



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“La mutación A431E en PSEN1 causante de Enfermedad de Alzheimer  
Familiar altera el perfil proteómico de las células mesenquimales del  
epitelio olfatorio”**

**T E S I S**

Que presenta

**Lory Jhenifer Rochín Hernández**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

Director de la Tesis:

**Dr. Marco Antonio Meraz Ríos**

**Ciudad de México**

**Agosto, 2019.**

---

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, me gustaría agradecer a mi familia, como se los he dicho siempre; mis logros serán sus logros, ya que sin ustedes esto no sería posible.

A mis padres, Rodolfo y Gloria, quienes han sacrificado gran parte de su vida por educarnos y guiarnos, muchas gracias por todo, pero principalmente por su amor incondicional, soy muy afortunada de tenerlos como padres.

A mis hermanos, por ser un gran ejemplo para mí; Rody gracias por enseñarme a ser perseverante y luchar por tus objetivos. A Fany, mi persona favorita, gracias por existir y estar siempre a mi lado, si no hubiera sido por ti yo no habría intentado hacer la maestría, gracias por darme la fuerza y apoyo necesarios para lograrlo eres mi máximo orgullo y ejemplo, simplemente lo mejor de mi vida.

A mi director de tesis, el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por depositar su confianza en mí, por su apoyo, paciencia, tiempo y enseñanzas, pero sobre todo por motivarme a seguir adelante y a ser mejor cada día, ¡lo quiero mucho!

A la IBt. Lorena Ramírez Reyes y a él M. en C. Emmanuel Ríos Castro de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica (UGPM) del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales LaNSE) CINVESTAV por apoyo técnico, su asesoría y colaboración indispensables para poder llevar a cabo este proyecto, gracias Lore por todas tus enseñanzas y ayuda, espero seguir aprendiendo mucho de ti.

A mis asesores el Dr. Michael Schnoor y a el Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por su apoyo, observaciones y comentarios para mejorar este proyecto.

Al QFB Víctor H. Rosales García por su apoyo en citometría de flujo, y sobre todo por su amistad, por permitirme ser parte de su equipo de fútbol y hacerme reír siempre.

A la M. en C. Pilar Figueroa por su apoyo técnico, enseñanzas, consejos y pláticas, gracias por hacer del laboratorio un buen ambiente de trabajo.

A Julito por su apoyo, paciencia, disponibilidad y amistad en todo momento.

A la Mays mi hermanita de laboratorio, gracias por ser mi confidente y amiga en este camino, aprendí mucho de ti migaja, y espero sigamos aprendiendo y haciendo

---

locuras en el doctorado. A mis compañeros del laboratorio Rosa, Karla, Manu, Benja, Chicalote, Jorge, Memo, Migue y Fran. Así como a mis compañeros de otros laboratorios, que me apoyaron cuando las cosas no iban tan bien, que me enseñaron algunas técnicas y que me prestaron algunos reactivos y equipos; Iván, Paola, Rem, Raúl, Mike, Zu, Marce, y Charly.

Al mi tocayo el Sr. Fer y al Dr. Luis B. Cotera del departamento de Biotecnología por sus palabras de aliento, amistad y apoyo incondicional.

A todos mis amigos y personas del Cinvestav (Maru, chicos del tenis, del beis, del fútbol, los señores/señoritas. Polis etc.), que ayudaron a que esta experiencia fuera inolvidable, divertida y agradable.

Y, por último, pero no menos importante agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través de la beca.

¡Muchas gracias a todos!



*A mi familia con todo mi amor y respeto...*

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido.*

*Ahora es el momento para entender más, de modo que podamos temer menos.*



*Marie S. Curie*

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ii
<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	4
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	5
<b>ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS (NDD)</b> .....	5
<u>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)</u> .....	5
<u>Epidemiología e importancia</u> .....	5
<u>Características histopatológicas de la EA</u> .....	6
<u>Proteína Tau</u> .....	7
<u><math>\beta</math> Amiloide y procesamiento de APP</u> .....	8
<u>Complejo y secretasa (GS)</u> .....	9
<u>Estadios de Braak y disfunción olfatoria en EA</u> .....	10
<u>Diagnóstico y Tratamiento de la EA</u> .....	12
<u>Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer</u> .....	13
<u>ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR (EAF)</u> .....	14
<u>Proteína Precursora Amiloide (APP)</u> .....	15
<u>Presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2)</u> .....	15
<u>Mutación A431E en PSEN1</u> .....	16
<u>MECANISMOS PATOGENICOS INVOLUCRADOS EN EA</u> .....	18
<b>PROTEÓMICA</b> .....	19
<u>Tipos de estudios proteómicos</u> .....	20
<u>Estudios proteómicos cuantitativos</u> .....	20
<u>Estudios proteómicos con marcaje</u> .....	21
<u>Estudios proteómicos sin marcaje "label free"</u> .....	22
<b>FASES DE UN ESTUDIO PROTEÓMICO</b> .....	23
<u>FASE 1: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</u> .....	24
<u>FASE 2: SEPARACIÓN DE LA MUESTRA</u> .....	26

__ Electroforesis Bidimensional (2-DE) .....	26
__ Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS) .....	27
<b>_ FASE 3: ANALISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....</b>	<b>28</b>
__ Elementos de un Espectrómetro de masas .....	28
<b>_ FUENTE DE IONIZACIÓN .....</b>	<b>29</b>
__ MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) .....	29
__ ESI (Electrospray Ionization) .....	30
<b>_ ANALIZADORES DE MASAS .....</b>	<b>30</b>
__ Cuadrupólo (quadrupole, Q) .....	30
__ Trampa Iónica (ion trap, IT) .....	31
__ Tiempo de Vuelo (Time of Flight, TOF) .....	31
__ Orbitrap .....	31
<b>_ DETECTOR DE MASAS .....</b>	<b>31</b>
<b>_ FASE 4: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>32</b>
__ Huella peptídica (peptide mass fingerprint PMF) .....	32
__ Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) .....	32
<b>_ CONTROL DE CALIDAD EN ESTUDIOS PROTEÓMICOS TIPO “LABEL FREE” .....</b>	<b>33</b>
<b>CÉLULAS MESENQUIMALES .....</b>	<b>35</b>
__ Células ecto-mesenquimales de epitelio olfatorio (Ce-MEO / MSC-OE) .....	36
<b>2.ANTECEDENTES DIRECTOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>4.HIPÓTESIS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
__ Objetivo general .....	39
__ Objetivos Particulares .....	39
<b>6.MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
__ Modelo de estudio y estrategia experimental .....	40
__ Obtención y cultivo de las células ecto-mesenquimales precursoras neurales de epitelio olfatorio .....	42
__ Citometría de Flujo .....	42
__ Extracción de proteína .....	43
__ Cuantificación de proteínas .....	44
__ Gel de poliacrilamida y tinción de gel con azul de Coomassie .....	44

_Preparación de la muestra para Espectrometría de masas por el método FASP (Filter Aided Sample Preparation) .....	44
_Espectrometría de masas.....	45
_Análisis de los datos.....	46
_Análisis bioinformático.....	47
<b>7.RESULTADOS</b> .....	48
_Crecimiento de las células ecto-mesenquimales de individuos portadores de la mutación A431E en PSEN1 y sus controles. ....	48
_Verificación de la expresión de marcadores de células mesenquimales precursoras neurales. ....	49
Integridad de las proteínas extraídas .....	52
<b>_ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b> .....	53
<b>_ANÁLISIS DE MS DEL GRUPO SINTOMÁTICO</b> .....	53
_Control de calidad a nivel de péptidos .....	53
_Control de calidad a nivel de proteínas.....	55
_Proteínas diferencialmente expresadas en el portador sintomático .....	57
_Procesos biológicos involucrados con las proteínas diferencialmente expresadas en el portador sintomático.....	61
_Vías de señalización involucrados con las proteínas diferencialmente expresadas en el portador sintomático.....	63
<b>_ANÁLISIS DE MS DEL GRUPO PRESINTOMÁTICO</b> .....	66
_Control de calidad a nivel de péptidos .....	66
_Proteínas diferencialmente expresadas en la portadora presintomática .....	68
_Procesos biológicos involucrados con las proteínas diferencialmente expresadas en la portadora presintomática.....	73
_Vías de señalización involucrados con las proteínas diferencialmente expresadas en la portadora presintomática.....	74
<b>_COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE AMBOS GRUPOS</b> .....	79
<b>8.DISCUSIÓN E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	82
PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS .....	83
PROTEÍNAS ÚNICAS DE PORTADORES.....	94
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y PROCESOS BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS .....	98
BIOMARCADORES EN EA Y OTRAS ENFERMEDADES .....	107
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	109
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	110

<b>11. REFERENCIAS</b> .....	111
<b>12. ANEXOS</b> .....	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Placas amiloides y ovillos neurofibrilares.....	6
<b>Figura 2</b> Estructura de la proteína tau, su hiperfosforilación y desestabilización de los microtúbulos .....	7
<b>Figura 3</b> Vías del procesamiento de APP.....	9
<b>Figura 4</b> Componentes del complejo $\gamma$ -secretasa.....	10
<b>Figura 5</b> Evolución de la neurodegeneración en la EA y comparación con un cerebro sano. ....	11
<b>Figura 6</b> Nichos neurogénicos.....	12
<b>Figura 7</b> Secuencia de aminoácidos, topología y mutaciones en PSEN1 .....	17
<b>Figura 8</b> Mecanismos patológicos en EA .....	19
<b>Figura 9</b> Resumen de métodos proteómicos cuantitativos .....	21
<b>Figura 10</b> Estudios proteómicos de cuantificación relativa .....	23
<b>Figura 11</b> Fases de un estudio proteómico .....	24
<b>Figura 12</b> Ejemplo de Electroforesis en gel de dos dimensiones .....	27
<b>Figura 13</b> Elementos de Espectrometro de masas .....	29
<b>Figura 14</b> Criterios de Células Mesenquimales según la Asociación de Terapia Celular.....	35
<b>Figura 15</b> Estrategia Experimental del Proyecto .....	41
<b>Figura 16</b> Las células de epitelio olfatorio aisladas constituyen una población homogénea y expresan el perfil de marcadores de las células mesenquimales... ..	50
<b>Figura 17</b> Integridad de las proteínas evaluada en gel de poliacrilamida al 10%... ..	52
<b>Figura 18</b> Evaluación de calidad a nivel de péptidos del grupo Sintomático .....	54
<b>Figura 19</b> Evaluación de calidad a nivel de proteína del grupo Sintomático. ....	56
<b>Figura 20</b> Filtros para la selección de proteínas.....	56
<b>Figura 21</b> Gráfica de volcán de proteínas filtradas en el portador sintomático respecto a su control.....	58



<b>Figura 22</b> Componentes celulares de las proteínas alteradas en el portador Sintomático .....	61
<b>Figura 23</b> Procesos biológicos posiblemente alterados en el portador Sintomático .....	62
<b>Figura 24</b> Vías de señalización enriquecidas en el portador sintomático .....	64
<b>Figura 25</b> Evaluación de calidad a nivel de péptidos del grupo Presintomático ...	67
<b>Figura 26</b> Evaluación de calidad a nivel de péptidos del grupo Presintomático ...	68
<b>Figura 27</b> Gráfica de volcán de proteínas filtradas en el portador presintomático respecto a su control.....	70
<b>Figura 28</b> Porcentaje de proteínas alteradas en los portadores de la mutación A431E .....	72
<b>Figura 29</b> Componentes celulares de proteínas alteradas en el portador presintomático.....	73
<b>Figura 30</b> Procesos biológicos alterados (enriquecidos) en el portador presintomático.....	74
<b>Figura 31</b> Vías de señalización alteradas en el portador presintomático .....	75
<b>Figura 32</b> Vía de procesamiento de proteínas en RE.....	77
<b>Figura 33</b> Vía de regulación del citoesqueleto de actina y sus proteínas alteradas en la tabla .....	78
<b>Figura 34</b> Vía de señalización de endocitosis y algunas proteínas alteradas en la tabla .....	79
<b>Figura 35</b> Diagrama de Venn de proteínas alteradas compartidas en ambos grupos. ....	80
<b>Figura 36</b> Procesos involucrados en las 54 proteínas compartidas entre grupos	80
<b>Figura 37</b> Proteínas reportadas involucradas en otras enfermedades .....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Características generales de EAIT y EAIP .....	14
<b>Tabla 2</b> Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo y sus características .....	43

<b>Tabla 3</b> Información de los individuos de donde se obtuvieron las células empleadas en este estudio. ....	48
<b>Tabla 4</b> Top 15 de proteínas sub-expresadas en Grupo Sintomático.....	59
<b>Tabla 5</b> Top 15 de proteínas sobre-expresadas en Grupo Sintomático.....	59
<b>Tabla 6</b> Proteínas únicas del grupo Sintomático.....	60
<b>Tabla 7</b> Vías de señalización en común entre las diferentes bases de datos mediante software webgestalt.....	65
<b>Tabla 8</b> Proteínas únicas del grupo Presintomático.....	69
<b>Tabla 9</b> Top 15 de proteínas sobre-expresadas en el grupo presintomático .....	71
<b>Tabla 10</b> Top 15 de proteínas subreguladas en el grupo presintomático .....	71
<b>Tabla 11</b> Proteínas alteradas en la vía de procesamiento de proteínas en RE ....	76

