Debido a las funciones biológicas que poseen los miRNAs, se les reconoce como valiosos biomarcadores diagnósticos y pronósticos, por lo cual se buscó una tendencia o correlación de la expresión de los miRNAs diferenciales, de acuerdo con la edad que tenían los individuos al momento del aislamiento de las células o de acuerdo con la edad de inicio sintomatológico. Aunque no se encontró correlación entre estos parámetros y la expresión de los miRNAs, encontramos que el miR-1178 comienza una disminución gradual en su expresión después de los 30 años, mientras que el miR-147b solo se observó su sobre-expresión cuando los individuos están cercanos al inicio sintomatológico en esta familia (~50 años) o cuando ya poseen síntomas (Figura 21).

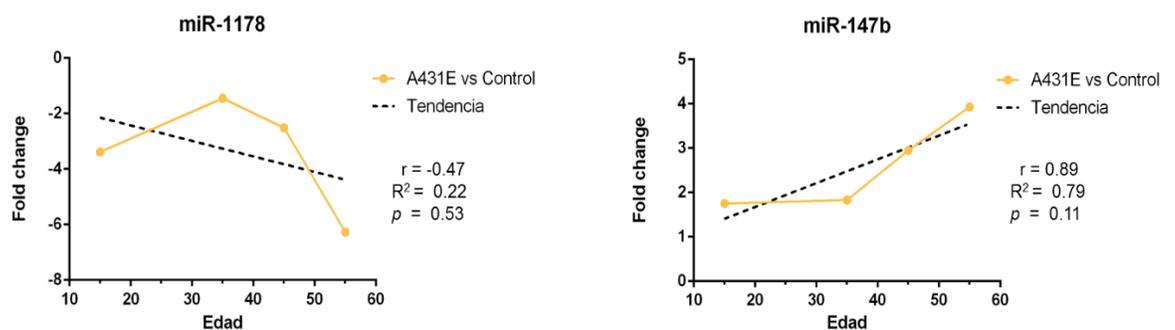


Figura 21. miRNAs expresados diferencialmente en las células precursoras neurales con la mutación A431E asociados a la edad. El Fold-change graficado corresponde a la comparación de la mutación A431E

vs su control pareado por edad. *CC: Control Control Consanguíneo, M: Masculino, F: Femenino y edad.

Como se observó con anterioridad, este tipo de experimentos pueden generar resultados que indiquen a cientos e incluso miles de genes que modifican sus niveles de expresión en una condición determinada, por lo que el resultado de un experimento requiere del análisis bioinformático, definido como la anotación de conjuntos de genes en “bases de datos” para vías metabólicas, procesos biológicos, función molecular, componente celular, ortología, etc. Antes de realizar el análisis bioinformático, buscamos los *targets* (objetivos/blancos) de los 7 miRNAs que encontramos con expresión diferencial en las células precursoras neurales. En la actualidad hay distintas bases y algoritmos que predicen las principales dianas potenciales de un miRNA en particular, con base en la secuencia complementaria entre el miRNA y el mRNA o de la región semilla del miRNA (2-8 nt del extremo 5' del miRNA), así como la energía libre del dúplex miRNA-mRNA, en donde cuando menos energía sea necesaria para su unión, más fácilmente se unirá el miRNA al mRNA. Debido a la variedad de algoritmos, utilizamos la web miRecords que recaba información de 11 programas de predicción que toman en cuenta las características antes mencionadas, como son: DIANA-microT, MicroInspector, miRanda, MirTarget2, miTarget, NBmiRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid y TargetScan/TargetScanS¹²⁰ y solo recopilamos aquellos *targets* que hubieran sido predichos por al menos 3 de estas bases de datos analizadas.

Sabemos que la búsqueda de *targets* para cada miRNA podría recibir miles de resultados, en donde no todos son reales, por lo que también añadimos a dos bases conocidas por poseer información de *targets* que han sido validados experimentalmente: TarBase y miRTarBase.

Tras obtener el resultado anterior, realizamos un diagrama de Venn como apoyo para determinar cuáles *targets* de los que fueron predichos y los que ya han sido validados en diferentes muestras biológicas podrían coincidir con

aquellos que encontramos alterados en las células precursoras neurales portadoras de la mutación A431E (PSEN1), el resultado de este diagrama es mostrado en la Figura 22 (para ver más información vaya al Anexo 1). De los 279 transcritos alterados, estos 7 miRNAs podrían regular a casi el 55% (152), de los cuales, el miR-4521 es el que cubre el mayor porcentaje de *targets* predichos con aproximadamente un 41% (62/152), seguido del miR-130b (~22%, 34/152), miR-146a (~20%, 30), miR-3142 (~19%, 29/152), miR-1178 (~16%, 25/152), miR-32 (~9%, 13/152) y miR-147b (~5%, 7), mientras que para los *targets* validados es un panorama distinto, en donde el miR-130b es el que posee una mayor cantidad de genes diana validados con el ~24% (36/152), seguido del miR-146a (~18%, 27/152), miR-32 (~16%, 24/152), miR-4521 (~4%, 6), miR-1178 (~1%, 1) y ya que no se encontró que los mRNA alterados en las células precursoras neurales A431E (PSEN1) coincidan con los ya validados para miR-3142 o miR-147b, la validación de estos blancos podrían contribuir al aumento en la red de regulación para estos miRNAs, que aún no han sido reportados.

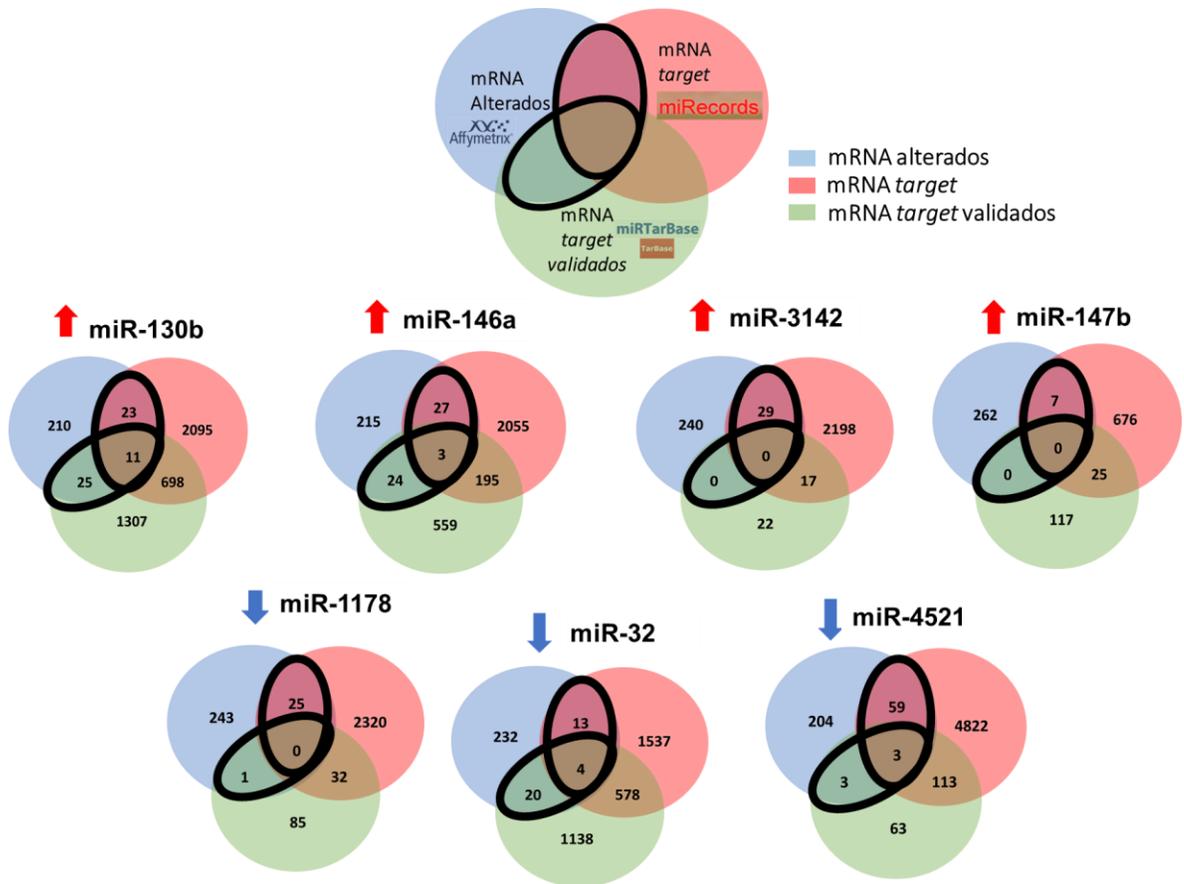


Figura 22. Predicción de los genes diana de los miRNAs. La intersección de los diagramas de Venn representa el grupo de genes diana que fueron utilizados para el análisis bioinformático. En el Anexo 1 podrá encontrar el nombre de los targets correspondiente a cada miRNA.

A continuación, se muestra el resultado de la validación del miR-146a-5p, uno de los miRNAs más abundante en tejido cerebral (Anexo 7) y entre los que tienen mayor porcentaje para los blancos predichos y los que ya han sido validados. Anteriormente habíamos encontrado que el perfil de expresión de los miRNAs diferenciales en las células PSEN1 (A431E) con respecto a los controles, nos permitió agrupar a los individuos asintomáticos y a los pre y sintomáticos en grupos distintos (Figura 23). Mediante la metodología de qPCR, pudimos comprobar que este fenómeno se reprodujo, encontramos que los individuos pre y sintomáticos expresan arriba de 20 veces más al miR-146a-5p, mientras que los asintomáticos podrían tener o no una expresión

diferente al control, independientemente de esto, podemos observar que la alteración en la expresión de los individuos pre- y sintomáticos con respecto al control de su edad, son muy similares, sugiriendo que probablemente la individuo pre-sintomático, comenzaría pronto a desarrollar la sintomatología característica de la mutación A431E (PSEN1). Cabe denotar, que este pronóstico se cumplió luego de aproximadamente dos años en que fueron aisladas las células de la individuo. Por otro lado, la muestra en la que no encontramos diferencias pertenece al individuo PM36 (III-10), que pertenece a otra rama de la familia con respecto a los demás portadores, siendo primo del individuo sintomático (PM54, III-4) y presintomático (PF44, III-8), que son hermanos y PM15 (IV-4) que es sobrino de los individuos PM54 y PF44. Estos resultados serán validados a partir de réplicas biológicas a corto plazo.