## ABREVIATURAS

<b>2- DE</b>	<b>Electroforesis Bidimensional</b>	<b>EAE</b>	Enfermedad de Alzheimer Esporádico (SAD)
<b>ADAM10</b>	Alfa Secretasa	<b>EAF</b>	Enfermedad de Alzheimer Familiar (FAD)
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico	<b>EAIP</b>	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Precoz (EAO)
<b>APH-1</b>	Proteína defectuosa de faringe Anterior 1	<b>EAIT</b>	Enfermedad de Alzheimer de Inicio Tardío (LOAD)
<b>APP</b>	Proteína Precursora Amiloide	<b>EH</b>	Enfermedad de Huntington (HD)
<b>AQUA</b>	Absolute Protein quantification	<b>ELA</b>	Esclerosis Lateral Amiotrófica
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico	<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson (PD)
<b>BACE1</b>	Beta Secretasa	<b>ESI</b>	Ionización por Electrospray
<b>BO</b>	Bulbo olfatorio	<b>FASP</b>	Filter Added Sample Preparation
<b>Ce-MEO</b>	Células ectomesenquimales de Epitelio Olfatorio (MSC-OE)	<b>FC</b>	Fold Change (veces de Cambio)
<b>CTF</b>	Fragmento/extremo carboxilo terminal		
<b>DTT</b>	Ditiotreitol		
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer (AD)		

<b>FDR</b>	False Discovery Rate	<b>NTF</b>	Fragmento/extremo Amino terminal
<b>GO</b>	Gene Ontology	<b>OS</b>	Estrés Oxidativo
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	<b>PANTHER</b>	Protein Analysis Through Evolutionary Relationships database
<b>ICAT</b>	Isotope-Coded Affinity Tag	<b>PEN-2</b>	Proteína Potenciadora de Presenilina 2
<b>iTRAQ</b>	Isotope Tag for Relative and Absolute Quantification	<b>PPP</b>	Vía de las pentosas Fosfato
<b>KEGG</b>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	<b>PSEN1</b>	Presenilina 1
<b>LC</b>	Cromatografía Líquida	<b>PSEN2</b>	Presenilina 2
<b>LC-MS</b>	Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas	<b>PTM</b>	Modificaciones Postraduccionales
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquídeo (CSF)	<b>RD</b>	Rango Dinámico
<b>m/z</b>	Relación masa/carga	<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>MALDI</b>	Desorción/Ionización asistida por láser en matriz	<b>RIP</b>	Proteólisis Intramembranal Regulada
<b>MRM/SRM</b>	Multiple-reaction monitoring/selected reaction monitoring	<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>MS</b>	Espectrometría de Masas	<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de Sodio
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de Masas en Tándem	<b>SILAC</b>	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
<b>MSC</b>	Células Mesenquimales	<b>SILAM</b>	Stable isotope labeling of mammals
<b>MVBs</b>	Multivesicular Bodies	<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response
<b>NCT</b>	Nicastrina	<b>UPS</b>	Ubiquitin Proteasome System
<b>NDD</b>	Enfermedades neurodegenerativas	<b>Webgestalt</b>	WEB-based GENE SeT AnaLYsis Toolkit
<b>NPCs</b>	Células Precursoras Neurales	<b>ZSG</b>	Zona Subgranular
		<b>ZSV</b>	Zona subventricular
		<b>βA</b>	Beta Amiloide

## RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente a nivel mundial, comprende el 80% de los casos de demencia. A pesar de los múltiples estudios, no tiene tratamiento curativo y su diagnóstico definitivo se realiza postmortem.

Recientemente la neuroproteómica cuantitativa ha sido empleada para su estudio, ya sea para identificar biomarcadores y objetivos terapéuticos, como para comprender más a fondo los mecanismos que se encuentran alterados en la enfermedad. Muchos de estos mecanismos han sido descubiertos usando modelos transgénicos con mutaciones en los 3 genes principales causantes de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) los cuales son Presenilina 1 (PSEN1), Presenilina 2 (PSEN2) y la Proteína Precursora Amiloide (APP), o por medio de estudios con tejidos cerebrales y fluidos corporales de pacientes afectados. Estos estudios han sido muy útiles para identificar posibles marcadores de la enfermedad, desafortunadamente presentan diversas limitantes; como podría ser la presencia de proteínas abundantes en fluidos corporales que pudieran enmascarar a las moléculas importantes. Por otro lado, la heterogeneidad celular en el cerebro pudiera dificultar el análisis y la comprensión de los resultados, al no saber qué células son las causantes de la alteración en la expresión de las moléculas. Por lo anterior, estudios proteómicos cuantitativos de un solo tipo celular, pueden ayudar a evaluar su aporte directo en la fisiología celular y su posible efecto en la fisiopatología de la enfermedad, los pocos estudios realizados de este tipo han sido evaluados en neuronas y células diferenciadas.

Existe una mutación en PSEN1 de esencial interés para nosotros, debido a que es específica de México ya que se ha sugerido un efecto fundador en el estado de Jalisco, la cual está ubicada en la posición 431 de PSEN1 y corresponde a una sustitución de una Alanina por un Ácido Glutámico en la posición 431 de la proteína (A431E). Hasta la fecha existe un solo estudio proteómico de pacientes con esta mutación y fue realizado en líquido cefalorraquídeo (LCR) en el año 2012 (Ringman, 2012).

---

El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de esta mutación A431E en el proteoma de células precursoras neurales de epitelio olfatorio provenientes de 2 individuos portadores de la mutación: uno sintomático (con claros signos de la enfermedad) y otro presintomático (con signos leves de la enfermedad) comparándolos con individuos sanos a través de dos estudios proteómicos cuantitativos tipo “label free”.

El análisis mostró que en el proteoma del portador sintomático se identificaron 499 proteínas alteradas en su expresión con respecto a su control (191 sobre-expresadas y 308 sub-expresadas), las cuales están involucradas en procesos biológicos como procesamiento y plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (RE), procesos en donde participan los microtúbulos y en el transporte vesicular. Por otro lado, se identificaron en el portador presintomático con respecto a su control 257 proteínas alteradas en su expresión (106 sobre-expresadas y 151 sub-expresadas), las cuales están involucradas en procesos como endocitosis, metabolismo energético, transporte vesicular y regulación del citoesqueleto de actina. Algunas de estas proteínas ya han sido reportadas anteriormente con alteraciones en la EA.

Además, se encontraron proteínas que han sido identificadas como biomarcadores en otras enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes como son: la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, y otras enfermedades como paraplejías espásticas hereditarias y distrofias musculares.

Este estudio es el primer estudio proteómico cuantitativo realizado en células precursoras de epitelio olfatorio, cuyos resultados sugieren que existe una alteración en la fisiología celular desde estirpes indiferenciadas (precursores neurales), que pueden contribuir a la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer Familiar contribuyendo a la acumulación y transporte de proteínas mal plegadas en estadios avanzados de la enfermedad y alteraciones en el metabolismo energético y endocitosis en estadios presintomáticos de la enfermedad.

---

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease worldwide, comprising 80% of cases of dementia. Despite the multiple studies, it has no curative treatment and its definitive diagnosis is under postmortem analysis.

Recently, quantitative neuroproteomics techniques has been use in order to study and identify new biomarkers and therapeutic targets, in addition to better understand the mechanisms responsible for the disease. Many of these mechanisms have been elucidated base in the use of transgenic models with mutations in the 3 main genes that cause familial Alzheimer's disease (EAF), which are Presenilin 1 (PSEN1), Presenilin 2 (PSEN2) and Amyloid Precursor Protein (APP), or through studies with brain tissues and body fluids of patients. However, these studies have their limitations; as the depletion of abundant proteins in body fluids, which could mask the alteration in relevant molecules, other problem could be the cellular heterogeneity in the brain, which hinders the analysis and understanding of the results. Therefore, quantitative proteomic studies of a single cell type can help assess their direct contribution to cellular physiology and its possible effect on the pathophysiology of the disease. The few studies carried out of this type have been evaluated in neurons and differentiated cells.

There is a mutation in PSEN1 of particular interest to us because it is specific to Mexico and its founding effect has been suggested in the state of Jalisco, which is located at position 431 of the protein PSEN1 and corresponds to a substitution of an Alanine for an Acid Glutamic (A431E). To date there is only one proteomic study of patients with this mutation and it was performed in CSF in 2012.

The objective of this project was to evaluate the effect of this A431E mutation in the proteome of olfactory epithelial neural precursor cells from 2 carriers of the mutation: one symptomatic and the other presymptomatic, comparing them with healthy individuals through two quantitative proteomic "label free" studies.

In the proteome of the symptomatic carrier we identified 499 proteins altered in their expression with respect to their control (191 over-expressed and 308 under-

---

expressed), which are involved in biological processes such as processing and folding proteins in ER, microtubule-based processes and in the vesicular transport. On the other hand, 257 proteins altered in their expression (106 overexpressed and 151 under-expressed) were identified in the presymptomatic carrier with respect to their control, which are involved in processes such as endocytosis, energy metabolism, vesicular transport and regulation of the actin cytoskeleton. Some of these proteins previously have been reported in EA.

In addition, proteins that have been identified as biomarkers in other neurodegenerative and demyelinating diseases such as Parkinson's disease, Huntington's disease and other diseases such as hereditary spastic paraplegia and muscular dystrophies were found.

The present study is the first quantitative proteomic study performed on olfactory epithelial precursor cells. Our results suggest that there is an alteration in cell physiology from undifferentiated precursor's cells that may contribute to the pathophysiology of familial Alzheimer's disease by contributing to the accumulation and transport of misfolded proteins, in advanced stages of the disease and alterations in energy metabolism and endocytosis in presymptomatic stages of the disease.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### **ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS (NDD)**

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de condiciones hereditarias o esporádicas caracterizadas por una disfunción progresiva del sistema nervioso que conlleva a una pérdida neuronal e irreversible de diferentes zonas del cerebro. A pesar de las diferencias clínicas significativas que existen entre estas enfermedades, muchos estudios han demostrado mecanismos fisiopatológicos y moleculares comunes, como son: la neuroinflamación, la excitotoxicidad, la activación microglial, así como la disfunción neuronal y sináptica (Kovacs & Budka, 2010), lo cual sugiere que la neurodegeneración es un proceso complejo que involucra diferentes mecanismos fisiopatogénicos que convergen, a pesar de la etiología de la enfermedad (Ahmad et al., 2017). Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran, la Enfermedad de Alzheimer (EA o AD por sus siglas en inglés) la cual es la más frecuente, la enfermedad de Parkinson (EP), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington (EH), entre otras (W.-W. Chen, Zhang, & Huang, 2016).

### **ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo crónico, descrito por primera vez por el Dr. Alois Alzheimer en 1907. Su principal característica es el deterioro progresivo de las funciones mentales y cognitivas. Algunos de los síntomas son: pérdida de la memoria, alteraciones del lenguaje y del pensamiento abstracto, desorientación en lugar, tiempo y persona, cambios en el estado de ánimo, de la conducta y de la personalidad, que finalmente conllevan a una demencia clara, así como a una dependencia e incapacidad para realizar las actividades básicas de la vida diaria (McKhann et al., 2011; Silberberg, 2011).

### **Epidemiología e importancia**

La EA es la causa más común de demencia a nivel mundial, abarca más del 80% de todos los casos de demencia (World Alzheimer Report 2016). A medida que la población de adultos mayores va en aumento, la prevalencia de la EA ha aumentado

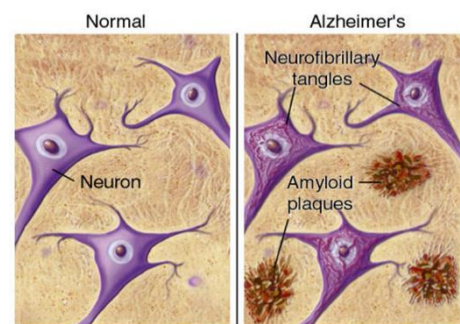


notablemente en todo el mundo, convirtiéndose en una de las principales causas de discapacidad y muerte entre las personas mayores, de hecho, actualmente esta enfermedad es considerada un problema prioritario de salud pública, ya que, debido a la transición demográfica con tendencia a la vejez, se estima que tendrá un severo impacto en los sistemas económicos, sociales y de salud a nivel mundial.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen 47.5 millones de personas que viven con demencia (0.6% de la población total), de los cuales más de 30 millones tienen demencia tipo Alzheimer y de estos, 860,000 casos se encuentran en México (Parra et al., 2018). El número total de personas con demencia se proyecta en 75.6 millones para el año 2030 y casi se triplicará a 135.5 millones para el año 2050 La Asociación de Alzheimer en el reporte mundial de Alzheimer 2014, refiere que el 11% de las personas mayores a 65 años padecen EA y el valor sube a 32%, en las personas mayores a 85 años (Prince et al., 2013).

### Características histopatológicas de la EA

Histopatológicamente, la EA se caracteriza por depósitos extracelulares de oligómeros del péptido beta amiloide ( $\beta$ A), denominados placas neuríticas. Así como agregados intracelulares de proteína Tau, que reciben el nombre de ovillos o marañas neurofibrilares, constituidos por estructuras filamentosas de la proteína tau hiperfosforilada y truncada, los cuales se asocian más con el daño cognitivo presente en estos



**Figura 1 Placas amiloides y ovillos neurofibrilares**

pacientes **(figura 1)**. Estos depósitos generan toxicidad y muerte neuronal mediante diversos mecanismos, con una consecuente atrofia irreversible de zonas específicas del cerebro, como son el hipocampo y la corteza entorrinal, encargadas de la memoria y las funciones cognitivas. Aunque las causas que generan la EA aún no han sido dilucidadas totalmente, debido a su complejidad, estas dos proteínas y los agregados que forman juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, a lo largo del tiempo han surgido varias hipótesis que

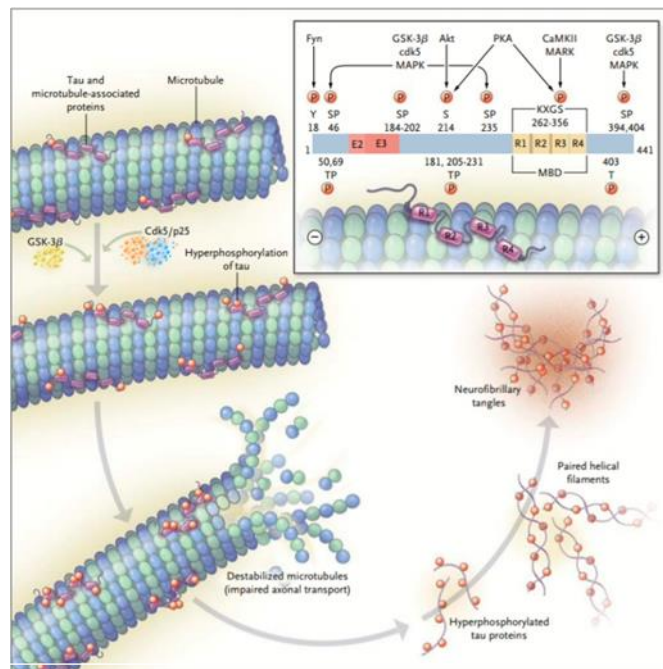
tratan de explicar el origen y causa de la enfermedad de Alzheimer (Nisbet & Götz, 2018).