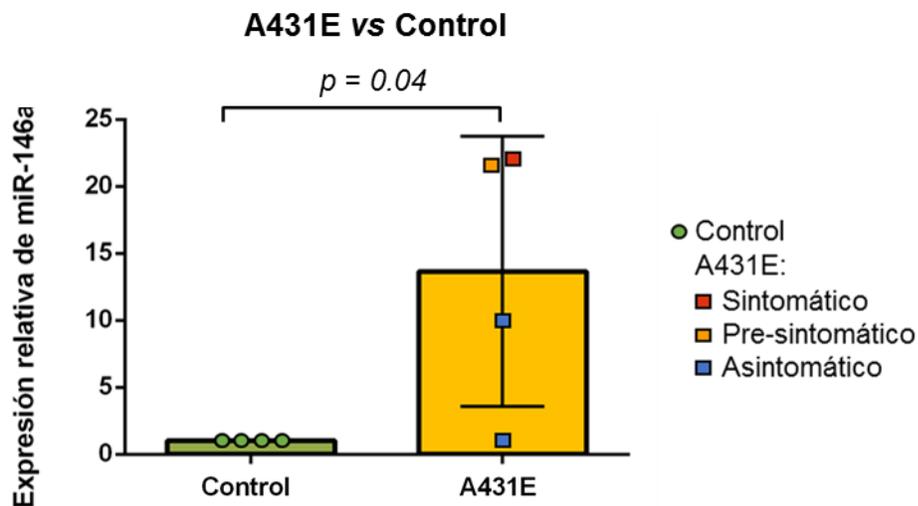


Figura 23. miR-146a-5p se sobre-expresa en las células precursoras neurales derivadas de la cavidad nasal de individuos portadores de la mutación A431E (PSEN1). Cada círculo (controles) o cuadrado (portadores), representa una muestra, cuyo valor proviene de un duplicado técnico durante la qPCR. En promedio, miR-146a-5p se expresa 12.66 ± 5.04 veces más en los individuos portadores A431E vs los controles.

Las bases de datos que se emplearon para determinar los probables procesos biológicos y las vías metabólicas en los que estarían implicados los miRNAs

resultantes, fueron GO (Genes Ontology) y DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), dentro de este último recurso bioinformático, utilizamos la base de datos de asociación genética GAD (Genetic Association Database) como fuente de mapeo de enfermedades genéticas, que tiene como objetivo recopilar, estandarizar y archivar datos de estudios de asociación genética. Así como el análisis de las vías de KEGG (Kyoto Encyclopedia Genomic and Genes), Reactome y BioCarta.

El resultado proporcionado a partir de GAD, nos mostró que las principales clases de enfermedades asociadas involucran el término de cáncer, envejecimiento, enfermedad renal y neurológica. Dentro de esta última categoría, también logramos identificar a la Enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con los genes blancos de los miRNAs en las células precursoras neurales A431E (PSEN1). Los genes asociados a estas enfermedades se muestran en el Anexo 2.

Los procesos biológicos y vías metabólicas que podrían estar alterados debido a la sobrerrepresentación de los transcritos que son diferentes en su expresión en las células precursoras neurales con la mutación A431E con respecto a sus controles, podrían tener un efecto en la disminución en la capacidad regenerativa de las células precursoras neurales de la cavidad nasal, debido principalmente a que estos procesos y vías están relacionadas con la regulación del ciclo celular, particularmente en la mitosis, conllevando a un posible arresto celular (Anexo 3-5).

9. Discusión

Muchos de los reportes ya han propuesto a los miRNAs como biomarcadores para la EA en diferentes muestras biológicas, como sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo y el cerebro ¹²¹⁻¹²³; el miR-1178 y el 146a-5p han sido parte de ellos. Por ejemplo, miR-1178 fue reportado como parte de un grupo de miRNAs que disminuye su expresión de manera gradual conforme a la progresión de la EA, tras perfilar la corteza prefrontal de 49 individuos no relacionados que fueron clasificados por los estadios de Braak¹²⁴. Nosotros, a pesar de no encontrar una correlación significativa entre la edad o el grado sintomatológico con respecto a la expresión de miR-1178, pudimos observar una disminución gradual en su expresión después de los 30 años.

Por otra parte, el aumento del miR-146a está asociado con la neurodegeneración proinflamatoria en la EA, pero también en la degeneración macular relacionada con la edad ¹²⁵; resaltemos que los individuos portadores de la mutación PSEN1 (A431E) también presentan problemas visuales. La expresión del miR-146a se ha asociado a la etapa clínica de la EA, aumentando conforme su progresión en la neocorteza y en el hipocampo; también se ha encontrado que sus niveles correlacionan con la densidad de las placas amiloides en la corteza cerebral de ratones transgénicos. En ratones transgénicos de APP se ha observado con mayor facilidad la sobre-expresión de miR-146a (como en pacientes con la EA) y los niveles son exacerbados con el aumento de la edad, mientras que en ratones transgénicos de Tau su alteración es más sutil ¹²⁶. Mientras que en el contexto de la EAF, existe solo un estudio que determinó que las iPSCs derivadas de fibroblastos de pacientes con la mutación en PSEN2 (N141I) y que fueron diferenciadas a microglía, así como el modelo en ratón PSEN2^{N141/wt} conlleva a un aumento de los niveles de las citocinas pro-inflamatorias, y que además, los estímulos inflamatorios no conducen a la inducción de la expresión del miR-146a, caracterizados por regular genes relacionados a la inflamación¹¹²

Scheppingen *et al.* estudiaron a los miRNAs que eran producidos por astrocitos durante condiciones inflamatorias mediadas por IL1 β *in vitro*, al considerar a los astrocitos como mediadores importantes de los procesos inflamatorios en el cerebro y su papel en los trastornos neurológicos, particularmente la epilepsia, por lo cual evaluaron la expresión de mRNA y miRNAs por secuenciación en cultivos de astrocitos fetales humanos estimulados con IL1 β . La validación de la expresión de los miRNAs fue analizada mediante hibridación *in situ* en tejido cerebral proveniente del lóbulo temporal de pacientes con esclerosis tuberosa o epilepsia. Encontraron dos miRNAs expresados diferencialmente: miR-146a y miR-147b, que se asociaron con una mayor expresión de genes relacionados con la respuesta inmune/inflamatoria. La sobre-expresión de miR-147b redujo la expresión de los mediadores pro-inflamatorios IL6 y COX-2 en los cultivos celulares. La sobre-expresión de miR-147b y miR-146a disminuyó la proliferación de astrocitos y promovió la diferenciación neuronal de las células troncales neurales humanas. Por lo anterior, se propuso que estos dos microRNAs como posibles blancos terapéuticos en trastornos neurológicos asociados con la inflamación, debido a su capacidad para impedir la proliferación astrocítica aberrante y promover la diferenciación neuronal¹²⁷.

IL1 β actúa sobre los astrocitos mediante la activación del receptor de IL-1 (IL-1R1), lo que lleva a la transcripción mediada por NF-kB de factores de crecimiento y varias moléculas relacionadas con el sistema inmune, incluidas otras citocinas y señales de peligro. Se sabe que miR-146a, está asociado con la modulación de la señalización del IL-1R/TLR4 (Toll-like Receptor 4), que está regulada a “la alza” en varias patologías del SNC, incluyendo el Alzheimer y sirve como un importante inhibidor de la inflamación en los astrocitos¹²⁷.

Aronica *et al.* investigaron la expresión y distribución del miR-146a en un modelo de ratón de epilepsia del lóbulo temporal, así como en células derivadas del hipocampo humano que también padecían de epilepsia del lóbulo temporal. Evaluaron la expresión de miR-146a en el hipocampo del

ratón en 1 semana y 3-4 meses después de la inducción del estado epiléptico en ellos, la sobre-expresión de miR-146a fue evidente una semana después del estado epiléptico inducido en los ratones y esta alteración persistió en la fase crónica. Mientras que, en el humano, se observó una mayor expresión astro-glial de este miR-146a principalmente en regiones donde se produjo pérdida de células neuronales y gliosis reactiva ¹²⁸.

Lukiw *et al.* determinaron la expresión del miR-146a en células neurales obtenidas del hipocampo y la neocorteza cerebral, que fueron cultivadas en condiciones de estrés, sea con IL-1 β , A β ₄₂ o H₂O₂. Encontraron que cuando este cultivo primario era tratado con IL-1 β , estas células solo mostraron un aumento en la abundancia del miR-146a de 1.35 veces, 2.7 veces si se complementaba con IL-1 β y β A₄₂ y un aumento de 3.1 veces después del tratamiento con H₂O₂. El gen del cual se transcribe el miRNA primario del miR-146a posee sitios de unión para el NF-kB en el extremo 5', este grupo de investigación utilizó el ensayo de cambio en la corrida electroforética o EMSA (por sus siglas en inglés, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), para analizar la abundancia del NF-kB en la neocorteza y el hipocampo de los individuos con la EA y los controles; encontraron que, en la EA, había una señal mayor en la neocorteza y en el hipocampo con respecto al control. Esto sugiere que parte de la vía de señalización inflamatoria en IL-1 β , β A₄₂ y el estrés oxidativo (H₂O₂) en las células cerebrales activadas por inflamación tanto *in vitro* como *in vivo*, implica una regulación a "la alza" del factor de transcripción NF-kB¹²⁹. Recordemos también que la liberación de IL-1 β , es un evento patológico temprano de la EA.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se trataron con H₂O₂ a células precursoras neurales obtenidas del epitelio olfatorio aisladas a partir de individuos portadores con la mutación A431E asintomáticos y encontramos que la viabilidad de estas células en su estadio precursor también es susceptible ante el estrés oxidativo mediado por H₂O₂. Sin embargo, la mutación no provoca cambios significativos en la viabilidad entre las células

precursoras neurales que portan la mutación comparado con las células control¹³⁰.

Otro de los miRNAs interesantes es miR-130b, ya que se encontró con una mayor sobre-expresión en las células precursoras neurales A431E (PSEN1), en este contexto, ya ha sido evaluado antes: Se sabe que las neural stem cells (NSCs) requieren de la señalización de Hedgehog-Gli para su mantenimiento y de la expresión de Nanog para su auto-renovación; sin embargo, Besharat y cols., identificaron tras analizar el perfil de expresión de mRNA y microRNA en células NSC provenientes de cerebelo murino, antes y después de su diferenciación, inducida a neuronas, a Foxm1, un factor de transcripción que resultó estar regulado directamente por Gli y por Nanog. Para explorar la relevancia funcional de su sobre-expresión, transfectaron a estas células con siRNAs dirigidos contra Foxm1 y evaluaron su capacidad de auto-renovación, reflejada por su capacidad para formar neuroesferas, el resultado fue que se mostró una capacidad disminuida para formar las neuroesferas. Por otro lado, estudios de secuenciación identificaron a 80 miRNAs que se expresaban diferencialmente entre las NSC y las neuronas diferenciadas, y que para identificar a aquellos miRNAs que probablemente sean *targets* directos de Foxm1, examinaron las regiones promotoras de los 40 miRNAs que estaban regulados a “la alza” en las NSC y encontraron sitios de unión de Foxm1 en 20 de ellos (miRNAs), entre los cuales, validaron la unión de miR-130b-5p y 3p mediante PCR-ChIP. Los niveles de expresión del miR-130b se modificaron a la baja después de silenciar a Foxm1; sin embargo, el silenciamiento de este miRNA de manera individual no redujo la formación de neuroesferas significativamente, mientras que el silenciamiento combinado de los otros miRNAs que también se alteraban al silenciar Foxm1, si lo logró, esta combinación incluía al miR-301a, miR-19a, miR-15b y al miR-130b. Esta combinación, tuvo efecto sobre marcadores de diferenciación, pero no sobre proliferación o apoptosis. Después, se centraron en aquellos genes diana validados cuya regulación a la baja podría explicar el efecto combinado de

estos miRNAs en la auto-renovación de las NSC, los resultados sugirieron que la pérdida o supresión de p53 es esencial para el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales embrionarias. Interesantemente, miR-130b-3p puede regular a las células iniciadoras de tumores CD133+ en el carcinoma hepatocelular humano dirigiéndose a TP53INP122, que codifica un componente corriente abajo de la vía de señalización de p53 ¹³¹.

También se ha demostrado en células progenitoras neurales embrionarias de ratón, que el miR-130b regula la expresión de Fmr1, cuya expresión se pierde en el síndrome de X frágil. La sobre-expresión de miR-130b en este tipo celular, provocan una disminución en la expresión de Fmr1 y causan un aumento en la proliferación de progenitores neurales y una alteración en su diferenciación cuando el miR-130b es colocado de manera exógena a este tipo celular, exhibiéndose una disminución del 44.57% en la diferenciación neuronal y un incremento del 23.03% hacia el linaje astrocítico ¹³².

El miR-130b-5p, ya ha sido reportado como uno de los miRNAs más enriquecidos en células progenitoras neurales en humano y que se encuentra sobre-expresado tanto en la región cerebral anterior, media y superior; los autores sugieren que podría tener un papel en la regulación de la proliferación de las células precursoras neurales ¹³³.

Conocemos que los pacientes PSEN1 (A431E) cursan con paraparesis espástica, caracterizada por una debilidad muscular de los miembros inferiores y los oligodendrocitos podrían ser fundamentales para entender más acerca de la patología. Podemos encontrarlos en el sistema nervioso central para producir la mielina, que proporciona una conductividad neuronal eficaz al disminuir la fuga de iones y la capacitancia de las membranas axonales. La ausencia de este tipo celular o problemas con su función provocan una desmielinización que dificulta la comunicación efectiva entre las neuronas, una de las causas asociadas a las enfermedades motoras. Usando un modelo derivado de células troncales embrionarias humanas, Letzen y cols. determinaron el perfil de microRNAs que se expresan en cada etapa durante

el proceso de diferenciación hasta un oligodendrocito maduro, entre los miRNAs resultantes, encontraron que el miR-130b disminuye su expresión desde las células embrionarias y en las células precursoras restringidas a la glía que finalmente terminan en un oligodendrocito maduro¹³⁴. Sin embargo, no ha sido evaluada la posible función de la sobre-expresión de miR-130b en condiciones patológicas o inducidas.

Con lo anterior, podemos observar como los miRNAs anteriormente discutidos poseen papeles asociados a la auto-renovación y diferenciación de las células precursoras neurales, predominando aquellos estudios que podrían sugerirnos que estas células presentarían dificultades para diferenciarse a neuronas.

En cuanto a los otros miRNAs alterados en su expresión, la literatura es menor en el contexto de las precursoras neurales, como ejemplo, podemos mencionar aquellos que fueron evaluados en un ambiente tóxico mediado por un herbicida (Paraquat) al cuál se le han asociado efectos neurotóxicos por perturbar la estructura/función normal del sistema nervioso central. Huang *et al.* analizaron el impacto del paraquat sobre células progenitoras neurales humanas (hNPC), por sus siglas en inglés (*Human Neural Progenitor Cells*) durante su proliferación a través de microarreglos para microRNAs, debido a su papel en la regulación del desarrollo neural. Determinaron que a 20 $\mu\text{mol/L}$ el paraquat afecta el porcentaje de viabilidad y apoptosis en este tipo celular, por lo que al evaluar el efecto sobre el perfil de microRNAs, encontraron alteraciones significativas en la expresión de 66 miRNAs, entre ellos el miR-4521 y el miR-3142 cuya expresión se afectaba a la baja y al alza, respectivamente¹³⁵.

En nuestro proyecto, también encontramos el mismo comportamiento de expresión de miR-4521 y miR-3142 que fue asociado por Huang *et al.* a una menor viabilidad celular en células precursoras neurales humanas¹³⁵, cuya implicación también podría explicar la pérdida del olfato que presentan los individuos, tras la disminución de las células precursoras neurales que conllevan al restablecimiento de las células sensoriales en la cavidad nasal.

Mientras que el miR-1178 fue reportado como parte de un grupo de miRNAs que disminuye su expresión de manera gradual conforme a la progresión de la EA, tras perfilar la corteza prefrontal de 49 individuos no relacionados que fueron clasificados por los estadios de Braak ¹²⁴. En la presente, también encontramos un patrón similar de la disminución de su expresión a partir de los individuos de 30 años portadores de la mutación en PSEN1 (A431E), cuyo resultado tendrá que ser corroborado por RT-qPCR.

En el análisis de las vías, las referentes al ciclo celular son las más significativas, consistente con el efecto biológico encontrado por Ayala-Grosso *et al.* en este tipo celular mesenquimal, precursor neural derivado de la cavidad nasal, aislados de pacientes con la EA, caracterizadas por una menor migración y proliferación comparado con las células aisladas de individuos con deterioro cognitivo leve o controles ⁵². Los genes asociados al ciclo celular alterados en su expresión en las células A431E (PSEN1) nos indicarían que el efecto biológico principal en esta vía involucraría el arresto del ciclo celular, coincidiendo con el papel asociado de estos microRNAs en la proliferación de las células precursoras neurales. Además, otra de las vías es NF- κ B, cuyo efecto biológico envuelve a la inflamación. El papel exacto de la inflamación en las células precursoras neurales es controversial, ya que se han reportado efectos perjudiciales y beneficiosos como respuesta a la inflamación. Los eventos negativos asociados a la inflamación involucran una menor auto-renovación, diferenciación neuronal, supervivencia y migración¹³⁶. También se ha denotado que las señales inflamatorias como TNF- α podrían desencadenar su proliferación vía NF- κ B¹³⁷. Estas células también responden a citocinas quimioatrayantes derivadas de un proceso inflamatorio para migrar al área del cerebro afectada por lesiones o afecciones neurodegenerativas, en el contexto de trasplantes, se ha denotado que la inflamación actúa positivamente sobre este tipo celular, pues se ha visto que un ambiente inflamatorio puede promover la eficiencia de un injerto de células precursoras neurales¹³⁶.

10. Conclusión

El alelo mutado, así como el normal para la mutación en el codón 431 del gen de PSEN1 se transcriben, en las células, independientemente de la edad o los signos de la enfermedad. El perfil de miRNAs de las células precursoras neurales derivadas del epitelio nasal de individuos portadores de la mutación A431E en PSEN1 presenta diferencias con respecto a las células que no tienen la mutación. Después de haber realizado el análisis estadístico, los resultados revelaron a 4 miRNAs sobre-expresados y a 3 miRNAs sub-expresados. Este perfil de expresión de los miRNAs en los individuos portadores es característico y diferente de las células que no tienen la mutación, además, nos permiten diferenciar a la condición normal de la mutada: entre estos miRNAs, el miR-1178 ya ha sido propuesto como un biomarcador para la EA y su disminución encontrada a partir de los individuos portadores de la mutación en PSEN1 (A431E) en los microarreglos debe ser corroborada en otros pacientes, al igual que el miR-147b. Interesantemente, el único miRNA corroborado hasta ahora, el miR-146a, mostró que sus niveles de expresión podrían ser usados como pronóstico de los signos de la enfermedad, puesto que su incremento es diferente en los individuos pre-sintomáticos y sintomáticos con respecto a los asintomáticos. Las herramientas bioinformáticas nos mostraron que los procesos biológicos afectados por los genes diana predichos para los miRNAs están involucrados principalmente en el ciclo celular, evidencia igualmente encontrada en las vías metabólicas, pero también podrían ser relevantes los procesos involucrados en inflamación en este estadio precursor. Apoyando a lo anterior, en la literatura encontramos que el papel de estos miRNAs alterados en estas células precursoras neurales, incluye a los procesos de diferenciación hacia el linaje neuronal y glial, b) el ciclo celular, lo cual podría conllevar a su arresto y por tanto a la disminución en la capacidad regenerativa de estas células en los cerebros de los pacientes portadores.

11. Bibliografía

1. IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social. (2017). Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México. 95 pp.
2. ANMM, Academia Nacional de Medicina de México. (2017). La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud. Primera edición, Intersistemas, México. 127 pp.
3. APA, American Psychiatric Association. (2018). Diagnostic and statistical Manual of Mental disorders. Published on www.psychiatry.org
4. Raux G., Guyant-Maréchal L., Martin C., Bou J., Penet C., Brice A., Hannequin D., Frebourg T. and Campion D. (2005). Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. Journal of Medical Genetics, 42(10): 793 – 795 pp.
5. Alzforum, Forest Biometrics Research Institute. (2018). MUTATIONS PSEN-1. www.alzforum.org
6. Reitz C. & Mayeux R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. Biochem Pharmacol 15; 88(4): 640 – 651 pp.
7. Hardy J. A. & Higgins G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science, 256(5054): 184 – 185 pp.
8. Alzheimer's Disease International (ADI). (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International (ADI), 92 pp.
9. OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019). Demencia. www.who.int
10. Gutiérrez-Robledo L. M. e Arrieta-Cruz I. (2015). Demencias en México: la necesidad de un Plan de Acción. Gac Med Mex, 151: 667 - 73 pp.
11. INNN, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. (2019). Enfermedad de Alzheimer. <http://www.innn.salud.gob.mx>.

12. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M., Siegelbaum S. A. & Hudspeth A. J. (2013). Principles of Neuronal Science. Fifth edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. 1709 pp.
13. Masters, C. L., R. Bateman, K. Blennow, C. C. Rowe, R. A. Sperling and J. L. Cummings. (2015). Alzheimer's disease. Nature's Reviews Disease Primers, 1: 18 pp.
14. Braak H. and E. Braak. (1997). Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. Neurobiology of Aging, 18(4): 351-357 pp.
15. Roher, A. E., C. L. Esh, T. A. Kokjohn, E. M. Castaño, G. D. Van Vickle, W. M. Kalback, R. L. Patton, D. C. Luehrs, I. D. Daus, Y-M. Kuo, M. R. Emmerling, H. Soares, J. F. Quinn, J. Kaye, D. J. Connor, N. B. Silverberg, C. H. Adler, J. D. Seward, T. G. Beach and M. N. Sabbagh. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia, 5:18–29 pp.
16. Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla. (2010). Alzheimer's Disease. The New England Journal of Medicine, 362 (4): 329 – 344 pp.
17. Sennvik, K., J. Fastbom, M. Blomberg, L-O. Wahlund, B. Winblad and E. Benedikz. (2000). Levels of α - and β -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. Neuroscience Letters, 278: 169 - 172 pp.
18. Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Enderes, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dquenne, E. Godaux, F. van Leuven and F. Fahrenholz. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. The Journal of Clinical Investigation, 113 (10): 1456 – 1464 pp.
19. Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. O'Leary and M. Tessier-Lavigne. (2009). N-APP binds DR6 to cause axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature, 457 (7225): 981 - 989 pp.