## Proteína Tau

La proteína Tau es una fosfoproteína que proporciona integridad a los microtúbulos, lo cual es crítico para el crecimiento neuronal, ya que ayuda a los microtúbulos a anclarse con otros filamentos del citoesqueleto y orgánulos para soporte estructural. La hiperfosforilación de esta proteína afecta su metabolismo y capacidad de unión a los microtúbulos, desencadenando una desestabilización que conlleva la formación de agregados de esta proteína (**figura 2**), lo cual induce daño y muerte neuronal. Estos agregados preceden a la formación de las placas amiloides.

Los microtúbulos participan en el transporte de vesículas, de nutrientes, de neurotransmisores y otras sustancias a través de los axones (Grundke-Iqbal et al., 1986; Spillantini & Goedert, 2013). La función de la proteína Tau es ayudar en la polimerización de la tubulina, para formar los microtúbulos, a través de su dominio de unión a microtúbulos. Cuando la proteína tau se hiperfosforila, se separa de los microtúbulos, los cuales se desestabilizan y despolimerizan. La proteína tau hiperfosforilada

libre, tiene la capacidad de asociarse con ella misma para formar los filamentos helicoidales apareados, los cuales conformarán posteriormente a los ovillos neurofibrilares (Querfurth & LaFerla, 2010) (**figura 2**).



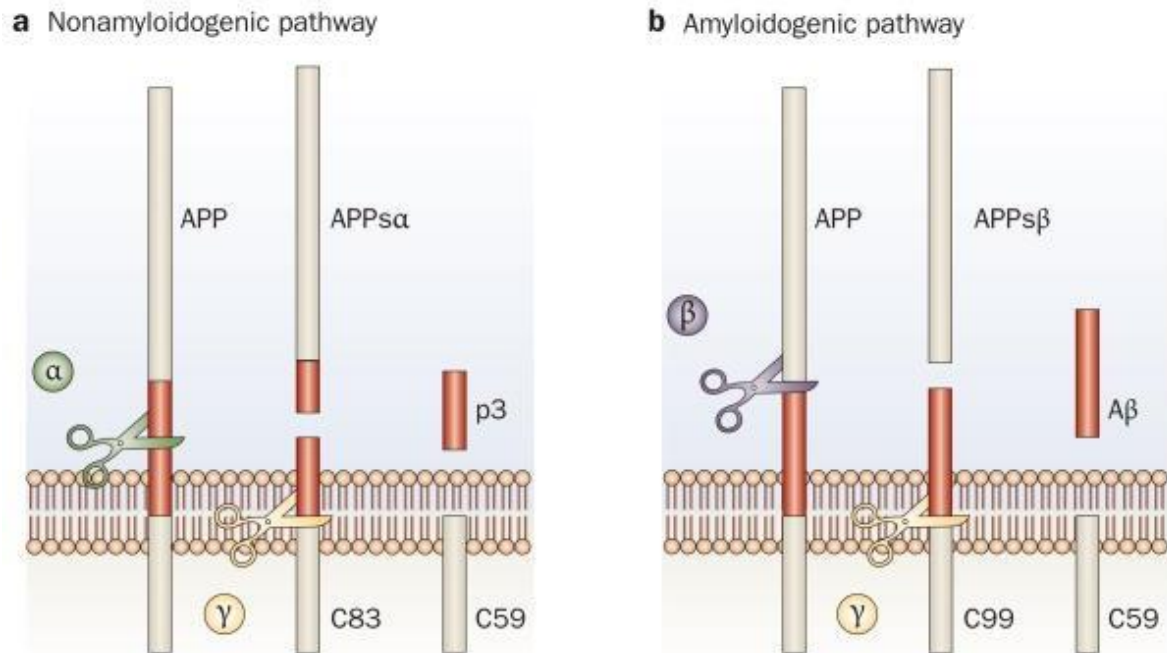
**Figura 2 Estructura de la proteína tau, su hiperfosforilación y desestabilización de los microtúbulos**

---

## **$\beta$ Amiloide y procesamiento de APP**

El péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), surge a partir del procesamiento proteolítico de la Proteína Precursora Amiloide (APP), a través de “la vía amiloidogénica” (Hardy & Selkoe, 2002).

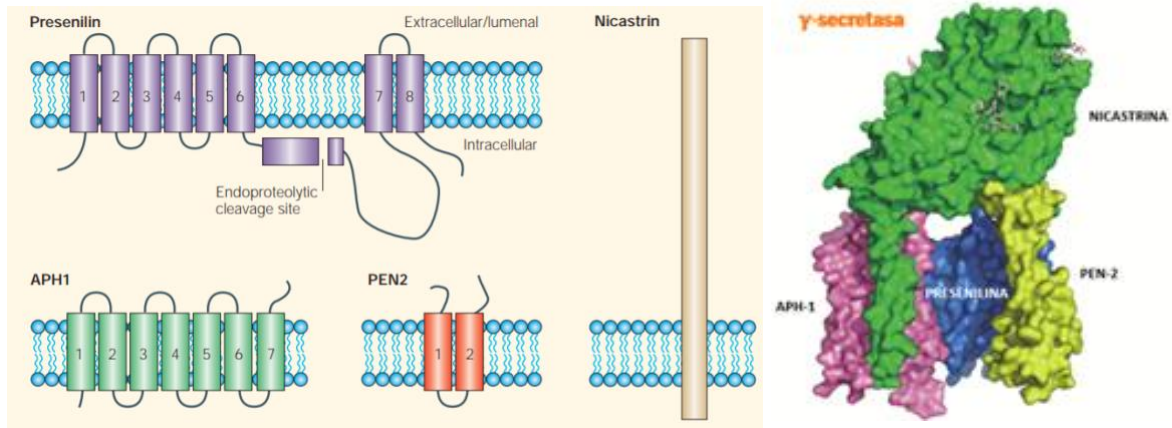
El procesamiento de APP se lleva a cabo por 3 enzimas: la  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa, y se reconocen dos vías principales: una vía “no amiloidogénica”, en donde el primer corte de APP lo realiza la enzima  $\alpha$ -secretasa (ADAM10) y escinde a APP, liberando un fragmento soluble  $\alpha$ -APPs no amiloidogénico y otro fragmento conocido como C83, sobre el cual actuará la  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a un fragmento conocido como p3 y a un péptido llamado dominio intracelular de la APP (AICD) (**figura 3 izquierda**). El péptido  $\beta$ A se origina en un proceso conocido como “la vía amiloidogénica”, en donde la proteína APP es procesada en una secretasa diferente, la  $\beta$ -secretasa (BACE1), dando como resultado un fragmento conocido como sAPP $\beta$  (fragmento soluble del dominio N-terminal) y el fragmento carboxilo terminal C99 (dominio C-terminal) el cual, sigue unido a la membrana y será procesado por el complejo enzimático de la  $\gamma$ -secretasa, generando al AICD y al péptido  $\beta$ A, cuyo tamaño es variable y va de 38-42 aminoácidos (**figura 3 derecha**), el péptido de 42 aminoácidos tiende a formar oligómeros, agregados y placas seniles (Finder & Glockshuber, 2007). Los péptidos  $\beta$ A40 y  $\beta$ A42, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, son los péptidos más abundantes. En personas sanas  $\beta$ A40 está en una proporción de 10:1 con respecto a  $\beta$ A42, sin embargo, en personas con EA la relación  $A\beta$ 40/ $A\beta$ 42 se invierte (1:10), ya que el  $\beta$ A42 tiene una mayor capacidad de agregación, de forma tal que hay 100 veces más  $A\beta$ 42 que  $A\beta$ 40, con respecto a los individuos normales. (Thal, 2015; Thal, Rüb, Orantes, & Braak, 2002)



**Figura 3 Vías del procesamiento de APP:** Vía no amiloidogénica a la izquierda y vía amiloidogénica a la derecha.

### Complejo $\gamma$ y secretasa (GS)

La  $\gamma$ -secretasa es una I-CLiPs (intramembranously-cleaving proteases) aspartil proteasa, encargada del segundo corte en el procesamiento de APP, este complejo de 250 kDa está conformado por 4 proteínas (**figura 4**): las más importantes son las 2 presenilinas (PSEN1 y PSEN2) que conforman el sitio catalítico del complejo, estas se procesan de manera endoproteolítica en el Retículo Endoplásmico, para formar heterodímeros estables que consisten en un fragmento amino (N) y otro carboxilo (C) terminal (NTF y CTF respectivamente), las otras tres proteínas ayudan a estructurar y estabilizar al complejo enzimático maduro; la Nicastrina (NCT) se sabe que participa en reconocimiento y soporte del sustrato (Haapasalo & Kovacs, 2011) y regula el tráfico intracelular de varias proteínas (Y. Zhang et al., 2005), la proteína PEN-2 (potenciador de Presenilina 2) ayuda a estabilizar el complejo después de la endoproteólisis de la presenilina (De Strooper, 2003; N. Watanabe et al., 2005) y finalmente, APH-1 (Anterior Pharynx-defective 1), ayuda a la conformación del complejo  $\gamma$ -secretasa.



**Figura 4 Componentes del complejo  $\gamma$ -secretasa** (Bai et al., 2015)

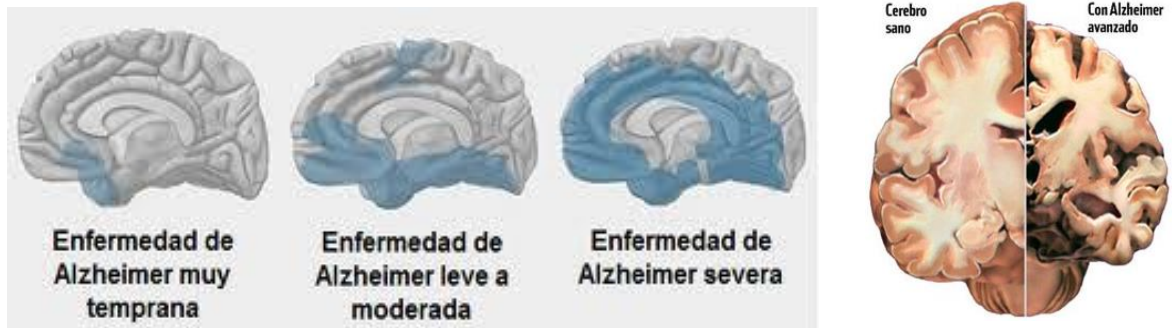
El complejo  $\gamma$ -secretasa se ensambla primero en el retículo endoplásmico, con NCT y APH-1 unidos, formando el andamio inicial, de modo que la PSEN de longitud completa se pueda unir, posteriormente, PEN2 se asocia al complejo y provoca la endoproteólisis de la PSEN para dar lugar a los fragmentos N-terminal (NTF) y C-terminal (CTF). Posteriormente, el complejo activo se transporta al Golgi, donde es glicosilado y termina su proceso de activación (Takasugi et al., 2003).

La  $\gamma$ -secretasa aparte de procesar a la proteína APP, es la responsable de procesar a otros 90 sustratos diferentes, por lo que su alteración puede estar involucrada en muchos procesos y vías de gran importancia (Haapasalo & Kovacs, 2011). La mayoría de los sustratos que procesa la  $\gamma$ -secretasa tienen características en común, son proteínas transmembranales de tipo 1 y parecen funcionar como proteínas de señalización, por lo que la estabilidad de la  $\gamma$ -secretasa es crucial para el mantenimiento y la proliferación de las células progenitoras y la determinación del destino celular, la adhesión, la migración, el crecimiento de neuritas, la guía de los axones o la formación y mantenimiento de sinapsis (Carroll & Li, 2016).

### **Estadios de Braak y disfunción olfatoria en EA**

En 1991 los neuroanatomistas Braak y Braak, propusieron un modelo de neuropatología para la EA. Dividieron la enfermedad en 6 estadios patológicos sucesivos. En los 2 primeros estadios establecieron que existe una afectación

selectiva de la corteza transentorrinal, donde clínicamente los pacientes son asintomáticos; los estadios 3 y 4 se caracterizan por una extensión al resto del sistema límbico e hipocampo en el cual ya existe un deterioro cognitivo leve a moderado, mientras que los 2 últimos estadios corresponden con la afectación más difusa de la neocorteza, afectando los lóbulos temporales, parietales y frontal, traduciéndose clínicamente en una demencia (Braak & Braak, 1997) **(Figura 5)**.