20. Gertsik, N., D. Chiu and Y-M Li. (2015). Complex regulation of γ -secretase: from obligatory to modulatory subunits. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6: 10 pp.
21. Haapasalo A. & Kovacs D. M. (2011). The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase. *Journal of Alzheimer's Disease*, 25 (1): 3 – 28 pp.
22. Larner, A. J. (2013). Presenilin-1 mutations in Alzheimer's Disease: An update on Genotype-Phenotype relationships.
23. Yescas, P., Huertas-Vazquez A., Villarreal-Molina M. T., Rasmussen A., Tusié-Luna M. T., López M., Canizales-Quinteros S. y Alonso M. E. (2006). Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families. *Neurogenetics*, 7: 195 – 200 pp.
24. Murrell J., Ghetti B., Cochran E., Macias-Islas M. A., Medina L., Varpetian A., Cummings J. L., Mendez M. F., Kawas C., Chui H. & Ringman J. M. (2006). The A431E mutation in PSEN1 causing familial Alzheimer's disease originating in Jalisco State, Mexico: an additional fifteen families. *Neurogenetics*, 7 (4): 277 – 279 pp.
25. Dumois-Petersen S., Gallegos M. P., Ringman J. M., Magaña T., Perea F. J., Figuera L. E. (2018). Frecuencia de la mutación c.1292 C>A en el gen PSEN1 en pacientes con demencia familiar de inicio temprano del estado de Jalisco. Congreso Nacional de Genética Humana, Asociación Mexicana de Genética Humana, Genética Médica: GM35.
26. Santos-Mandujano, R. A. (2019). Caracterización clínica y molecular de la mutación PSEN1 Ala431Glu en una familia mexicana que muestra una variante atípica de la Enfermedad de Alzheimer Familiar. Tesis de Doctorado, CINVESTAV, Zacatenco.
27. Rogaeva E. A., Fafel K.C., Song Y.Q., Medeiros H., Sato C., Liang Y., Richard E., Rogaev E.I., Frommelt P., Sadovnick A.D., Meschino W., Rockwood K., Boss M.A., Mayeux R. and St. George-Hyslop P. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases. *Neurology*, 57: 621 – 625 pp.

28. Ringman J. M., Diaz-Olavarrieta C., Rodriguez Y., Chavez M., Paz F., Murrell J., Macias M- A., Hill M.& Kawas C. (2004). Female preclinical presenilin-1 mutation carriers unaware of their genetic status have higher levels of depression than their non-mutation carrying kin. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75(3):500 – 502 pp.
29. Ringman J. M., Younkin S.G., Pratico D., Seltzer W., Cole G.M., Geschwind D.H., Rodriguez-Agudelo Y., Schaffer B., Fein J., Sokolow S., Rosario E.R., Gylys K.H., Varpetian A., Medina L.D. & Cummings J. L. (2008). Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease. *Neurology*, 71 (2): 85 – 95 pp.
30. Portelius E., Andreasson U., Ringman J. M., Buerger K., Daborg J., Buchhave P., Hansson O., Harmsen A., Gustavsson M. K, Hanse E., Galasko D., Hampel H., Blennow K. & Zetterberg H. (2010). Distinct cerebrospinal fluid amyloid β peptide signatures in sporadic and PSEN1 A431E associated familial Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 5 (2): 1 – 10 pp.
31. Soosman S. K., Joseph-Mathurin N., Braskie M. N., Bordelon Y. M., Wharton D., M. Casado, G. Coppola, H. McCallum, M. Nuwer, P. Coutin-Churchman, L. G. Apostolova, T. Benzinger & J. M. Ringman. (2017). Widespread white matter and conduction defects in PSEN1-related spastic paraparesis. *Neurobiology of Aging*, 47: 201 – 209 pp.
32. Parker J., Mozaffar T., Messmore A., Deignan J. L., Kimonis V. E. & Ringman J. M. (2019). Homozygosity for the A431E mutation in PSEN1 presenting with a relatively aggressive phenotype. *Neuroscience Letters*, 699: 195 – 198 pp.
33. Collins C., Katz E., Lee G., Alford V., Williams H., Guillen D., Wu X., Flanagan J., Sjoberg E., Gandy S., Lockhart D. J., Wustman B., Dungan L.B. (2012). Cell-based model for presenilin 1 early-onset Familial Alzheimer's Disease (EOFAD): dominant negative effects and relative stabilities of Presenilin 1 with EOFAD mutations. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8(4); P241.

34. Saraceno C., Musardo S., Marcello E., Pelucchi S. & Di Luca M. (2013). Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Frontiers in Pharmacology*, 4 (77): 22 pp.
35. Mungenast A. E., Siegert S. & Tsai L. H. (2016). Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 73: 13 – 31 pp.
36. Yagi T., Ito D., Okada Y., Akamatsu W., Nihei Y., Yoshizaki T., Yamanaka S., Okano H. & Suzuki N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 20 (23): 4530 – 4539 pp.
37. Israel M. A., Yuan S. H., Bardy C., Reyna S. M., Mu Y., Herrera C., Hefferan M. P., Van Gorp S., Nazor K. L., Boscolo F. S., Carson C. T., Laurent L. C., Marsala M., Gage F. H., Remes A. M., Koo E. H. & Goldstein L. S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482 (7384): 216 – 220 pp.
38. Solinsky C. M., Desai M. K., Yao J., Hennes V., Chui H. C., Ichida J. K. & Diaz-Briton R. (2015). Early-stage development of iPS-based biomarkers to identify patient population with a regenerative profile responsive to allopregnanolone. *ElSevier*, 11(7): P633-634 pp.
39. Martínez-Cerdeño V. & Noctor S. C. (2018). Neural Progenitor Cell Terminology. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12 (104): 8 pp.
40. Huart C., Rombaux P. & Hummel T. (2013). Plasticity of the human olfactory system: the olfactory bulb. *Molecules*, 18 (9): 11586 – 11600 pp.
41. Gudziol V., Buschhuter D., Abolmaali N., Gerber J., Rombaux P. & Hummel T. (2009). Increasing olfactory bulb volume due to treatment of chronic rhinosinusitis-a longitudinal study. *Brain Journal of Neurology*, 132: 3096– 3101 pp.
42. Löttsch J., Schaeffeler E., Mittelbronn M., Winter S., Gudziol V., Schwarzacher S. W., Hummel T., Doehring A., Schwab M., Ultsch A. (2014). Functional genomics suggest neurogenesis in the adult human olfactory bulb. *Brain structure & function*, 219 (16): 1991 – 2000 pp.

43. Olender T., Keydar I. Pinto J. M., Tatarsky P., Alkelai A., Chien M-S., Fishilevich S., Restrepo D., Matsunami H., Gilad Y. (2016). The human olfactory transcriptome. *BioMed Central Genomics*, 17 (619): 18 pp.
44. Morais-Cabral J. H. & Robertson G. A. (2015). The enigmatic cytoplasmic regions of KCNH channels. *Journal of Molecular Biology*, 427(1): 67 – 76 pp.
45. Hägglund M. G. A., Hellsten S. V., Bagchi S., Philippot G., Löfqvist E., Nilsson V. C. O., Almkvist I., Karlsson E., Sreedharan S., Tafreshiha A. & Fredriksson R. (2015). Transport of L-glutamine, L-alanine, L-arginine and L-histidine by the neuron-specific Slc38a8 (SNAT8) in CNS. *Journal of Molecular Biology*, 427 (6): 1495 – 1512 pp.
46. Jonsson M., Björntorp Mark E., Brantsing C., Brandner J. M., Lindahl A. & Asp J. (2004). Hash4, a novel human achaete-scute homologue found in fetal skin. *Genomics*, 84 (5): 859 – 66 pp.
47. Sammeta N., Hardin D. L. & McClintock T. S. (2010). Uncx regulates proliferation of neural progenitor cells and neuronal survival in the olfactory epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 45(4): 398 – 407 pp.
48. Rezek D. L. (1987). Olfactory Deficits as a Neurologic Sign in Dementia of the Alzheimer Type. *Archives of Neurology*, 44: 1030 – 1032 pp.
49. Serby M., Corwin J., Conrad P. & Rotrosen J. (1985). Olfactory dysfunction in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *American Journal of Psychiatry*, 142 (6): 781 – 782 pp.
50. Kotecha A. M., Correa A. D. C., Fisher K. M. & Rushworth J. V. (2018). Olfactory dysfunction as a global biomarker for sniffing out Alzheimer's Disease: A meta-analysis. *Biosensors*, 8 (41): 13 pp.
51. Benítez-King G., Riquelme A., Ortíz-López L., Berlang C., Rodríguez-Verdugo M. S., Romo F., Calixto E., Solís Chagoyán H., Jiménez M., Montañó L. M., Ramírez-Rodríguez G., Morales-Mulia S., Domínguez-Alonso A. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 201 (1): 35 – 45 pp.

52. Ayala-Grosso C. A., Pieruzzini R., Diaz-Solano D., Wittig O., Abrante L., Vargas L. & Cardier J. (2014). Amyloid-A β Peptide in Olfactory Mucosa and Mesenchymal Stromal Cells of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Patients. *Brain Pathology*, 25, 136 – 145 pp.
53. Lindsay S. L. & Barnett S. C. (2017). Are nestin-positive mesenchymal stromal cells a better source of cells for CNS repair? *Neurochemistry International*, 106: 101 – 107 pp.
54. Delorme B., Nivet E., Gaillard J., Häupl T., Ringe J., Devèze A., Magnan J., Sohier J., Khrestchatisky M., Roman F.S., Charbord P., Sensebé L., Layrolle P., Féron F. (2010). The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Development*, 19: 853 – 866 pp.
55. Lindsay S. L., Johnstone S. A., Mountford J. C., Sheikh S., Allan D. B., Clark L., Barnett S. C. (2013). Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia*, 61: 368 – 382 pp.
56. Di Trapani M., Bassi G., Ricciardi M., Fontana E., Bifari F., Pacelli L., Giacomello L., Pozzobon M., Féron F., De Coppi P., Anversa P., Fumagalli G., Decimo I., Menard C., Tarte K. & Krampera M. (2013). Comparative study of immune regulatory properties of stem cells derived from different tissues. *Stem Cells Development*, 22: 2990 – 3002 pp.
57. Johnstone S., Liley M., Dalby M. J. & Barnett S. C. (2015). Comparison of human olfactory and skeletal MSCs using osteogenic nanotopography to demonstrate bone specific bioactivity of the surfaces. *Acta Biomaterialia*, 13: 266 – 276 pp.
58. Rui K., Zhang Z., Tian J., Lin X., Wang X., Ma J., Tang X., Xu H., Lu L. & Wang S. (2016). Olfactory ecto-mesenchymal stem cells possess immunoregulatory function and suppress autoimmune arthritis. *Cellular & Molecular Immunology*, 13:401 – 408 pp.
59. Wetzig A., Alaiya A., Al-Alwan M., Pradez C.B., Pulicat M.S., Al-Mazrou A., Shinwari Z., Sleiman G.M., Ghebeh H., Al-Humaidan H., Gaafar A., Kanaan

- I. & Adra C. (2013). Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. *BMC Molecular and Cell Biology*, 14: 54 pp.
- Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC Neuroscience*, 7 (64): 18 pp.
60. Tomé M., López-Romero P., Albo C., Sepúlveda J.C., Fernández-Gutiérrez B., Dopazo A., Bernad A. & González M.A. (2011). miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 18: 985 – 995 pp.
61. Lindsay S. L., Johnstone S. A., McGrath M. A., Mallinson D. & Barnett C. (2016). Comparative miRNA-Based Fingerprinting Reveals Biological Differences in Human Olfactory Mucosa- and Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports*, 6: 729 – 742 pp.
62. Arnold S. E., Lee E. B., Moberg P. J., Stutzbach L., Kazi H., Han L-Y., Lee V. M. Y. & Trojanowski J. Q. (2010). *Annals of Neurology*, 67 (4): 462 – 469 pp.
63. Alvarado-Martínez R., Salgado-Puga K. & Peña-Ortega F. (2013). Amyloid Beta Inhibits Olfactory Bulb Activity and the Ability to Smell. *PLoS One*, 8 (9): e75745.
64. Yao Z. G., Hua F., Zhang H. Z., Li Y. Y. & Qin Y. J. (2017). Olfactory dysfunction in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Morphological evaluations from the nose to the brain. *Neuropathology*, 37: 485 – 494 pp.
65. Zhou H., Wang B., Sun H., Xu X. & Wang Y. (2018). Epigenetic Regulations in Neural Stem Cells and Neurological Diseases. *Stem Cells International*, 10 pp.
66. Pertea M. (2012). The human transcriptome: An unfinished story. *Genes*, 3: 344 – 360 pp.
67. Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Bronstein M. J., Tuschl T. & Margalit H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 33 (8): 2697 – 2706 pp.

68. Olena A. F. & Patton J. G. (2010). Genomic Organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 222 (3): 540 – 545 pp.
69. Denli A. M., Tops B. B. J., Plasterk R. H. A., Ketting R. F. & G. J. Hannon. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432: 231 – 235 pp.
70. 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. *The EMBO Journal*, 23 (20): 4051 – 4060 pp.
71. Borchert G. M., Lanier W., Davidson B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13 (12): 1097 – 1101 pp.
72. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S. & Kim V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425 (6956): 415 – 419 pp.
73. Gregory R. I., Yan K. P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N. & Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014): 235 – 240 pp.
74. Nicholson A. W. (2014). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(1): 31 – 48 pp.
75. Okada C., Yamashita E., Lee S. J., Shibata S., Katahira J., Nakagawa A., Yoneda Y. & Tsukihara T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 326(5957): 1275 – 1279 pp.
76. Kim Y. K., Kim B. & Kim V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *PNAS*, 113(13): E1881-9.
77. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. & Hannon G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363 – 366 pp.
78. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A. E., Bálint E., Tuschl T. & Zamore P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme

- Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293: 834 – 838 pp.
79. Tian Y., Simanshu D. K., Ma J. B., Park J. E., Heo I., Kim V. N. & Patel D. J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Molecular Cell*, 53 (4): 606 – 616 pp.
80. Park J E., Heo I., Tian Y., Simanshu D. K., Chang H., Jee D., Patel D. J. & Kim V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature*, 475: 201 – 205 pp.
81. Lee H. Y. & Doudna J. A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA*, 18 (11): 2012 – 2019 pp.
82. Lee H. Y., Zhou K., Smith A. M., Noland C. L. & Doudna J. A. (2013). Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Research*, 41 (13): 6568 – 6576 pp.
83. Rand T. A., Petersen S., Du F. & Wang X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123 (4): 621 – 629 pp.
84. Frank F., Sonenberg N. & Nagar B. (2010). Structural basis for 5. *Nature* 465, 818 –822 pp.
85. Gebert L. F. R. & MacRae I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 20: 21 – 37 pp.4
86. Giraldez A. J., Cinalli R. M., Glasner M. E., Enright A. J., Thomson J. M., Baskerville S., Hammond S. M., Bartel D. P. & Schier A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 308 (5723): 833 – 838 pp.
87. Kosik K. S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nature reviews. Neuroscience*, 7 (12): 911 – 920 pp.
88. Bartel D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1): 20 – 51 pp.
89. Cheng C., Li W., Zhang Z., Yoshimura S., Hao Q., Zhang C. & Wang Z. (2013). MicroRNA-144 is regulated by activator protein-1 (AP-1) and decreases expression of Alzheimer disease-related a disintegrin and

- metalloprotease 10 (ADAM10). *Journal of Biological Chemistry*, 288 (19): 13748-61 pp.
90. Augustin R., Endres K., Reinhardt S., Kuhn P. H., Lichtenthaler S. F., Hansen J., Wurst W. & Trümbach D. (2012). Computational identification and experimental validation of microRNAs binding to the Alzheimer-related gene ADAM10. *BMC Medical Genetics*, 13(35): 12 pp.
91. Faghili, M. A., M. Zhang, J. Huang, F. Modarresi, M. P. Van der Brug, M. A. Nalls, M. R. Cookson, G. St-Laurent III and C. Wahlestedt. (2010). Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biology*, 11: R56.
92. Roshan R, T. Ghosh, M. Gadgil and B. Pillai. (2012). Regulation of BACE1 by miR-29a/b in a cellular model of Spinocerebellar Ataxia 17. *RNA Biology*, 9:891-899 pp.
93. Liu C. G., Wang J. I., Li L., Xue L. X., Zhang Y. Q. & Wang P. C. (2014). MicroRNA-135a and -200b, potential Biomarkers for Alzheimer's disease, regulate β secretase and amyloid precursor protein. *Brain Research*, 1583: 55 – 64 pp.
94. Lei X., Lei L., Zhang Z., Zhang Z. & Cheng Y. (2015). Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 8(2): 1565 – 1574 pp.
95. Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136 (2): 215 – 233 pp.
96. Eulalio A, Huntzinger E & Izaurralde E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*, 132: 9 -14 pp.
97. Baek D., Villen J., Shin C., Camargo F. D., Gygi S. P & Bartel D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455: 64 – 71 pp.
98. Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N., Fang Z., Khanin R. & Rajewsky N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455: 58 – 63 pp.

99. Guo H., Ingolia N. T., Weissman J. S., Bartel D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466: 835-840 pp.
100. Laressergues D., Couzigou J.M., Clemente H.S., Martinez Y., Dunand C., Bécard G. & Combier, J.P. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*, 520: 90 – 93 pp.
101. Eiring A. M., Harb J. G., Neviani P., Garton C., Oaks J. J., Spizzo R., Liu S., Schwind S., Santhanam R., Hickey C.J., Becker H., Chandler J. C. Andino R., Cortes J., Hokland P., Huettner C. S. Bhatia R., Roy D. C. Liebhaber S. A., Caligiuri M. A, Marcucci G., Garzon R., Croce C. M., Calin G. A. & Perrotti D. (2010). miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 140: 652 – 665 pp.
102. Fabbri, M., Paone A., Calore F., Galli R., Gaudio E., Santhanam R., Lovat F., Fadda P., Mao C., Nuovo G.J., Zanesi N., Crawford M., Ozer G. H., Wenicke D., Alder H., Caligiuri M. A., Nana-Sinkam P., Perrotti D. & Croce C. M. (2012). MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109 (31): E2110 – E2116 pp.
103. Lehmann S.M., Krüger C., Park B., Derkow K., Rosenberger K., Baumgart J., Trimbuch T., Eom G., Hinz M., Kaul D., Habel P., Kälin 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. *Nature Neuroscience*, 15: 827 – 835 pp.
104. Vasudevan S., Tong Y. & Steitz J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318: 1931–1934 pp.
105. Das S., Ferlito M., Kent O.A., Fox-Talbot K., Wang R., Liu D., Raghavachari N., Yang Y., Wheelan S. J., Murphy E. & Steenbergen C.

- (2012). Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circulation Research*, 110: 1596 – 1603 pp.
106. Matsui M., Chu Y., Zhang H., Gagnon K.T., Shaikh S., Kuchimanchi S., Manoharan M., Corey D.R. & Janowski B. A. (2013). Promoter RNA links transcriptional regulation of inflammatory pathway genes. *Nucleic Acids Research*, 41: 10086 –10109 pp.
107. Tang R., Li L., Zhu D., Hou D., Cao T., Gu H., Zhang J., Chen J., Zhang C.Y. & Zen K. (2012). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Research*, 22: 504 – 515 pp.
108. Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., Wyman S. K., Pogosova-Agadjanyan E. L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K. C., Allen A., Lin D. W., Urban N., Drescher C. W., Knudsen B. S., Stirewalt D. L., Gentleman R., Vessella R. L., Nelson P. S., Martin D. B., Tewari M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105 (30): 10513 – 10518
109. 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. *PCNA USA*, 108 (12): 5003 – 5008 pp.
110. Schwarzenbach H., Nishida N., Calin G. A., Pantel K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11: 145–156 pp.
111. Lv, Z., L. Hu, Y. Yang, K. Zhang, Z. Sun, J. Zhang, L. Zhang and Y. Hao. (2018). Comparative study of microRNA profiling in one Chinese Family with PSEN1 G378E mutation. *Metabolic Brain Disease*; 10 pp.
112. Fung S., Amos P., Case A., Ramakrishnan A., Neumann H., Garden G. A. & Jayadev S. (2015). Familial Alzheimer's disease PSEN2 mutations regulate inflammatory microRNAs in microglia, P184: O2-05-03.

113. Cirera S. & Busk P. K. (2014). Chapter 7: Quantification of miRNAs by a Simple and Specific qPCR Method. 73 – 81 pp. In: Alvarez M., Nourbakhsh M. (eds). RNA Mapping. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1182. Humana Press, New York, N. Y.
114. Busk P. K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. BMC Bioinformatics, 15 (29): 8 pp.
115. 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 (4): 402 – 408 pp.
116. Wang Y., Sun J-C., Wang H. B., Xu X-M., Yang Y., Kong Q-J. & Shi J-G. (2018). Effects of MicroRNA-494 on Astrocyte Proliferation and Synaptic Remodeling in the Spinal Cord of a Rat Model of Chronic Compressive Spinal Cord Injury by Regulating the Nogo/Ngr Signaling Pathway. Cellular Physiology & Biochemistry, 48: 919 – 933 pp.
117. Marrero D., Peralta R., Valdivia A., De la Mora A., Romero P., Parra M., Mendoza N., Mendoza M., Rodríguez Dalila, Camacho E., Duarte A., Castelazo G., Vanegas E., García I., Vargas C., Arenas D., Jimenez F & Salcedo M. (2012). The neurofibromin 1 type I isoform predominance characterises female population affected by sporadic breast cancer: preliminary data. Journal of clinical pathology, 65: 419 – 423 pp.
118. Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). Applied Biosystems™ High Resolution Melt Curve Analysis Module. 78 pp,
119. Pruitt, K., G. Brown & M. Murphy. (2018). RefSeq Frequently Asked Questions (FAQ)
120. Xiao F., Zuo Z., Cai G., Kang S., Gao X. & Li T. (2009). miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. Nucleic Acids Research, 37: D105 – D110 pp.
121. Geekiyanage H, Jicha. G. A., Nelson P. T. & Chan C. (2012). Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. Experimental neurology, 235 (2): 491 – 496 pp.