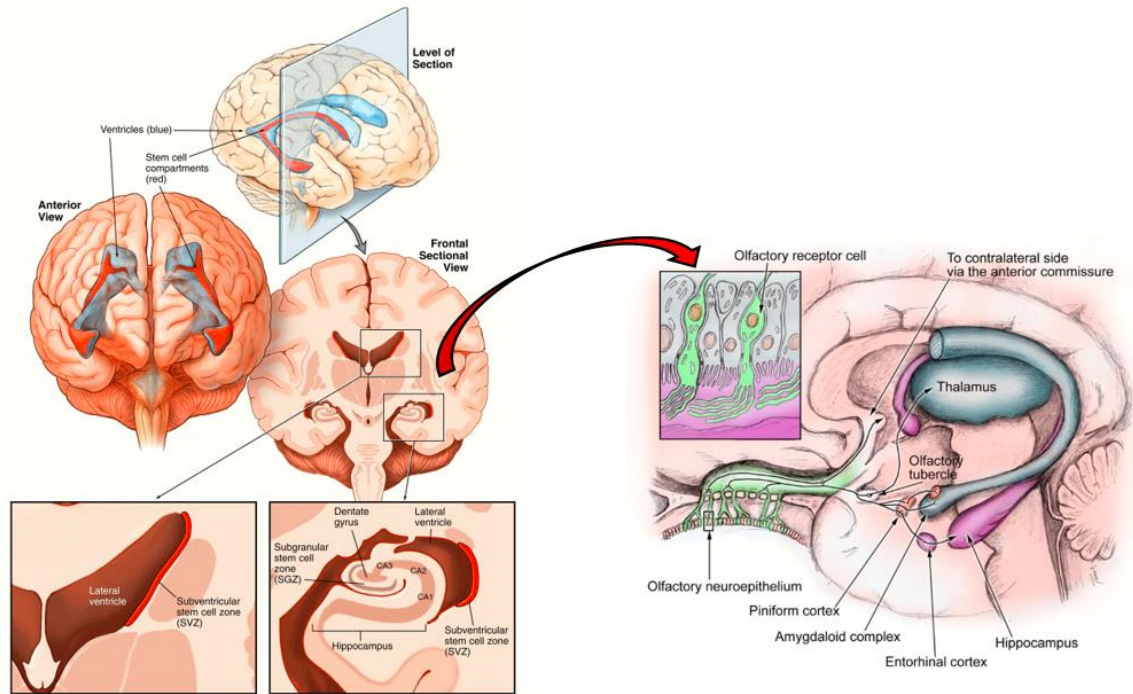


**Figura 5 Evolución de la neurodegeneración en la EA y comparación con un cerebro sano.**

Además, los pacientes con EA y otras enfermedades neurodegenerativas como Enfermedad de Parkinson, presentan en estadios tempranos de la enfermedad una disfunción olfatoria progresiva, que comienza con una hiposmia o disminución del olfato hasta llegar a la anosmia o pérdida irreversible del olfato (Ruan, Zheng, Zhang, Zhu, & Zhu, 2012; Zou, Lu, Liu, Zhang, & Zhou, 2016), y se ha visto que esta disfunción está relacionada con la severidad y progresión de la enfermedad, ya que diferentes estudios la han correlacionado con los estadios de Braak (Attems, Walker, & Jellinger, 2014), así como con los niveles de la proteína tau en bulbo olfatorio, las alteraciones estructurales y con el grado de deterioro cognitivo, por lo que esta disfunción olfatoria, ha sido sugerida como un marcador clínico de la EA (Lian et al., 2019).

La afectación en el hipocampo y la disfunción olfatoria en estadios tempranos sugieren que la neurogénesis pueda estar afectada, y ello pueda ser clave en la progresión de la enfermedad (Maruszak & Thuret, 2014), ya que anatómicamente existen dos nichos neurogénicos en el cerebro del humano **(figura 6)**, donde hay

células precursoras neurales; la zona Subgranular (ZSG) en el hipocampo, y la zona Subventricular (ZSV), la cual mantiene una estrecha comunicación con el bulbo olfatorio y por ende con el epitelio olfatorio (De La Rosa-Prieto et al., 2015; Zarco, Norton, Quiñones-Hinojosa, & Guerrero-Cázares, 2019).



**Figura 6 Nichos neurogénicos:** A la izquierda se observan los 2 nichos neurogénicos del cerebro, la zona subventricular (ZSV) y la zona Subgranular (ZSG) y a la derecha la relación entre la ZSV en hipocampo y el bulbo y neuroepitelio olfatorio.

### Diagnóstico y Tratamiento de la EA.

Normalmente, el diagnóstico de EA se realiza clínicamente con el apoyo de herramientas para evaluar el nivel de deterioro cognitivo, aunque la mayoría de las veces, el diagnóstico se realiza en estadios avanzados de la enfermedad, ya que no existen herramientas confiables y accesibles que nos ayuden a realizar el diagnóstico temprano, además, las personas confunden la sintomatología con cambios propios del envejecimiento, por lo que la mayoría de las veces el diagnóstico no es realizado. El diagnóstico definitivo de esta enfermedad se realiza postmortem mediante los hallazgos histopatológicos característicos, por la

---

presencia de los ovillos neurofibrilares y las placas neuríticas (Knopman et al., 2018).

En los últimos años se han desarrollado modalidades bioquímicas para diagnosticar a la EA, como la medición de los niveles de amiloide  $\beta$ 42 y la proteína tau, tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo. Así como, la detección de biomarcadores y tecnologías de imagenología, como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la Resonancia Magnética (RM), las cuales permiten identificar el daño causado por la patología a lo largo de la vida (Rowe et al., 2013). Actualmente, por medio de tecnologías de imagen como la RM se pueden identificar cambios neuropatológicos hasta 15 o 20 años previos a que aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad, abriendo la ventana para oportunidades de prevención y el desarrollo de una reconceptualización de la EA (Knopman et al., 2018).

Para su estudio, se han desarrollado numerosos modelos animales, en los que se han ensayado cientos de tratamientos (LaFerla & Green, 2012; Nisbet & Götz, 2018); sin embargo, ninguno de los modelos ha reproducido completamente la fisiopatología humana, probablemente debido a la complejidad del cerebro humano y a la distancia evolutiva entre las especies, resultando en una pobre correlación entre los modelos preclínicos y los ensayos clínicos, además de que al bloquear algunos objetivos terapéuticos conocidos como la  $\gamma$  y  $\beta$  secretasa resulta perjudicial debido a las múltiples funciones fisiológicas en las cuales están involucradas estas proteínas. Por lo anterior es necesario comprender la biología y la patogénesis de la EA con mayor profundidad, para encontrar nuevos objetivos terapéuticos, debido a que, en la actualidad, a pesar de los avances en la comprensión de la EA y los múltiples estudios; de todos los agentes que han sido probados, solo 5 han sido aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (LaFerla & Green, 2012).

### **Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer puede clasificarse de acuerdo con el inicio de los síntomas, si se da en mayores de 65 años se denomina Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (EAIT o LOAD por sus siglas en inglés) y comprende el 95% de todos



los casos de EA y si se da en menores de 65 años se denomina Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz o temprano (EAIP o EOAD por sus siglas en inglés). A pesar de que existen algunas diferencias entre estos dos tipos (Tellechea et al., 2018) (**tabla 1**) y que este último (EAIP) abarca solo el 5% (Mendez, 2017) de los casos, de estos el 80% es denominado Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) (Chouraki & Seshadri, 2014), el cual debido a que se debe a mutaciones en específico, nos ha ayudado a dilucidar muchos de los mecanismos fisiopatológicos y bioquímicos involucrados en la EA como son: la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, la alteración sináptica y las alteraciones en el transporte vesicular .

**Tabla 1 Características generales de EAIT y EAIP**

	EAIT	EAIP
<i>Edad de inicio</i>	Más de 65 años	Menos de 65 años
<i>Forma de presentación</i>	Amnésica	No amnésica (disfunción visuoespacial, apraxias)
<i>Evolución</i>	Más lenta	Más rápida
<i>Neuropsicología</i>	Peor memoria	Peor función ejecutiva, visuoespacial y praxias
<i>Patología</i>	Placas seniles y ovillos neurofibrilares	Placas seniles y ovillos neurofibrilares, con más preservación de hipocampo
<i>Biomarcadores en LCR</i>	Disminución A $\beta$ <sub>42</sub> y aumento tau y ptau	Disminución A $\beta$ <sub>42</sub> y aumento tau y ptau
<i>Genotipo ApoE</i>	Favorecido por uno o dos alelos $\epsilon$ 4	Favorecido por ausencia de alelos $\epsilon$ 4
<i>Neuroimagen</i>		
RM estructural	Atrofia hipocampal	Atrofia fronto/temporoparietal
PET-FDG	Disminución metabolismo en lóbulo temporal medial	Metabolismo disminuido en córtex temporoparietal
PET <sup>11</sup> C-PiB	Captación aumentada	Captación aumentada (¿más en zona parietal?)

Tomado de (Tellechea et al., 2018) modificado de Flier et.al.

## ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR (EAF)

Es la forma hereditaria de la EA, se hereda de manera autosómica dominante y es causada por mutaciones en 3 genes principales, el gen de Presenilina1 (PSEN1), Presenilina 2 (PSEN2) o de la proteína precursora amiloide (APP) (Campion et al., 1999). La EAF, representa aproximadamente el 4 % de los casos de EA. Su inicio se da en una edad temprana (menores de 65 años: EAIP), tiene una progresión clínica más rápida en comparación con la EAE y su supervivencia es de 5 años a partir del diagnóstico. Histopatológica y clínicamente la EAF es muy similar a la EAIT (**tabla 1**); sin embargo, diferentes estudios han reportado que, de acuerdo con la

---

localización de la mutación y el gen afectado, los pacientes presentan sintomatología atípica específica además de la demencia, como la paraparesia espástica (Soosman et al., 2016), disartria (Rudzinski et al., 2008), depresión, parkinsonismo (Ringman et al., 2017), afasia, agnosia visual, entre otros (Lanoiselée et al., 2017).

Hasta la fecha de acuerdo con alzforum.org, se han reportado 401 mutaciones en estos genes de las cuales 382 son causantes de la EAF y la mayoría (74%) se encuentran en el gen PSEN1 (284 mutaciones causantes de EAF de 294 reportadas), seguidos de APP (14%, 53 mutaciones causantes de EAF de 59 reportadas hasta ahora) y por último PSEN2 (12%, 45 mutaciones causantes de EAF de 48 reportadas) (mutations@alzforum.org.).

### **Proteína Precursora Amiloide (APP)**

El gen de la Proteína Precursora Amiloide se localiza en el cromosoma 21 en la región 21q21.1 y comprende 19 exones, además de su papel en la producción de  $\beta$ A, participa en la sinaptogénesis, el tráfico de proteínas a lo largo del axón neuronal, en la adhesión celular, en el metabolismo del calcio y en la transducción de señal de la membrana al núcleo (Nalivaeva & Turner, 2013). Las mutaciones en APP causantes de EAF, representan aproximadamente el 14% de los casos de EAF (53 mutaciones, mutations@alzforum.org.).

### **Presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2)**

Los genes de PSEN1 y PSEN2 están ubicados en el cromosoma 14 y 1, respectivamente. La PSEN2 se expresa en músculo cardíaco, músculo esquelético y páncreas, y se expresa menos homogéneamente en el SNC y tejidos periféricos; sin embargo, la PSEN1 se expresa en SNC (neocorteza, hipocampo y en menor cantidad en bulbo olfatorio y tálamo).

Además de su función catalítica en el complejo GS, se sabe que participan en la señalización celular (a través de la interacción con otras proteínas como la  $\beta$ -catenina y la glucógeno sintasa quinasa  $3\beta$  (GSK $3\beta$ ) para la señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina), la homeostasis del calcio (al interactuar con Receptores y ATPasas de

---

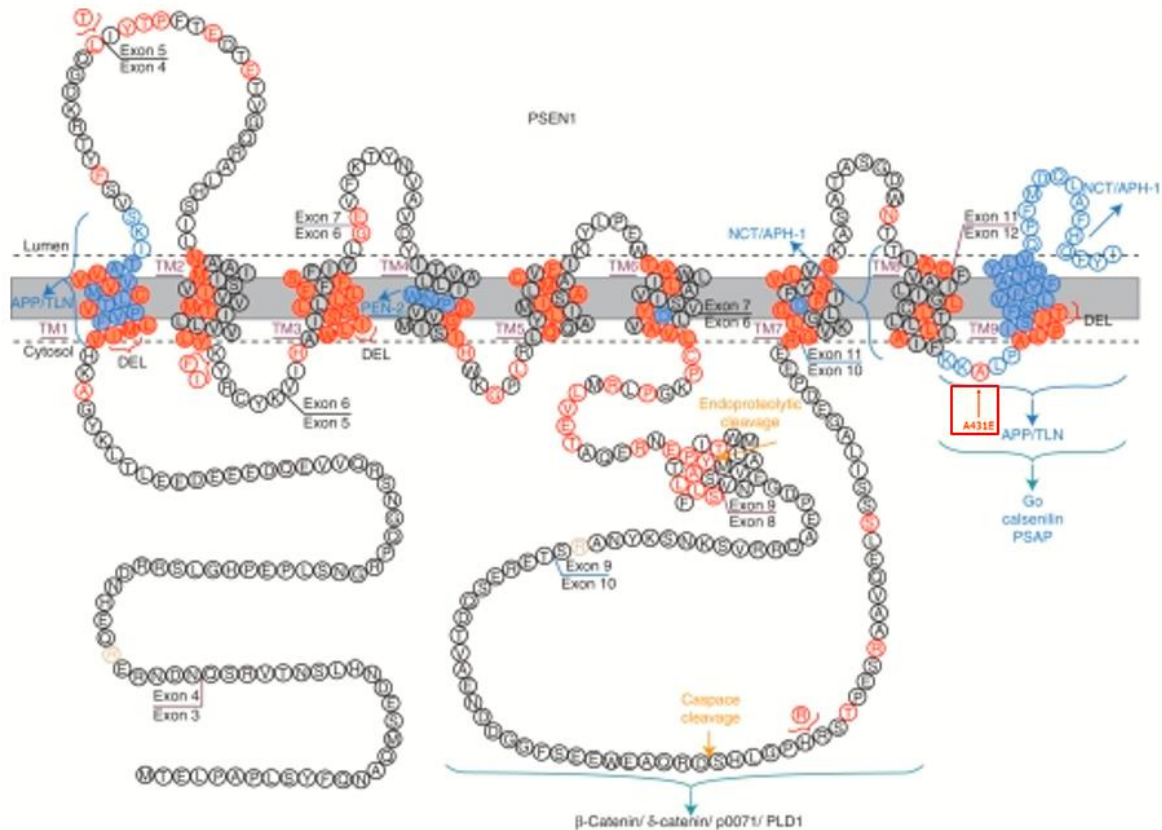
Calcio (RYRs y SERCA)) (McCarthy, Twomey, & Wujek, 2009) , la autofagia, el tráfico vesicular y la endocitosis(Cai et al., 2006) (al interactuar con Rab11 (Dumanchin et al., 1999), fosfolipasa D1 (PLD1) (Cai et al., 2006), sintaxina 1A y 5 (Smith et al., 2000; Suga, Tomiyama, Mori, & Akagawa, 2004) y anexina A2 (Bustos et al., 2017)) entre otras funciones. Por lo que mutaciones o alteraciones en las presenilinas generan muchos efectos y alteraciones en la homeostasis celular. De las 382 mutaciones causantes de EAF, el 12% se encuentran en PSEN1 (45 mutaciones, mutations@alzforum.org.). Y el 74% (284 mutaciones) se encuentran en PSEN1.

El gen de la PSEN1 esta codificado en el cromosoma 14q24.2, tiene 12 exones y la proteína presenta 9 dominios transmembranales. La proteína completa tiene 467 aminoácidos (**figura 7**) y se han reportado 7 isoformas (De Strooper, Iwatsubo, & Wolfe, 2012).

### **Mutación A431E en PSEN1**

De todas estas mutaciones en PSEN1 (284 mutaciones), existe una mutación en particular que ha sido descrita en México, la cual se localiza en el exón 12 del gen de la PSEN1 y consiste en la sustitución de una Alanina (A) en la posición 431 por un ácido glutámico (E) (**Figura 7 cuadro rojo**). Esta mutación fue descrita por primera vez en cinco personas con la enfermedad de Alzheimer por Rogaeva y colaboradores (Rogaeva et al., 2001). Posteriormente, el grupo de Petra Yescas realizo un estudio de 13 familias mexicanas con EA de las cuales nueve mostraron la mutación PSEN1(A431E), en donde reportó que se transmite de forma autosómica dominante, y al realizar el análisis de haplotipos sugirió que estos individuos comparten un ancestro común, demostrando un efecto fundador en el estado de Jalisco por lo que esta mutación recibe el nombre de mutación Jalisco (Yescas et al., 2006). Ese mismo año en 15 familias adicionales, estudiadas en California (USA), se identificó la misma mutación. Aunque se encontraban en los Estados Unidos, 14 familias fueron consideradas de descendencia mestiza mexicana, y en 9 de ellas se pudo trazar su origen hasta el estado de Jalisco (J. Murrell et al., 2006). Por último, el grupo del Dr. Luis Figuera ha reclutado más

pacientes con esta mutación identificando la mutación en 29 pacientes de 39 (74.36%) con demencia familiar de inicio temprano, y a través de genealogías se identificaron en las familias a un total de 147 afectados.



**Figura 7 Secuencia de aminoácidos, topología y mutaciones en PSEN1:** Las mutaciones causantes de EAF están en rojo, también se marcan los diferentes límites de exón/intrón, sus dominios transmembrana (TM1-TM9), en azul están los aminoácidos involucrados en la interacción con APP, la telencefalina (TLN), PEN-2, NCT, APH-1. Tomada de (De Strooper et al., 2012) Figura adaptada de Dillen y Annaert 2006 basada en sitio web alzforum

En nuestro laboratorio Santos Mandujano caracterizó clínicamente a los miembros de una familia mexicana portadores de la mutación, confirmando que la familia en estudio, al igual que otros reportes de la mutación, presenta paraparesis espástica (Soosman et al., 2016), padecimiento caracterizado por ser de inicio súbito, con una disfunción progresiva, debilidad y espasticidad de los miembros inferiores, síntoma parecido al de algunas enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis

---

Lateral Amiotrófica (ELA). El hallazgo característico en esta enfermedad es la degeneración axonal, con afectación de tractos corticoespinales, predominando en las regiones distales.

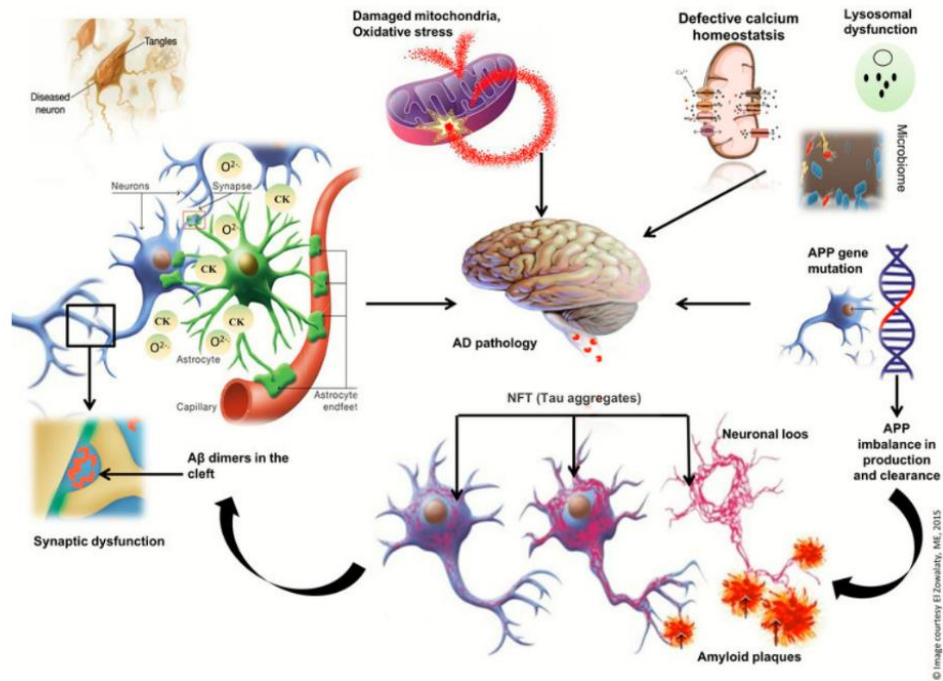
## **MECANISMOS PATOGENICOS INVOLUCRADOS EN EA**

Se han descrito varios mecanismos patogénicos (Jellinger, 2010) (Hany E. Marei), involucrados en la EA (**figura 8**) y otras enfermedades neurodegenerativas, como son:

- Una dinámica anormal de proteínas con plegamiento incorrecto, degradación defectuosa, disfunción proteasomal y agregación, a menudo con acciones y mutaciones de chaperonas moleculares (Scheper & Hoozemans, 2009; (Díaz-Villanueva, Díaz-Molina, & García-González, 2015; Naiki & Nagai, 2009).
- Daño mitocondrial y estrés oxidativo (OS) y formación de radicales libres / especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bhandary, Marahatta, Kim, & Chae, 2012; Haque, Murale, Kim, & Lee, 2019; Zhao & Zhao, 2013).
- Bioenergética deteriorada y daño al ADN (An et al., 2019; Ganguly, Chakrabarti, Chatterjee, & Saso, 2017)
- Fragmentación del aparato de Golgi neuronal (Fan et al., 2008; Gonatas, Stieber, & Gonatas, 2006) y disfunción sináptica.
- Interrupción del transporte celular y vesicular (Morfini et al., 2009; Vickers et al., 2009).
- Disfunción lisosomal, y defectos en la homeostasis del calcio (Bezprozvanny, 2009)
- Procesos neuroinflamatorios / neuroinmunes (W.-W. Chen et al., 2016; Galimberti & Scarpini, 2011).

Estos mecanismos están interrelacionados en complejos círculos viciosos que finalmente conducen a la disfunción celular y la muerte neuronal. Muchos de estos mecanismos han sido dilucidados por medio de estudios realizados en tejidos cerebrales postmortem, en fluidos biológicos como LCR (líquido cefalorraquídeo) y

en sangre, aunque gran parte de estos avances se han logrado a través del estudio de modelos animales transgénicos que simulan la EAF (Delfino et al., 2019), Una de las tecnologías más utilizadas recientemente para el estudio de este tipo de enfermedades crónico-neurodegenerativas es la proteómica.



**Figura 8 Mecanismos patológicos en EA (Hany E. Marei, 2016)**

## PROTEÓMICA

La proteómica es una de las ramas “ómicas” de mayor crecimiento en las ciencias biomédicas. El término fue acuñado en 1994 por Wilkins. (Anderson & Anderson, 1998) y se define como el conjunto de metodologías destinadas al análisis del proteoma, es decir del conjunto de proteínas expresadas por el genoma de un sistema biológico, en un momento y condición determinada, ya que, a diferencia del genoma, el proteoma es un elemento dinámico que puede sufrir variaciones dentro de un mismo organismo, tejido, célula o compartimento, y se ve modificado en respuesta a diferentes condiciones y factores ya sea ambientales, fisiológicos o de estrés.

---

Las proteínas, son macromoléculas multifuncionales compuestas por aminoácidos unidos entre sí, mediante enlaces peptídicos. Por sus características son más difíciles de estudiar y comprender, comparadas con otras moléculas como el ADN o el ARN, ya que a veces actúan solas, en interacciones individuales y otras lo hacen en grandes grupos y tienen múltiples funciones, tanto estructurales, enzimáticas, metabólicas, de señalización y reguladoras.

La complejidad del proteoma radica en varios puntos, desde la transcripción, incluyendo el splicing alternativo de los ARNm que codifican para proteínas que hace que de los 32,000 posibles genes codificantes en un ser humano, puedan generarse hasta un millón de proteínas distintas, además de que una vez sintetizadas, pueden sufrir diferentes modificaciones postraduccionales (PTM) que modulan su actividad, su función o su localización, ya que hasta el momento han sido reportadas más de 200 diferentes PTM.(Fields, 2001).

El potencial del análisis de proteínas utilizando muestras complejas, como cromosomas, células y fluidos biológicos, a través de estudios de proteómica, comienza a tener resultados impactantes.

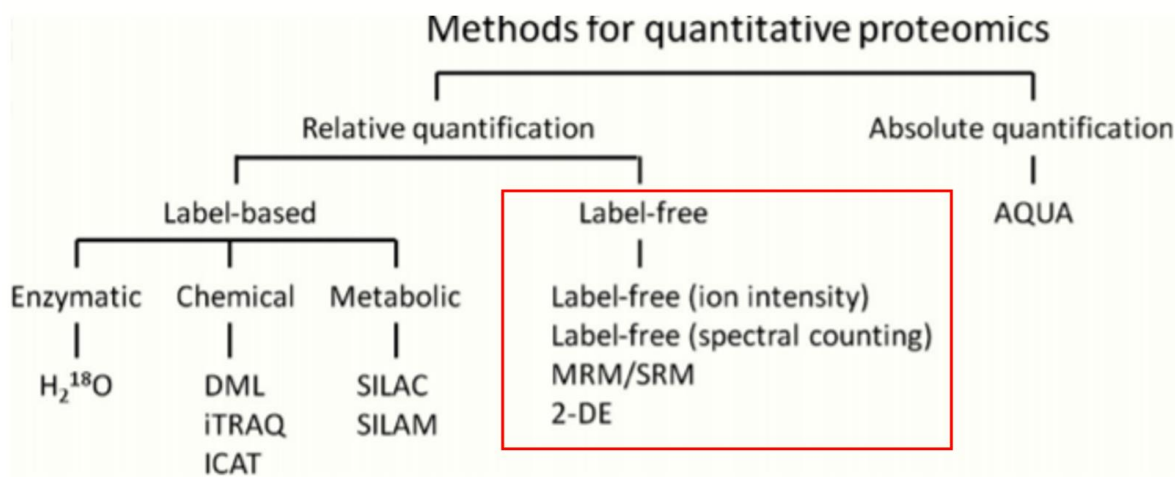
### **Tipos de estudios proteómicos**

De acuerdo al objetivo que se quiera lograr existen 3 tipos de estudios proteómicos: 1) los de identificación, que sirven para conocer que proteínas se encuentran en una muestra; 2) los de caracterización, que se utilizan para conocer la ubicación y las modificaciones postraduccionales (PTM) que le ocurren a las proteínas analizadas; y 3) los cuantitativos, que han tenido mayor auge recientemente, ya que nos permite medir de una manera altamente reproducible, la abundancia de las proteínas de forma relativa o absoluta o las PTM que resultan de dos o más condiciones experimentales (por ejemplo, control versus tratamiento farmacológico, o estado normal versus enfermedad).

### **Estudios proteómicos cuantitativos**

Este tipo de estudios se basan en una variedad de plataformas de espectrometría de masas (MS) (**figura 9**), los cuales pueden ser de: a) cuantificación absoluta, los

cuales determinan la cantidad exacta de la proteína en la muestra, mediante la inclusión de estándares internos estables; o b) de cuantificación relativa, expresada típicamente como la relación de la expresión entre las diferentes condiciones (FC: fold change) (Craft, Chen, & Nairn, 2013).



**Figura 9 Resumen de métodos proteómicos cuantitativos** (Shevchenko, Konzer, Musunuri, & Bergquist, 2015) DML: iTRAQ:Isotope Tag for Relative and Absolute Quantification ICAT:Isotope-Coded Affinity Tag SILAC: Stable Isotope labeling by aminoacids in cell culture SILAM Stable Isotope labelling of mammals MRM/SRM: Multiple-reaction monitoring or selected reaction monitoring AQUA: absolute protein quantification.