122. Lusardi T. A., Phillips J. I., Wiedrik J. T., Harrington C. A., Lind B., Lapidus J. A., Quinn J. F. & Saugstad J. A. (2017). MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55 (3): 1223 – 1233 pp.
123. Shaik M. M., Tamargo I. A., Abubakar M. B., Kamal M. A., Greig N. H. & Gan S. H. (2018). The Role of microRNAs in Alzheimer's Disease and Their Therapeutic Potentials. *Genes*, 9 (4): 36 pp.
124. Lau P., Bossers K., Janky R., Salta E., Frigerio C. S., Barbash S., Rothman R., Sierksma A. S. R., Thathiah A., Greenberg D., Papadopoulou A. S., Achsel T., Ayoubi T., Soreq H., Verhaagen J., Swaab D. F., Aerts S. & De Strooper B. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO, Molecular Medicine*, 10: 1613 – 1634 pp.
125. Alexandrov P. N., Dua P. & Lukiw W. J. (2014). Up-Regulation of miRNA-146a in Progressive, Age-Related Inflammatory Neurodegenerative Disorders of the Human CNS. *Frontiers in Neurology*, 5 (181): 5 pp.
126. Sierksma A., Lu A., Salta E., Eynden E. V., Vegh Z. C., D'Hooge R., Blum D., Buée L., Fiers M. & De Strooper B. (2018). Deregulation of neuronal miRNAs induced by amyloid- β or TAU pathology. *Molecular Neurodegeneration*, 13 (54)
127. Scheppingen J., Mills J. D., Zimmer T. S., Broekaart D. W. M., Iory V., Bongaarts A., Anink J. J., Iyer A. M., Korotkov A., Jansen F. E., van Hecke W., Spliet W. G., van Rijen P. C., Baayen J. C., Vezzani A., van Vliet E. A. & Aronica E. (2018). mir147b: A novel key regulator of interleukin 1 beta-mediated inflammation in human astrocytes. *GLIA*, 66: 1082 – 1097 pp.
128. Aronica E., Fluiters K., Iyer A., Zurolo E., Vreikling J., van Vliet E. A., Baayen J. C. & Gorter J. A. (2010). Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *European Journal of Neuroscience*, 31: 1100 – 1107 pp.
129. Lukiw W. J., Zhao Y. & Cui J. G. (2008). An NF-kappaB-sensitive microRNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in

- stressed human brain cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (46): 31315 – 31322 pp.
130. Viveros-Bartolomé, J. M. (2019). “Evaluación de la susceptibilidad citotóxica en células derivadas de epitelio olfatorio de pacientes con Enfermedad de Alzheimer Familiar”. Tesis de Maestría, CINVESTAV, Unidad Zacatenco: 68 pp.
131. Besharat Z. M., Abballe L., Ciccornardi F., Bhtkar A., Grassi L., Le Pera L., Moretti M., Chinappi M., D’Andrea D., Mastronuzzi A., Ianari A., Vacca A., De Smaele E., Locatelli F., Po A., Miele E. & Ferreti E. (2018). Foxm1 controls a pro-stemness microRNA network in neural stem cells. *Scientific Reports*, (8): 3523.
132. Gong X., Zhang K., Wang Y., Wang J., Cui Y., Li S. & Lou Y. (2013). MicroRNA-130b targets Fmr1 and regulates embryonic neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439 (4): 493 – 500 pp.
133. Jönsson M. E., Wahlestedt J. N., Akerblom M., Kirkeby A., Malmevik J., Brattaas P. L., Jakobsson J. & Parmar M. (2015). Comprehensive analysis of microRNA expression in regionalized human neural progenitor cells reveals microRNA-10 as a caudalizing factor. *Development*, 142(18): 3166 – 3177 pp.
134. Letzen B. S., Liu C., Thakor N. V., Gearhart J. D., All A. H. & Kerr C. L. (2010). MicroRNA Expression Profiling of Oligodendrocyte Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, 5(5): e18480.
135. Huang M., Lou D., Cai Q., Chang X., Wang X. & Zhou Z. (2014). Characterization of Paraquat-Induced miRNA Profiling Response in hNPCs Undergoing Proliferation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10): 18422 – 18436 pp.
136. Kizil, C., Kyritsis N. & Brand M. (2015). Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO reports*, 16 (4): 416 – 426 pp.

137. Widera D., Mikenberg I., Elvers M., Kaltschmidt C. & Kaltschmidt B. (2006). Tumor necrosis factor α triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF- κ B signaling. *BMC Neuroscience*, 7 (64).

12. Anexos

Anexo 1. Genes blancos predichos para los miRNAs encontrados alterados en su expresión en las células precursoras neurales PSEN1 (A431). Se muestra en color rojo a aquellos transcritos que se sobre-expresan (↑) y en azul aquellos que se sub-expresan (↓). Los targets están ordenados de menor a mayor dependiente de las veces de cambio en su expresión. Está representado con un guion (-) la ausencia de miRNAs (↑ ◦ ↓) que podrían regular a distintos mRNA mostrados a continuación, predichos por miRecords o validados (TarBase y miRTarBase).

microRNAs		mRNA	Fold Change	p-value	q-value
↑	↓	↑↓			
-	miR-1178	BST2	-9.64	0.00030	0.0061538
miR-146a	-	IFIT3	-6.83	0.00002	0.0121290
miR-130b, miR-146a, miR-3142	miR-32, miR-4521	ANLN	-6.59	0.00060	0.0064000
miR-130b	-	TOP2A	-6.24	0.00010	0.0068571
miR-130b	miR-32	ASPM	-6.18	0.00060	0.0140800
miR-146a	-	IFI44L	-6.11	0.00800	0.0064000
miR-130b	miR-1178	CEP55	-5.67	0.00070	0.0151899
miR-146a	miR-4521	IFIT1	-5.64	0.00050	0.0156235
-	miR-32	KIF20A	-5.27	0.00210	0.0222545
-	miR-4521	DLGAP5	-4.97	0.00090	0.0068571
miR-130b, miR-3142	miR-1178, miR-4521	SULF1	-4.79	0.04990	0.0060000
miR-130b, miR-146a	-	HIST1H3B	-4.31	0.00250	0.0499000
-	miR-1178	MKI67	-4.31	0.00230	0.0255207
miR-146a	miR-32, miR-4521	KIF11	-4.3	0.00260	0.0140800
-	miR-4521	VCAM1	-4.22	0.00850	0.0068571
miR-130b, miR-147b	-	SCARA3	-4.17	0.00240	0.0257280
miR-146a	-	IFI44	-4.14	0.00540	0.0077576
miR-130b	miR-32, miR-4521	MTSS1	-4.02	0.01770	0.0344173

-	miR-4521	MELK	-3.99	0.00090	0.0102642
miR-130b	-	KIF14	-3.77	0.00450	0.0091915
miR-130b	-	PBK	-3.75	0.00170	0.0176495
miR-130b, miR-3142	miR-32, miR-1178, miR-4521	NRN1	-3.74	0.03890	0.0068571
miR-146a	miR-4521	BRIP1	-3.71	0.00110	0.0097255
miR-147b	-	PSG5	-3.69	0.00400	0.0161739
-	miR-32	CDK1	-3.64	0.00270	0.0060000
miR-146a	miR-32	SHCBP1	-3.54	0.00290	0.0065882
miR-146a	miR-4521	MBOAT1	-3.53	0.00070	0.0101538
-	miR-4521	TET1	-3.53	0.00660	0.0250256
miR-146a	miR-4521	PRC1	-3.52	0.00130	0.0405405
miR-146a	-	HIST1H3F	-3.52	0.00260	0.0275906
miR-146a, miR-3142	miR-4521	PM20D2	-3.5	0.04790	0.0327111
miR-146a	-	CDKN3	-3.45	0.00120	0.0244138
-	miR-32	PRR11	-3.36	0.00390	0.0363636
-	miR-1178	FAM111B	-3.32	0.01770	0.0214815
miR-3142	miR-32	DTL	-3.29	0.00690	0.0363636
miR-146a	-	MX2	-3.25	0.00280	0.0240708
miR-130b	miR-32	SKA3	-3.2	0.00390	0.0140800
-	miR-32, miR-1178	SYNE2	-3.18	0.00100	0.0060000
miR-130b	-	HERC6	-3.18	0.00640	0.0110345
miR-146a	-	ISG15	-3.17	0.01180	0.0176495
miR-130b	-	DTX3L	-3.15	0.00040	0.0068571
miR-130b	miR-4521	FOXO1	-3.04	0.00080	0.0344173
miR-130b	miR-4521	OAS2	-2.97	0.00560	0.0191373
miR-130b	-	ESCO2	-2.95	0.02860	0.0257280
-	miR-4521	TDRD1	-2.94	0.03460	0.0143377
miR-3142	miR-4521	CHRDL1	-2.92	0.00330	0.0485195
miR-146a	miR-1178	DAAM2	-2.89	0.03250	0.0061538
miR-130b, miR-146a	-	CCNA2	-2.81	0.00120	0.0327111

miR-130b, miR-146a	-	MYBL1	-2.8	0.00220	0.0061538
miR-130b, miR-146a	miR-32, miR-4521	CCNB1	-2.8	0.01980	0.0295573
miR-146a, miR-147b	miR-1178	TSPAN18	-2.79	0.04840	0.0252000
miR-3142	-	PARP12	-2.78	0.00590	0.0160000
-	miR-32	POLQ	-2.7	0.00310	0.0133731
miR-130b	miR-4521	SAMHD1	-2.69	0.01070	0.0336471
miR-146a, miR-3142	-	EPST11	-2.67	0.00560	0.0179200
-	miR-1178, miR-4521	MKX	-2.62	0.03740	0.0244138
-	miR-32	SPAG5	-2.61	0.00210	0.0252000
miR-130b	-	CLSPN	-2.6	0.02190	0.0156098
-	miR-32, miR-4521	TWIST1	-2.59	0.04860	0.0257280
-	miR-4521	LMNB1	-2.58	0.00430	0.0363636
miR-130b	miR-4521	RRM2	-2.57	0.04290	0.0068571
miR-130b, miR-146a	-	KIF2C	-2.55	0.00820	0.0287752
miR-130b	miR-4521	AMOT	-2.54	0.00470	0.0252000
miR-146a	-	KIF18A	-2.53	0.00250	0.0406980
miR-130b	miR-4521	CENPF	-2.52	0.00310	0.0322406
miR-3142	miR-4521	APOLD1	-2.51	0.00120	0.0090256
miR-146a	-	IFI6	-2.47	0.04670	0.0161739
miR-130b, miR-146a	-	DIAPH3	-2.45	0.01050	0.0339854
miR-146a	-	GBP3	-2.45	0.01880	0.0140800
miR-130b, miR-3142	miR-4521	PLSCR1	-2.42	0.00020	0.0233514
miR-3142	miR-1178	FANCD2	-2.42	0.00800	0.0202667
miR-130b	-	GPR63	-2.4	0.02680	0.0091915
miR-3142	miR-1178, miR-4521	TRIM14	-2.39	0.00120	0.0091915
-	miR-4521	CDCA2	-2.38	0.00340	0.0177778
miR-130b, miR-146a	miR-32, miR-4521	DEPDC1	-2.36	0.00400	0.0069333
miR-146a	-	MAP3K8	-2.36	0.00540	0.0132923
miR-146a	-	HIST1H2AI	-2.36	0.01620	0.0156098
-	miR-4521	SKA1	-2.34	0.00920	0.0485195