Como se observa en la **figura 9** los estudios de cuantificación relativa pueden ser con marcaje (label-based), en los cuales se usan etiquetas ya sea enzimáticas químicas o metabólicas y se mezclan ambas muestras. O bien, pueden ser sin marcaje (“label free”) en el cual las muestras son analizadas de manera independiente (**figura 10**).

### Estudios proteómicos con marcaje

Se han desarrollado diversos tipos de marcajes, basados fundamentalmente en el uso de isótopos estables (SIL). La mayoría de las técnicas de marcaje isotópico están basadas en la cuantificación a nivel de los espectros de espectrometría de masas (MS), de manera que se buscan las señales, que difieren entre sí, por una



---

variación específica en su relación masa/carga ( $m/z$ ) y la concentración relativa de un péptido dado, se obtiene por comparación de las intensidades de las señales correspondientes. Los isótopos estables pueden ser incorporados metabólicamente, química o enzimáticamente a las proteínas o péptidos presentes en la muestra.

En el marcaje metabólico los isótopos estables se incorporan a las proteínas durante el crecimiento y producción de las proteínas por parte de las células en cultivo basados en la incorporación de isótopos de nitrógeno o aminoácidos marcados en células *in vivo* o en cultivo (SILAC) (Hoedt, Zhang, & Neubert, 2014), la incorporación enzimática de los isótopos estables se lleva a cabo durante la digestión trípica de las proteínas como la introducción de átomos de isótopo  $^{18}O$ , en el extremo carboxilo terminal de los péptidos producidos mediante digestión trípica (Fenselau & Yao, 2007) y en el marcaje químico las proteínas o péptidos se marcan mediante exposición a los reactivos con los que se produce su marcaje isotópico como ICAT (isotope-coded affinity tags), iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification) y TMT (tandem mass tag) (Wiese, Reidegeld, Meyer, & Warscheid, 2007; L. Zhang & Elias, 2017). **(figura 10).**

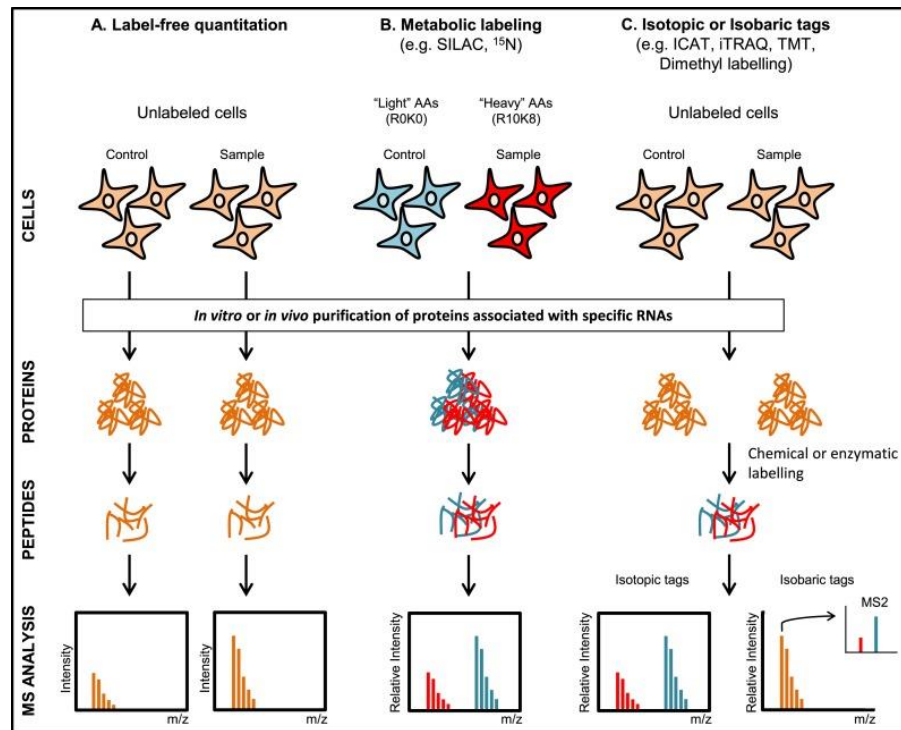
Además de estas metodologías, existen otras, que se han desarrollado como aplicaciones proteómicas que permiten la cuantificación de proteínas sin el uso de ningún tipo de marcaje proteico, ni peptídico (conocidas por su término inglés como label-free quantification).

### **Estudios proteómicos sin marcaje “label free”**

Los estudios proteómicos tipo “label free”, a diferencia de los de marcaje, permiten comparar el proteoma total entre dos condiciones, ya que las muestras son analizadas de manera independiente como se observa en la **figura 10**.

Estos estudios pueden ser de dos tipos: El primer enfoque se denomina conteo espectral e implica un recuento y una comparación del tipo y número de espectros de iones de fragmentos (MS/MS), adquirida para péptidos de una proteína dada. Y el segundo enfoque implica la medición de las intensidades de señal de iones

precursores de péptidos (Malik, Dulla, Nigg, & Körner, 2010; Megger, Bracht, Meyer, & Sitek, 2013).



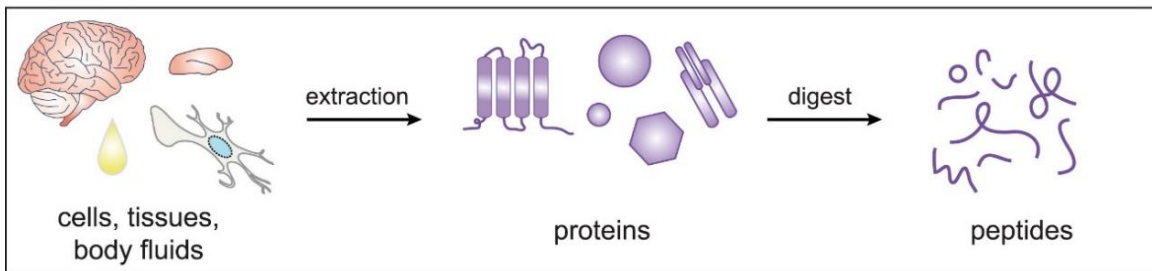
**Figura 10 Estudios proteómicos de cuantificación relativa** (Jazurek, Ciesiolka, Starega-Roslan, Bilinska, & Krzyzosiak, 2016)

## FASES DE UN ESTUDIO PROTEÓMICO

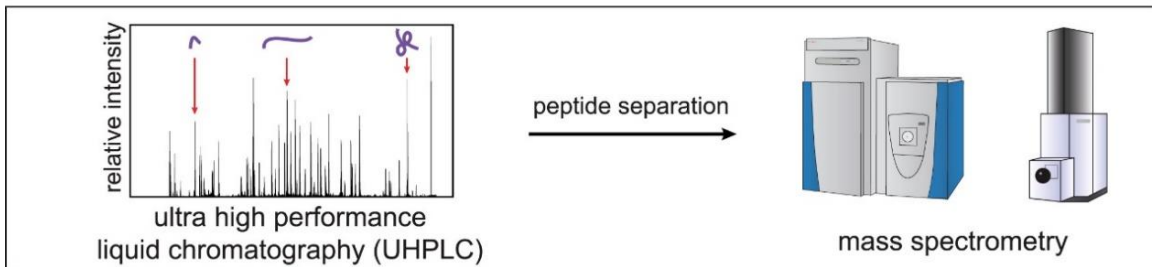
Todo estudio proteómico, independientemente de las metodologías empleadas consta de 4 fases (**Figura 11**), en la cual la fase 2 y 3 se realizan de manera simultánea):

1. Preparación y procesamiento de la muestra:
2. Separación de la muestra
3. Análisis por espectrometría de masas
4. Identificación de las proteínas

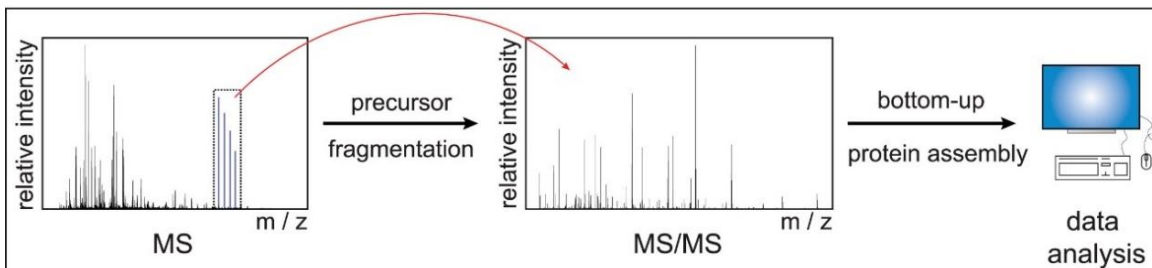
## Sample preparation



## Liquid chromatography - mass spectrometry



## Spectra interpretation



**Figura 11 Fases de un estudio proteómico:** (Arriba) Las proteínas se extraen de cualquier fuente biológica, en una forma adecuada para la digestión enzimática en péptidos, (en medio) los péptidos resultantes se separan luego en sistemas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), acoplados al espectrómetro de masas mediante ionización por electrospray (ESI). (Abajo) El análisis de la EM se realiza seleccionando péptidos precursores, que luego se fragmentan por colisiones con moléculas de gas a baja presión, lo cual genera espectros de masas en tándem (MS/MS) que permite identificar los péptidos mediante la comparación del fragmento o los espectros de MS/MS con una base de datos de secuencias.

## FASE 1: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El éxito de los experimentos proteómicos depende de una buena preparación, solubilización y digestión de la muestra, por lo que esta etapa es crucial y de suma importancia en un estudio proteómico.

---

La preparación de la muestra comienza con la extracción de las proteínas de cualquier tipo de fuente biológica; ya sea el cultivo o el lisado de las células, el homogeneizado de los tejidos o la obtención de proteína a partir de fluidos corporales. Esta etapa, es de suma importancia debido a la facilidad con la que pueden introducirse contaminantes en la muestra durante su manipulación. La habitual presencia de queratina humana, que con mayor frecuencia se encuentra en los análisis proteómicos, enfatiza la importancia de un manejo cuidadoso de la muestra durante su preparación. Además de que, muchos de los agentes químicos utilizados en biología celular deben ser eliminados antes de analizar la muestra por espectrometría de masas (MS). Las proteínas extraídas son desnaturizadas ya sea por calor y/o a través de agentes químicos como la urea o distintos detergentes y posteriormente modificadas químicamente para solubilizarlas. Los detergentes deben ser eliminados de la muestra, antes de la digestión enzimática debido a que pueden generar ruido de fondo o enmascarar señales específicas. Una vez desnaturizadas las proteínas son reducidas con agentes reductores. Los agentes reductores más utilizados son el ditiotreitól (DTT), la tributilfosfina (TBP) y la tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP). Posteriormente, deben ser alquiladas, los agentes alquilantes más usados son: la iodoacetamida, derivados de la acrilamida y las vinilpiridinas, esto se hace para prevenir su agregación y evitar la formación de enlaces o puentes disulfuro entre los grupos tiol de las cisteínas (Herbert et al., 2001).

Los protocolos que utilizan detergentes aniónicos y/o caotrópicos para extraer y solubilizar proteínas celulares, proporcionan muestras que deben ser purificadas antes de la digestión y el análisis. Los métodos tales como la precipitación orgánica que elimina contaminantes, desnaturizantes y otras especies no deseadas están sujetos a recuperaciones deficientes, problemas de solubilización y variación en el contenido de proteína de muestra a muestra.

Se recomienda la preparación de las muestras con ayuda de filtro (FASP), ya que proporciona una extracción, purificación y digestión de proteínas eficiente, y evita muchos problemas de purificación de proteínas al intercambiar tampones en

---

unidades de filtro giratorio (conjuntos de ultrafiltración), que pueden eliminar el dodecilsulfato de sodio (SDS) y los contaminantes de la muestra por completo (Wiśniewski, Zougman, Nagaraj, & Mann, 2009) Las proteínas se reducen, se alquilan, se lavan y se digieren en la unidad de filtro, liberando el producto libre de detergente y de los agentes reductores y alquilantes (Erde, Ogorzalek Loo, & Loo, 2017; Manza, Stamer, Ham, Codreanu, & Liebler, 2005).

El último paso en la preparación de la muestra es la digestión de las proteínas hasta sus péptidos resultantes. La tripsina es la enzima más comúnmente utilizada para llevar a cabo la digestión proteolítica, dada su alta especificidad para escindir enlaces peptídicos entre residuos de lisina o arginina y cualquier otro aminoácido (Olsen, Ong, & Mann, 2004).

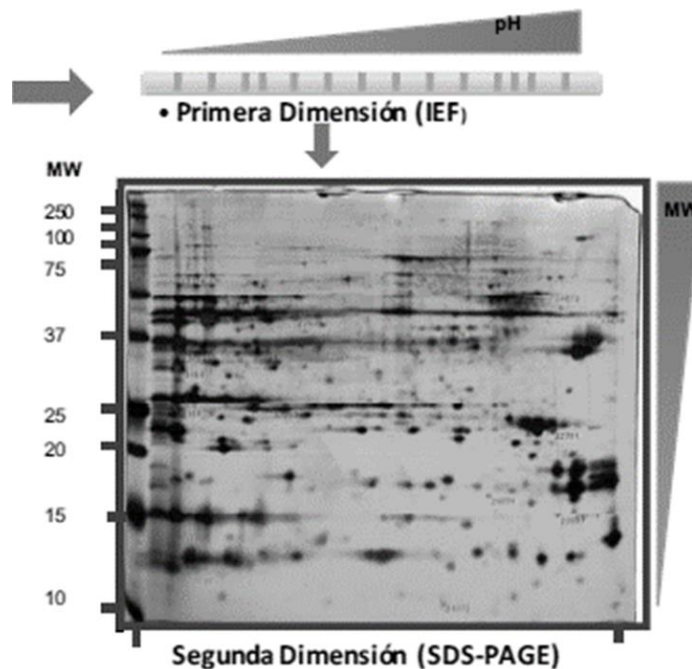
## **FASE 2: SEPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Posteriormente a la preparación de la muestra, se realiza la separación de los péptidos proteícos; las dos metodologías más empleadas para esta fase son la electroforesis bidimensional (2 DE-SDS-PAGE) y la Cromatografía líquida (LC).

### **Electroforesis Bidimensional (2-DE)**

La electroforesis en dos dimensiones fue desarrollada en los años 70 (O'Farrell, 1975) y ha sido una de las técnicas más utilizadas desde entonces para la separación de péptidos. La electroforesis 2-DE, consiste en la separación de proteínas según sus propiedades fisicoquímicas. Se denomina de dos dimensiones ya que, en la primera dimensión, las proteínas son separadas por isoelectroenfoque de acuerdo a su punto isoeléctrico (carga neta de las proteínas a diferentes pH), y en la segunda dimensión las proteínas son reducidas, alquiladas y corridas en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE, de acuerdo a su peso molecular (**Figura 12**).

Aunque hasta la fecha se sigue ocupando esta metodología, tiene varias limitaciones; como la dificultad en la reproducibilidad, el rango dinámico que tiene es limitado, y las proteínas altamente abundantes generalmente enmascaran la identificación de proteínas menos abundantes que tienen punto isoeléctrico y peso molecular similares, así como la dificultad para identificar proteínas de alto peso molecular (>100kDa), proteínas muy ácidas ( $pI < 3$ ) o muy básicas ( $pI > 9$ ) (Monteoliva & Albar, 2004). Además de que involucran un proceso más laborioso para el análisis posterior por MS. Los cambios de proteínas se cuantifican utilizando un software de análisis de imágenes 2D. Sin embargo, debido a sus limitaciones recientemente ha comenzado a sustituirse por la Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).



**Figura 12 Ejemplo de Electroforesis en gel de dos dimensiones**

### **Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS)**

La cromatografía Líquida (LC) consiste en la separación de los componentes de una muestra en dos fases; la fase estacionaria y la fase móvil, donde los solutos son arrastrados o eluidos por una fase móvil, que fluye en una columna que contiene una fase estacionaria, normalmente compuesta por una resina. Al introducir la

---

muestra en la fase móvil, los componentes avanzan dependiendo de su afinidad por la fase estacionaria.

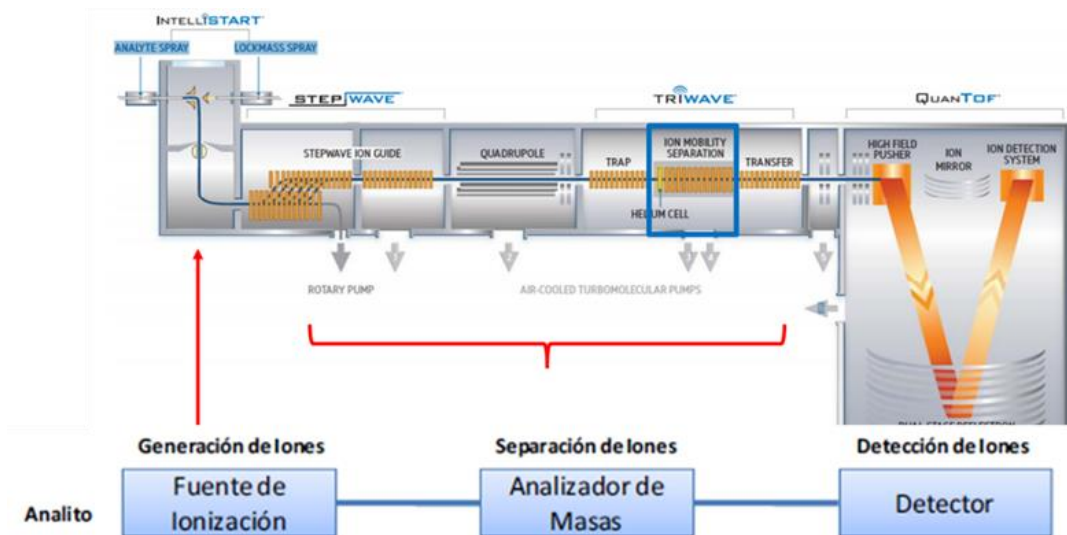
La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC High Performance Liquid Chromatography), a diferencia de la LC clásica, impulsa la fase móvil con un sistema de bombeo de alta presión, con lo cual se puede utilizar una fase estacionaria más compacta, con un tamaño de partícula mucho más reducido (de 150-200µm, a diferencia de la clásica 2-5µm), y con ello se aumenta la eficacia y separación de la muestra al incrementar la resolución.

Actualmente, se utiliza la cromatografía multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT Multidimensional protein Identification Technology), donde se combinan columnas de forma secuencial, para posteriormente ser analizadas de manera automatizada mediante la Espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Actualmente, a la hora de identificar y caracterizar proteínas de forma masiva la proteómica emplea de manera casi exclusiva la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). De esta forma la mezcla compleja de proteínas (que puede llegar a englobar el proteoma completo de un tejido, célula u orgánulo) se digiere enzimáticamente, se separa mediante cromatografía líquida (LC), normalmente de alta presión o alta resolución (HPLC), y se analiza en un espectrómetro de masas acoplado en línea al cromatógrafo. Este abordaje permite la identificación masiva de proteínas de forma rápida, automática, reproducible y con una cobertura y un rango dinámico superiores a los de la antigua estrategia electroforética (Link et al, 1999; Washburn et al, 2001) (**Figura 11**).

### **FASE 3: ANALISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

#### **Elementos de un Espectrómetro de masas**

Un espectrómetro de masas esta compuesto por 3 elementos básicos: la fuente de ionización, el/los analizadores de masas y el detector (**figura 13**).



**Figura 13 Elementos de Espectrometro de masas** (en esta imagen se muestra un Espectrometro de Masas Synapt G2-Si de la compañía de Waters el cual fue utilizado para el analisis de proteínas de este proyecto. El cual contiene 3 analizadores de masas y separación por movilidad ionica lo cual lo hace uno de los espectrometros de masas de mayor resolución y eficacia para el analisis de proteínas).

## FUENTE DE IONIZACIÓN

La fuente de ionización es la parte del espectrómetro que convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas, las fuentes de ionización suave aparecieron en la década de los 80, revolucionando el uso de la espectrometría de masas en las ciencias de la vida y permitiendo el estudio de biomoléculas como las proteínas motivo por el cual en el 2002 se les otorgó el premio nobel de Química a sus respectivos inventores.

Los dos métodos de ionización suave son los siguientes:

### **MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)**

Desarrollado por Karas y Hillenkamp a finales de 1980, en esta técnica el analito se mezcla con un compuesto aromático o matriz orgánica ionizable en una placa metálica, mezcla que al evaporarse cocrystaliza junto con el analito donde a continuación se incide un pulso de laser UV, produciéndose la desorción de la



---

mezcla donde la matriz absorbe la energía del láser y la transfiere al analito dejando el analito ionizado y en fase gaseosa (Karas & Hillenkamp, 1988).

### **ESI (Electrospray Ionization)**

Fue desarrollado por John Benett Fenn y Koichi Tanaka en 1988, es una técnica de ionización a presión en la que la muestra que se encuentra en solución (a pH ácido) se hace pasar a través de un fino capilar metálico que está sometido a un alto voltaje, donde se produce una nebulización, dando como resultado microgotas cargadas de analitos en forma de spray que a través de una corriente de gas a alta temperatura se evapora y se elimina el disolvente restante liberando los analitos protonados y en fase gaseosa, (Fenn, Mann, Meng, Wong, & Whitehouse, 1989). Donde posteriormente los iones generados son acelerados en un campo eléctrico hacia el analizador de masas. La ionización por ESI permite acoplar los métodos de electroforesis capilar y cromatografía líquida directamente al espectrómetro de masas.

### **ANALIZADORES DE MASAS**

El analizador de masas es el elemento principal de un espectrómetro de masas, ya que en estos los iones son sometidos a campos magnéticos y/o eléctricos que los separan según su relación masa/carga ( $m/z$ ). Los analizadores de masas más utilizados son:

#### **Cuadrupólo (quadropole, Q)**

El Cuadrupólo está compuesto por cuatro barras metálicas paralelas, generalmente de 15-20 cm de largo y 0.5 cm de radio, separadas entre sí unos 2 cm, a las que se les aplica un potencial de corriente continua y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto. Donde los iones entran siendo sometidos a este campo que los hace oscilar y los desvía en función de su valor  $m/z$  de forma que los iones con un estrecho rango de valores de  $m/z$  llegan hasta el detector actuando como un filtro de iones.

---

### **Trampa Iónica (ion trap, IT)**

Consta de un electrodo que constituye el anillo central donde se aplica radiofrecuencia creando el campo y dos anillos colectores. Los iones penetran en una rejilla en el electrodo colector y según su  $m/z$  y el campo aplicado circulan o se desestabilizan pasando al detector, por lo que la separación de los iones en este analizador de masas se produce almacenando los iones en el espacio central y manipulando su movimiento en el tiempo. Sin embargo, estos analizadores tienen una resolución limitada y una capacidad relativamente baja para atrapar los iones por lo que frecuentemente se utilizan junto con otros analizadores de masas para MS/MS.

### **Tiempo de Vuelo (Time of Flight, TOF)**

Este analizador se basa en la relación entre la masa y la velocidad de los iones, mide el tiempo que necesitan los iones acelerados para recorrer una distancia sin que los iones estén sometidos a un campo eléctrico y/o magnético. Además, se han incorporado espejos electrostáticos denominados reflectores para aumentar la resolución y mejorar la separación de los haces de iones.

### **Orbitrap**

Este consiste en un electrodo exterior en forma de barril y un electrodo interior coaxial con forma de huso que forma un campo electrostático. En él los iones dan vueltas alrededor de electrodo central además de moverse de manera horizontal a través del eje del electrodo central.

### **DETECTOR DE MASAS**

Es el elemento final del espectrómetro de masas, este registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie, genera señales que son proporcionales a la abundancia relativa de cada ion, las cuales son integradas en un sistema informático que genera los espectros de masas (algunos ejemplos son la caja de Faraday, el electromultiplicador y la placa fotográfica).

---

## **FASE 4: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Existen 2 estrategias principales para la identificación de proteínas mediante MS:

### **Huella peptídica (peptide mass fingerprint PMF)**

Consiste en la identificación de los péptidos que se obtienen tras la digestión de las proteínas con una enzima determinada, de esta manera la huella peptídica es característica de cada proteína y depende de la proteasa utilizada, típicamente es la tripsina. La identificación se realiza al comparar las masas de los fragmentos peptídicos obtenidos mediante MS con los valores calculados de la digestión virtual de proteínas conocidas en diferentes bases de datos como SwissProt MSDB y NCBI nr.

### **Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)**

Se llama espectrometría de masas en tándem (MS/MS) al acople de dos o más analizadores de masas en tándem, son utilizados para identificar mezclas complejas y eliminar interferencias en métodos cuantitativos. En uno de ellos se aíslan los iones precursores que posteriormente se fragmentan por procesos de colisión con un gas inerte en el siguiente analizador. Esto permite identificaciones de manera más específica ya que proporciona los espectros de fragmentación de los péptidos **figura 13)**

La evaluación estadística precisa de las identificaciones de péptidos de la base de datos de secuencias a partir de espectros de masas en tándem es esencial en experimentos de proteómica basados en espectrometría de masas. Estas estadísticas dependen de modelar con precisión las identificaciones mediante el cálculo del FDR (False Discovery Rate) y sistemas de control de calidad para asegurarse de tener resultados confiables. Muchos investigadores afirman haber identificado proteínas como biomarcadores, pero carecen de controles de calidad analítica y tienen estadísticas altas.

---

## CONTROL DE CALIDAD EN ESTUDIOS PROTEÓMICOS TIPO “LABEL FREE”

Para que un estudio proteómico sea consistente, sólido y confiable deben ser considerados diferentes parámetros de calidad ya sea a nivel de péptidos como de proteínas (Souza et al., 2017).

A nivel de péptido:

- Porcentaje de escisiones perdidas (%missed cleavage).
- Porcentaje de péptidos que se han fragmentado en la fuente (%insource).
- Distribución del de errores en el rango m / z (tolerancia de error al péptido).
- Porcentaje de péptidos detectados a un máximo de 5 ppm.

A nivel de proteína:

- o Promedio de péptidos por proteína.
- o El índice de falsos positivos (FDR).
- o Número total de proteínas identificadas.
- o Rango dinámico (RD).
- o Coeficiente de variación (CV)

La MS se basa en métodos como la adquisición dependiente de datos (DDA) en la que los iones precursores se someten a fragmentación secuencial selectiva de acuerdo con sus abundancias En contraste, la adquisición independiente de datos (DIA), las adquisiciones multiplexadas de MS<sup>E</sup>/ HDMS<sup>E</sup> o el monitoreo de reacción seleccionado (SRM) generan un espectro de espectros iónicos de todos los iones precursores detectables dentro de un ciclo LC-MS independientemente de cualquier característica específica(Souza, Guest, & Martins-de-Souza, 2017), permitiendo el aumento de la capacidad analítica de los enfoques basados en la EM y, por lo tanto, un análisis más exhaustivo de las muestras en la investigación de biomarcadores.