miR-146a	-	WISP1	-2.34	0.03240	0.0061538
miR-146a		NMI	-2.33	0.00270	0.0031840
miR-3142	-	GEN1	-2.31	0.03790	0.0405405
-	miR-32	PARP14	-2.3	0.00160	0.0129524
-	miR-1178, miR-4521	ARHGAP11A	-2.29	0.00630	0.0156235
miR-130b	miR-4521	HELLS	-2.29	0.02910	0.0186931
	miR-1178	GTSE1	-2.27	0.00930	0.0091915
miR-130b, miR-146a	miR-32, miR-1178, miR-4521	NRIP1	-2.27	0.02270	0.0118033
miR-146a, miR-3142		NLGN1	-2.25	0.00420	0.0091915
-	miR-4521	UBE2C	-2.25	0.00920	0.0090256
-	miR-1178	NCAPH	-2.24	0.00690	0.0207850
miR-130b		CCDC85A	-2.23	0.00630	0.0156235
miR-130b, miR-146a	-	IQGAP3	-2.23	0.00830	0.0114667
miR-146a	miR-32	NCAPG2	-2.21	0.00100	0.0257280
miR-3142	-	HIST1H2BI	-2.21	0.01330	0.0132923
miR-130b	-	SMC4	-2.2	0.00970	0.0065882
miR-130b, miR-3142	miR-4521	FGF11	-2.2	0.03250	0.0068571
miR-130b	miR-1178	IL1R1	-2.2	0.03750	0.0091915
miR-3142	miR-4521	PARPBP	-2.19	0.00660	0.0405405
miR-147b	-	EZR	-2.19	0.01120	0.0244138
miR-130b	miR-4521	FAM83D	-2.19	0.01890	0.0093333
miR-130b	-	C18orf54	-2.18	0.04990	0.0090256
miR-130b	miR-4521	CDC14B	-2.17	0.02990	0.0068571
miR-130b	-	DEK	-2.16	0.00030	0.0143377
-	miR-4521	COQ2	-2.16	0.01760	0.0113898
-	miR-32	FBXO5	-2.15	0.02010	0.0091915
-	miR-4521	CENPQ	-2.12	0.00030	0.0194175
miR-130b, miR-3142	miR-4521	TMPO	-2.12	0.00110	0.0283750
miR-146a	miR-4521	TIMELESS	-2.12	0.00770	0.0414933
miR-146a	-	DDX60	-2.1	0.00650	0.0133731

miR-146a, miR-3142	miR-4521	OASL	-2.1	0.02680	0.0322406
-	miR-4521	DNALI1	-2.1	0.02990	0.0110345
-	miR-32	WDR76	-2.09	0.01360	0.0138824
miR-146a	miR-1178	DDX58	-2.09	0.01690	0.0077576
-	miR-4521	LRIG3	-2.08	0.01970	0.0140800
miR-130b, miR-3142	miR-32	TCTEX1D1	-2.07	0.00020	0.0080000
miR-146a	miR-32	EIF2AK2	-2.07	0.00050	0.0403862
-	miR-32	GPSM2	-2.07	0.00220	0.0060000
-	miR-4521	KIF23	-2.06	0.01390	0.0492152
-	miR-32, miR-1178	HTR1F	-2.04	0.00130	0.0097255
miR-130b	-	USP13	-2.03	0.00150	0.0200000
miR-146a	miR-32	ZWILCH	-2.03	0.00870	0.0069333
-	miR-4521	CENPK	-2.03	0.00900	0.0110345
miR-147b, miR-3142	-	GABBR2	-2.03	0.02320	0.0110345
miR-130b	-	CMPK2	-2.03	0.02760	0.0240708
miR-146a	-	RSAD2	-2.02	0.00720	0.0454570
-	miR-4521	ATL1	2.04	0.00750	0.0147692
-	miR-4521	TMEM178B	2.05	0.00050	0.0176495
miR-130b, miR-146a	miR-1178	CDKN1A	2.05	0.01060	0.0177778
miR-130b, miR-146a, miR-147b, miR-3142	miR-32, miR-1178, miR-4521	BACH2	2.17	0.00830	0.0091915
miR-147b, miR-3142	miR-32	PPP1R3C	2.23	0.01300	0.0492152
miR-130b, miR-146a	miR-4521	PTGS2	2.25	0.01700	0.0166809
-	miR-4521	HSD17B6	2.3	0.01090	0.0094694
miR-146a, miR-3142	-	IL6	2.38	0.00510	0.0161739
miR-146a	-	CXCL8	2.38	0.03210	0.0110345
miR-146a	-	BCHE	2.46	0.01530	0.0166809
-	miR-32, miR-4521	DUSP4	2.5	0.02740	0.0090256
miR-3142	miR-1178	CYFIP2	2.63	0.01450	0.0499000
miR-147b	-	SCG5	2.69	0.04800	0.0068571
miR-130b, miR-146a	miR-32, miR-1178, miR-4521	DTNA	2.7	0.04630	0.0060000

miR-130b	miR-4521	ENPP4	2.73	0.02420	0.0384444
miR-130b	-	ENPP5	2.78	0.01890	0.0140800
-	miR-32	EPDR1	2.85	0.00880	0.0154000
miR-130b	-	SAT1	2.9	0.01100	0.0061538
miR-130b, miR-146a	miR-32, miR-1178, miR-4521	PCDH7	2.99	0.03660	0.0068571
-	miR-1178, miR-4521	CLIC2	3.01	0.03700	0.0053333
miR-130b	miR-32	ADAM23	3.22	0.00050	0.0068571
miR-130b, miR-3142		NRCAM	3.3	0.01250	0.0492152
miR-130b	-	SEL1L3	3.44	0.00980	0.0492152
miR-130b, miR-146a	miR-4521	CADPS	3.6	0.01930	0.0161739
-	miR-4521	PARM1	3.74	0.00390	0.0077419
-	miR-4521	CLCA2	4.85	0.01830	0.0158140
miR-3142	miR-4521	DPP4	5.42	0.02010	0.0205283
miR-130b, miR-146a, miR-3142	miR-32, miR-1178, miR-4521	CCND2	7.04	0.00160	0.0363636
miR-130b, miR-3142	miR-4521	DNER	7.82	0.01220	0.0160000

Anexo 2. Enfermedades asociadas a los genes blanco del perfil de miRNAs alterados en su expresión en la mutación PSEN1 (A431E). El porcentaje anotado es referente a los genes blancos de los miRNAs expresados diferencialmente (152) entre las células precursoras neurales A431E (PSEN1) y las controles. GAD (Genetic Association Database). La información fue obtenida con el background de genes del Homo sapiens. El valor q fue obtenido en Graph Prism v8.

Associated Disease	Genes	%	<i>p-value</i>	<i>q-value</i>
Cancer	54	35.3	0.0000053	0.0000265
Aging	17	11.1	0.017	0.0425
Renal	20	13.1	0.076	0.094
Neurological	35	22.9	0.094	0.094
Alzheimer's Disease	16	10.5	0.035	0.05833333

Aging	
Gen (Symbol)	Gen name
C18orf54	chromosome 18 open reading frame 54
CCNA2	cyclin A2
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
DPP4	dipeptidyl peptidase 4
FBXO5	F-box protein 5
FOXM1	forkhead box M1
GEN1	GEN1, Holliday junction 5' flap endonuclease
GTSE1	G2 and S-phase expressed 1
HIST1H2BI	histone cluster 1 H2B family member i
IL1R1	interleukin 1 receptor type 1
IL6	interleukin 6
IQGAP3	IQ motif containing GTPase activating protein 3
MKI67	marker of proliferation Ki-67
SMC4	structural maintenance of chromosomes 4
TOP2A	topoisomerase (DNA) II Alpha
TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1
ZWILCH	zwilch kinetochore protein

Neurological	
Gen (symbol)	Gen name
AMOT	Angiomotin

ASPM	abnormal spindle microtubule assembly
ATL1	atlastin GTPase 1
BACH2	BTB domain and CNC homolog 2
BCHE	Butyrylcholinesterase
C18orf54	chromosome 18 open reading frame 54
CADPS	calcium dependent secretion activator
CCND2	cyclin D2
CDK1	cyclin dependent kinase 1
CDKN3	cyclin dependent kinase inhibitor 3
CENPF	centromere protein F
CEP55	centrosomal protein 55
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
DIAPH3	diaphanous related formin 3
DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog
GABBR2	gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2
HTR1F	5-hydroxytryptamine receptor 1F
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1
IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IL1R1	interleukin 1 receptor type 1
IL6	interleukin 6
KIF11	kinesin family member 11
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
MKI67	marker of proliferation Ki-67
NLGN1	neuroligin 1
NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1
PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
PCDH7	protocadherin 7
PPP1R3C	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
SULF1	sulfatase 1
TDRD1	tudor domain containing 1
TET1	tet methylcytosine dioxygenase 1
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1

Alzheimer's Disease	
Gen (symbol)	Gen name
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8(CXCL8)
BCHE	butyrylcholinesterase(BCHE)
CEP55	centrosomal protein 55(CEP55)
CDK1	cyclin dependent kinase 1(CDK1)
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1(IFIT1)
IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3(IFIT3)
IL1R1	interleukin 1 receptor type 1(IL1R1)

IL6	interleukin 6(IL6)
KIF11	kinesin family member 11(KIF11)
MKI67	marker of proliferation Ki-67(MKI67)
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8(MAP3K8)
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2(PTGS2)
PPP1R3C	protein phosphatase 1 regulatory subunit 3C(PPP1R3C)
TET1	tet methylcytosine dioxygenase 1(TET1)
TDRD1	tudor domain containing 1(TDRD1)
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1(VCAM1)

Anexo 3. Procesos biológicos posiblemente alterados en las células precursoras neurales con la mutación en PSEN1 (A431E). El porcentaje anotado es referente a los genes blancos de los miRNAs expresados diferencialmente (152) entre las células precursoras neurales A431E (PSEN1) y las controles. La información fue obtenida con el background de genes del Homo sapiens. Solo se muestran aquellas vías cuyo valor q es <0.05 obtenido en Graph Prism v8.

Biological process	Genes	%	p-value	q-value
cell división	21	13.7	0.000000000002	0.000000001
mitotic nuclear división	18	11.8	0.000000000004	0.000000001
defense response to virus	15	9.8	0.000000000015	0.000000003
type I interferon signaling pathway	10	6.5	0.000000000360	0.000000060
negative regulation of viral genome replication	7	4.6	0.00000011	0.00001474
chromosome segregation	8	5.2	0.00000018	0.0000201
metaphase plate congression	4	2.6	0.00013	0.001244286
sister chromatid cohesion	7	4.6	0.00026	0.00201
mitotic metaphase plate congression	5	3.3	0.00027	0.00201
microtubule-based movement	6	3.9	0.00066	0.004422
regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	4	2.6	0.00096	0.005847273
G1/S transition of mitotic cell cycle	6	3.9	0.0019	0.009792308
mitotic cytokinesis	4	2.6	0.0019	0.009792308
response to interferon-alpha	3	2	0.0031	0.013846667
microtubule depolymerization	3	2	0.0031	0.013846667
DNA repair	8	5.2	0.0042	0.016947059
regulation of cell cycle	6	3.9	0.0043	0.016947059
protein heterotetramerization	4	2.6	0.0056	0.020844444
negative regulation of cell proliferation	10	6.5	0.0072	0.025389474
organ regeneration	4	2.6	0.0076	0.02546
spindle organization	3	2	0.0081	0.025842857
cellular response to DNA damage stimulus	7	4.6	0.0091	0.027713636
DNA replication	6	3.9	0.011	0.032043478
G2 DNA damage checkpoint	3	2	0.013	0.036291667
cell proliferation	9	5.9	0.014	0.03752
response to drug	8	5.2	0.016	0.038285714

DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest	4	2.6	0.016	0.038285714
regulation of transcription involved in G1/S transition of mitotic cell cycle	3	2	0.016	0.038285714
mitotic spindle elongation	2	1.3	0.017	0.039275862
hematopoietic progenitor cell differentiation	4	2.6	0.019	0.041064516
double-strand break repair	4	2.6	0.019	0.041064516
interferon-gamma-mediated signaling pathway	4	2.6	0.023	0.04669697
negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	4	2.6	0.023	0.04669697

Anexo 4. Las vías de los miRNAs en miembros afectados PSEN1 A431E anotados por KEGG a través de DIANA-miRPath v3.0 (<http://www.microna.gr/miRPathv3>). Los #genes muestran la cantidad de genes involucrados en cada vía; los #miRNAs muestra el número de miRNAs que podrían dirigirse a los genes involucrados en las vías. Los genes blancos fueron obtenidos de TarBase. Solo se muestran aquellas vías cuyo valor q es <0.05 obtenido en Graph Prism v8.

<i>KEGG pathway</i>	<i>p-value</i>	<i>q-value</i>	#genes	#miRNAs
Prion diseases	1.01 ⁻¹⁰	4.24 ⁻⁹	6	4
Fatty acid biosynthesis	3.22 ⁻⁹	6.76 ⁻⁸	2	2
Viral carcinogenesis	7.06 ⁻⁸	9.88 ⁻⁷	66	8
Cell cycle	3.10 ⁻⁵	3.26 ⁻⁴	48	8
TGF-beta signaling pathway	6.41 ⁻⁵	4.53 ⁻⁴	28	6
Adherens junction	7.55 ⁻⁵	4.53 ⁻⁴	29	7
Chronic myeloid leukemia	7.55 ⁻⁵	4.53 ⁻⁴	32	8
Lysine degradation	1.30 ⁻⁴	6.81 ⁻⁴	16	7
Endocytosis	1.46 ⁻⁴	6.81 ⁻⁴	59	7
Estrogen signaling pathway	1.66 ⁻⁴	6.97 ⁻⁴	31	7
Hepatitis B	3.49 ⁻⁴	1.33 ⁻³	44	8
Bacterial invasion of epithelial cells	3.89 ⁻⁴	1.36 ⁻³	28	8
Colorectal cancer	6.56 ⁻⁴	2.12 ⁻³	24	7
Pancreatic cancer	1.51 ⁻³	4.53 ⁻³	26	6
Hippo signaling pathway	1.85 ⁻³	5.18 ⁻³	44	8
HTLV-I infection	2.20 ⁻³	5.78 ⁻³	75	8
Proteoglycans in cancer	2.68 ⁻³	6.62 ⁻³	56	8
Gap junction	3.59 ⁻³	8.38 ⁻³	26	7
FoxO signaling pathway	4.46 ⁻³	9.86 ⁻³	45	8
Steroid biosynthesis	6.68 ⁻³	1.40 ⁻²	6	5
p53 signaling pathway	9.76 ⁻³	1.95 ⁻²	25	7
Oocyte meiosis	1.20 ⁻²	2.29 ⁻²	34	8
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	1.48 ⁻²	2.60 ⁻²	2	3
Regulation of actin cytoskeleton	1.50 ⁻²	2.60 ⁻²	58	7
Prostate cancer	1.62 ⁻²	2.60 ⁻²	30	8
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	1.75 ⁻²	2.60 ⁻²	21	6

Glioma	1.79 ⁻²	2.60 ⁻²	21	7
Protein processing in endoplasmic reticulum	1.87 ⁻²	2.60 ⁻²	48	8
Progesterone-mediated oocyte maturation	1.92 ⁻²	2.60 ⁻²	29	7
Thyroid cancer	1.92 ⁻²	2.60 ⁻²	11	7
Circadian rhythm	1.92 ⁻²	2.60 ⁻²	13	8
Pathways in cancer	2.38 ⁻²	3.10 ⁻²	95	8
Fatty acid metabolism	2.51 ⁻²	3.10 ⁻²	9	5
Thyroid hormone signaling pathway	2.51 ⁻²	3.10 ⁻²	35	8
Neurotrophin signaling pathway	2.58 ⁻²	3.10 ⁻²	35	7
Non-small cell lung cancer	2.83 ⁻²	3.30 ⁻²	19	7
2-Oxocarboxylic acid metabolism	3.28 ⁻²	3.65 ⁻²	5	4
Endometrial cancer	3.30 ⁻²	3.65 ⁻²	17	7
Huntington's disease	3.50 ⁻²	3.68 ⁻²	43	7
Small cell lung cancer	3.50 ⁻²	3.68 ⁻²	27	7
One carbon pool by folate	4.08 ⁻²	4.18 ⁻²	8	7
Shigellosis	4.40 ⁻²	4.40 ⁻²	20	7

Anexo 5. Vías metabólicas que podrían estar alteradas por la regulación de los genes blanco de los miRNAs, en las células precursoras neurales PSEN1 (A431E). El porcentaje anotado es referente a los genes blancos de los miRNAs expresados diferencialmente (152) entre las células precursoras neurales A431E (PSEN1) y las controles. La información fue obtenida con el background de genes del Homo sapiens. Solo se muestran aquellas vías cuyo valor q es <0.05 obtenido en Graph Prism v8.

KEGG Pathway	Genes	%	<i>p-value</i>	<i>q-value</i>
p53 signaling pathway	6	3.9	0.0001	0.002
Cell cycle	6	3.9	0.0023	0.017
Hepatitis C	6	3.9	0.0031	0.017
NF-kappa B signaling pathway	5	3.3	0.0041	0.017
Transcriptional misregulation in cancer	6	3.9	0.0082	0.027
Influenza A	6	3.9	0.0097	0.027
Herpes simplex infection	6	3.9	0.0120	0.029
Measles	5	3.3	0.0180	0.036
Viral carcinogénesis	6	3.9	0.0190	0.036
Hepatitis B	5	3.3	0.0230	0.039

REACTOME Pathway	Genes	%	<i>p-value</i>	<i>q-value</i>
R-HSA-909733 Interferon alpha/beta signaling	10	6.5	0.00000002	0.000001
R-HSA-2500257 Resolution of Sister Chromatid Cohesion	9	5.9	0.000031	0.000527
R-HSA-176408 Regulation of APC/C activators between G1/S and early anaphase.	5	3.3	0.000094	0.00085
R-HSA-2299718 Condensation of Prophase Chromosomes	7	4.6	0.0001	0.00085
R-HSA-2559582 Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)	8	5.2	0.00013	0.000884
R-HSA-2514853 Condensation of Prometaphase Chromosomes	4	2.6	0.00016	0.00090667
R-HSA-4419969 Depolymerisation of the Nuclear Lamina	4	2.6	0.00043	0.0019125
R-HSA-5663220 RHO GTPases Activate Formins	8	5.2	0.00045	0.0019125
R-HSA-68877 Mitotic Prometaphase	7	4.6	0.00081	0.00306
R-HSA-69273 Cyclin A/B1/B2 associated events during G2/M transition	4	2.6	0.0014	0.00463636
R-HSA-176417 Phosphorylation of Emi1	3	2	0.0015	0.00463636

R-HSA-2467813	Separation of Sister Chromatids	8	5.2	0.0028	0.00793333
R-HSA-983189	Kinesins	5	3.3	0.0039	0.0102
R-HSA-1169408	ISG15 antiviral mechanism	5	3.3	0.0066	0.01602857
R-HSA-156711	Polo-like kinase mediated events	3	2	0.011	0.02455556
R-HSA-877300	Interferon gamma signaling	5	3.3	0.013	0.02455556
R-HSA-69205	G1/S-Specific Transcription	3	2	0.013	0.02455556
R-HSA-113510	E2F mediated regulation of DNA replication	3	2	0.013	0.02455556
R-HSA-176412	Phosphorylation of the APC/C	3	2	0.016	0.02863158
R-HSA-5693607	Processing of DNA double-strand break ends	5	3.3	0.018	0.0306
R-HSA-174048	APC/C:Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	3	2	0.023	0.0372381
R-HSA-1538133	G0 and Early G1	3	2	0.027	0.04172727
R-HSA-170145	Phosphorylation of proteins involved in the G2/M transition by Cyclin A:Cdc2 complexes	2	1.3	0.03	0.04434783

BIOCARTA Pathway	Genes	%	<i>p-value</i>	<i>q-value</i>
Cyclins and Cell Cycle Regulation	4	2.6	0.0023	0.0069
Cells and Molecules involved in local acute inflammatory response	3	2	0.014	0.021
Cell Cycle	3	2	0.03	0.03

Anexo 6. Secuencia de los primers para la validación de los miRNAs por qPCR. Estos primers fueron diseñados con el programa miRPrimer. Fw: Forward, Rv: Reverse

<i>Primer</i>	Longitud (nt)	Secuencia
RNU6_Fw	23	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
RNU6_Rv	22	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
miR-130b-5p_Fw	18	ACTCTTCCCTGTTGCAC
miR-130b-5p_Rv	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGTAG
miR-4521_Fw	19	GCTAAGGAAGTCCTGTGCT
miR-4521_Rv	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCTGA
miR-3142_Fw	19	AGAAGGCCTTCTGAACCT
miR-3142_Rv	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCTGA
miR-147b-5p_Fw	20	CAGTGAAACATTTCTGCAC
miR-147b-5p_Rv	28	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAGTTTG
miR-146a-5p_Fw	20	GCAGTGAGAACTGAATCCA
miR-146a-5p_Rv	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACC
miR-32-5p_Fw	22	CGCAGTATTGCACACTACTAAG
miR-32-5p_Rv	25	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTGCAAC
miR-1178-3p_Fw	18	GCAGTTGCTCACTGTTCT
miR-1178-3p_Rv	26	CCAGTTTTTTTTTTTTTTCTAGGGA

Anexo 7. Los miRNAs que están alterados en su expresión en las células precursoras neurales PSEN1 (A431) podrían ser encontrados en otros tejidos y fluidos corporales. Expresión de los miRNAs que se encontraron alterados en las células precursoras derivadas de la cavidad nasal de individuos portadores de la mutación A431E (PSEN1) en diferentes tejidos humanos. Se muestran en rojo aquellos miRNAs que han sido reportados por la base de datos miRmine como los más abundantes en cada uno de los tejidos, los valores corresponden al Log2 de Reads Per Million (RPM),

miRNA	Promedio de todos los tejidos	Vejiga	Sangre	Cerebro	Mama	Hígado	Pulmón	Nasofaringe	Páncreas	Placenta	Plasma	Saliva	Semen	Suero	Esperma	Testículo
130b-5p	3.42	0.04	5.04	9.22	8.78	3.88	0.56	4.69	3.21	3.17	3.47	-	5.18	-	3.34	4.2
130b-3p	6.82	4.84	7.34	10.98	9.72	5.53	4.63	7.5	6.05	5.72	8.28	7.44	7.9	3.34	8.18	4.9
146a-5p	8.53	6.11	13.20	7.18	12.93	12.63	6.53	11.87	6.29	4.42	11.03	6.96	11.11	7.06	13.33	9.96
146a-3p	3.14	-	0.76	-	8.75	4.1	-	0.08	-	-	-	-	2.03	-	-	-
147b	3.69	-	-	0.45	7.85	1.71	-	2.89	2	3.1	-	-	5.86	-	3.59	5.79
32-5p	5.56	1.81	6.39	3.11	9.44	9.09	1.85	7.03	4.10	4.88	2.70	5.85	7.37	-	6.76	7.52
32-3p	2.46	-	2.73	1.03	7.3	2.71	0.31	1.88	-	3.3	-	-	2.30	-	0.07	2.97
4521	2.61	1.79	1.44	1.05	8.14	-	2.83	2.78	0.37	3.28	-	-	0.89	-	-	4.2
Promedio por tejido		2.91	5.27	4.71	9.12	5.66	2.78	4.84	3.67	3.98	6.37	6.75	5.33	5.2	5.88	5.64