Para muestras complejas, se recomiendan técnicas modernas de adquisición como resolución multiplex MS<sup>E</sup> y HDMS<sup>E</sup> y UDMS<sup>E</sup> de alta definición (Chakraborty, Berger, & Gebler, 2007) la cual cuenta con movilidad iónica (IM) permitiendo separar

---

especies iónicas en fase gaseosa a medida que se desplazan a través de un gas a presión positiva y bajo la influencia de un campo eléctrico. Así, con los parámetros correctos, es posible discriminar diferentes cargas y especies isobáricas debido a la especificidad de diferentes secciones transversales, lo que permite un aumento significativo de la capacidad de pico y la identificación de péptidos. (Distler, Kuharev, Navarro, & Tenzer, 2016).

Una de las aplicaciones de la proteómica, es el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la EA, la EP, La EH y la ELA.

En general, la mayoría de los estudios se han realizado en muestras de paciente, en tejidos postmortem de distintas zonas del cerebro y fluidos corporales como sangre y LCR y aunque estos estudios han identificado a algunas moléculas como posibles biomarcadores, no es posible hacer más preguntas para evaluar el efecto fisiológico consecuente, debido a su alteración, por lo que se han tratado de desarrollar modelos biológicos que simulen la enfermedad y a los cuales se les pueda someter a diferentes estímulos, tratamientos y condiciones controladas para evaluar el efecto fisiológico consecuente, como ejemplo de esto están los animales transgénicos, los cuales han sido modificados genéticamente con una o varias mutaciones que han sido descritas en estas enfermedades.

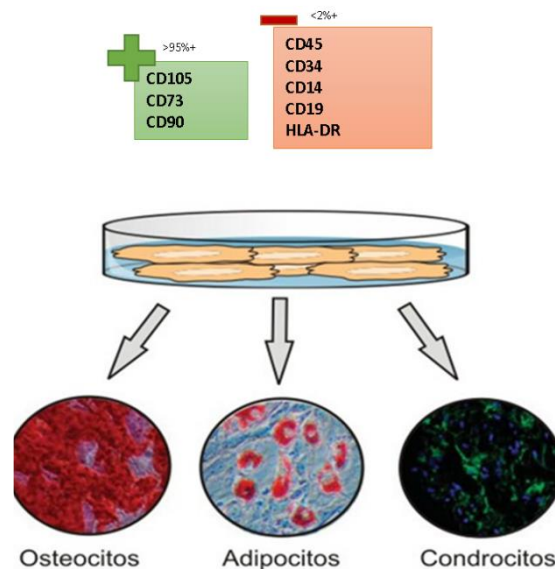
Desafortunadamente, este tipo de estudios tiene ciertas limitaciones debido a la complejidad del modelo biológico y a la necesidad de eliminar a las proteínas que se encuentran de manera abundante en los fluidos corporales como el LCR o la sangre, como la albúmina y las inmunoglobulinas, las cuales, pueden enmascarar a las proteínas menos abundantes. Además, el análisis de zonas cerebrales con distintos tipos de células no solo limita la comprensión de dónde podría haber ocurrido un cambio de expresión de proteína en particular, sino que también minimiza la capacidad de detectar cambios significativos en los niveles de expresión de proteínas o modificaciones debidas a problemas relacionados con baja señal y alto ruido. Para subsanar este problema, son necesarios más estudios utilizando modelos celulares de un solo tipo, y aunque pocos han sido reportados, la mayoría se enfoca en neuronas o células diferenciadas. Hasta la fecha no existe ningún

estudio proteómico que haya sido realizado en células ecto-mesenquimales precursoras neurales derivadas de pacientes con EAF.

## CÉLULAS MESENQUIMALES

Las células mesenquimales (MSC, Mesenchymal Stem Cells) son células multipotentes que pueden ser diferenciadas a células de linaje mesodérmico (osteocitos, adipocitos y condrocitos). De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular, para que una célula sea definida como mesenquimal debe de cumplir con 3 criterios: **(Figura 14)** (Dominici et al., 2006):

- Expresar marcadores de células mesenquimales multipotentes (CD105, CD73, CD90) en el 95% de la población y no expresar marcadores de células hematopoyéticas o diferenciadas como: CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR
- Que sean adherentes en plástico y con morfología fibroblastoide.
- Que posean la capacidad de diferenciación a estirpes mesodérmicas como osteocitos, adipocitos y condrocitos.



**Figura 14 Criterios de Células Mesenquimales según la Asociación de Terapia Celular**

Las células mesenquimales se pueden obtener de: medula ósea, tejido adiposo, hígado fetal, sangre, pulmón, placenta, pulpa dental y cordón umbilical. Debido a sus propiedades, estas células han generado un gran interés en la biomedicina, ya que tienen un amplio potencial terapéutico, en reparación e ingeniería de tejidos (Baksh, Song, & Tuan, 2004; Caplan, 2005; Urbán et al., 2008). Recientemente, estas células se han tratado de utilizar para el estudio de algunas enfermedades

---

neurodegenerativas e incluso como tratamiento de las mismas (Furno, Mannino, & Giuffrida, 2018; Joyce et al., 2010). Sin embargo, su obtención puede resultar difícil, ya que por lo general emplea métodos invasivos. Las únicas dos fuentes de células mesenquimales no invasivas son los dientes y aquellas ubicadas en el epitelio olfatorio (W. Murrell et al., 2005; Roisen et al., 2001; Wetzig, Mackay-Sim, & Murrell, 2011).

### **Células ecto-mesenquimales de epitelio olfatorio (Ce-MEO / MSC-OE)**

Estas células se han descrito como células ecto-mesenquimales, ya que, además de cumplir con los 3 criterios fundamentales de las células mesenquimales in vitro, establecidos por la sociedad internacional de terapia celular en el 2006 (**figura 14**), por su origen en el ectodermo pueden diferenciarse también a estirpes neurales (neuronas, oligodendrocitos y astrocitos).

Stefano Pagano en el año 2000, aisló células de epitelio olfatorio y las caracterizó como células precursoras neurales NPC, ya que, durante el desarrollo embrionario, las NPCs están ubicadas en la zona subventricular (SVZ), las cuales migran hacia el bulbo olfatorio (BO) (Ge et al., 2016; Pagano et al., 2000). En el 2011, Benítez King y cols. describieron un método no invasivo para el aislamiento y obtención de estas células precursoras neurales en pacientes con esquizofrenia (Benítez-King et al., 2011; Jiménez-Vaca et al., 2018), metodología actualmente empleada para otros trastornos como trastorno bipolar. Por sus características, este tipo de células constituyen un buen modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, ya que, a diferencia de otras fuentes de células mesenquimales, como el tejido adiposo, pulpa dental y médula ósea, se obtienen por un método no invasivo, accesible y sencillo (Mungenast, Siegert, & Tsai, 2016).

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS**

Existe un solo estudio proteómico cuantitativo de tipo “label free”, donde se evaluó la mutación (A431E) PSEN1 en muestras de LCR. Este estudio fue realizado por John Ringman y cols. en el 2012, para la búsqueda de biomarcadores en LCR.

---

Este estudio fue realizado en 19 individuos:

14 portadores de alguna de las 4 mutaciones siguientes causantes de EAF: 12 con mutaciones en PSEN1 (10 A431E, 1 con L235V y otra con S212Y) y 2 portadores de la mutación V717I, en APP y 5 familiares no portadores como grupo control.

Los portadores se clasificaron por sintomatología de la siguiente manera:

-10 asintomáticos (7 portadores de la mutación A431E en PSEN1, el portador de la mutación L235V en PSEN1 y los dos portadores de la mutación V717I en APP).

-4 sintomáticos (2 portadores de la mutación A431E con deterioro cognitivo leve, el portador de la mutación S212Y con demencia leve y un portador de la mutación A431E con demencia grave).

Se eliminaron las proteínas abundantes presentes en el LCR, por columna de afinidad basada en anticuerpos para albumina e IgGs, y se procedió a realizar el análisis por MS/MS. Se cuantificaron un total de 49261 iones peptídicos, de los cuales 16940 fueron asociados a 7407 péptidos que correspondieron a 600 proteínas totales.

El primer análisis comparativo se realizó entre portadores y no portadores encontrando 56 proteínas diferencialmente expresadas de las cuales, 14 ya habían sido reportadas en EA como APP, transferrina, y la glicoproteína  $\alpha 1\beta$ , componentes del complemento, el precursor de afamina, espondina 1 y plasminógeno (Abdi et al., 2006; Carrette et al., 2003; Finehout, Franck, Choe, Relkin, & Lee, 2007; Puchades et al., 2003).

El segundo análisis fue realizado entre portadores asintomáticos y no portadores con el objetivo de encontrar biomarcadores que ayuden al diagnóstico temprano de la EA. De la lista de proteínas diferencialmente expresadas (56 proteínas) del primer análisis se encontraron 41 proteínas y 38 fueron nuevas proteínas, no reportadas previamente, y sólo el receptor neuronal de pentraxina y hemopexina ya habían sido reportados en otro estudio de EA (Roher et al., 2009; Yin, Lee, Cho, & Suk, 2009). En el artículo solo se menciona que estas proteínas están involucradas en inflamación y enfermedades neurológicas y las vías involucradas están



---

relacionadas con la respuesta inmune, enfermedad metabólica y transporte. Sin embargo, el valor de “fold change” (FC) (veces de cambio), de estas proteínas fue muy bajo, de 1.18 a 1.9.

Este tipo de estudios realizados en fluidos corporales o tejidos cerebrales se hacen con el objetivo de encontrar biomarcadores de la enfermedad. La mayoría de los estudios proteómicos se han utilizado para la búsqueda de biomarcadores y targets terapéuticos, sin embargo, faltan más estudios que nos ayuden a comprender los mecanismos fisiopatológicos de la EA de manera más profunda. En nuestro caso, al tener cultivos celulares de células mesenquimales derivadas de pacientes que portan la mutación que genera la Enfermedad de Alzheimer, tenemos la oportunidad de evaluar el efecto que puede tener esta mutación sobre el perfil proteómico y fisiología de estas células, que además conservan las características de las células precursoras neurales, por lo tanto llevaremos a cabo un estudio tipo “label free” comparando la expresión de las células sin la mutación y las células portadoras de la mutación .

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Existen pocos estudios proteómicos cuantitativos reportados en la EAF, los cuales se han realizado en cerebros de individuos post mortem, plasma y LCR. En particular, solo existe un estudio proteómico en muestras de LCR de individuos portadores de la mutación A431E en el gen de la PSEN1 y no existe algún estudio o reporte que haya evaluado el perfil proteómico de células precursoras neurales ecto-mesenquimales derivadas de individuos portadores de esta mutación.

Una de las grandes desventajas de los estudios realizados en fluidos corporales o tejido cerebral, es que el origen de las biomoléculas es incierto y suelen ser muestras complejas, ya que involucran diversas zonas cerebrales y tipos celulares, o bien que en los líquidos corporales existen proteínas que son muy abundantes, las cuales deben ser eliminadas para evitar que interfieran en el análisis de los resultados. Debido a esto, la interpretación de los resultados puede ser difícil y requiere de una muestra grande de individuos.

---

Por esto, estudios proteómicos llevados a cabo con cultivos celulares prácticamente homogéneos, pueden ser de gran valor y ayudar a evaluar el aporte directo que puede otorgar una mutación específica en la fisiología celular y transpolar su posible efecto en la fisiopatología de la enfermedad.

Es por ello que el interés de nuestro laboratorio se concentra en conocer el efecto de la mutación A431E en el perfil proteómico de células mesenquimales de epitelio olfatorio derivadas de pacientes portadores, para comprender los mecanismos fisiológicos que pueden estar alterados y reconocer el papel que pudieran tener las células precursoras mesenquimales mutadas en la patología de la Enfermedad de Alzheimer.

#### **4. HIPÓTESIS**

La mutación A431E en PSEN1 causante de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), altera el perfil proteómico de las células mesenquimales precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de la mutación A431E en PSEN1 causante de la EAF en el perfil proteómico de células ecto-mesenquimales, precursoras neurales de epitelio olfatorio mediante un estudio proteómico cuantitativo tipo “label free”.

##### **Objetivos Particulares**

- Evaluar el perfil de expresión de marcadores mesenquimales de las células derivadas de individuos sanos y portadores de la mutación, por medio de citometría de flujo e inmunofluorescencia.
- Determinar y comparar los perfiles proteómicos de células ecto-mesenquimales derivadas de individuos portadores y no portadores de la mutación A431E PSEN1, por medio de un análisis cuantitativo tipo “label free”

- 
- Analizar las moléculas sobre y sub expresadas del proteoma de las células controles y portadores de la mutación, por medio de diferentes softwares para relacionarlas con sus funciones y las vías donde participan.
  - Comparar los resultados con los reportados en la literatura y determinar su papel en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.
  - Corroborar por medio de Western Blot la expresión diferencial de algunas de las proteínas que muestran alterada su expresión portadores de la mutación A431E.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### Modelo de estudio y estrategia experimental

Para la elaboración de este proyecto se utilizaron células de epitelio olfatorio derivadas de individuos portadores y no portadores de la mutación A431E en PSEN1, en fase 9. Los controles fueron pareados por edad y género. Se obtuvieron células de epitelio olfatorio de 4 individuos: 2 portadores de la mutación A431E en PSEN1, y de 2 individuos sanos.

Se realizaron dos estudios proteómicos individuales tipo “label free” (por HPLC-MS/MS), de las células ecto-mesenquimales del epitelio olfatorio (CeMEO); uno del individuo sintomático y otro del presintomático.

Posteriormente se realizó la identificación de proteínas con el Software progenesis QI y se evaluó su función con las bases de datos de uniprot y geneCards, se analizaron los resultados con diferentes softwares para analizar las vías y procesos biológicos (KEGG, PANTHER y Reactome) así como para evaluar su enriquecimiento mediante WEBGESTALT y GO.

Posteriormente, se compararon las proteínas de ambos grupos mediante diagramas de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) para ver los procesos alterados desde la condición presintomática.

Finalmente, los resultados se compararon con biomarcadores reportados en otras enfermedades neurodegenerativas, para ver si existían similitudes con algunas

proteínas alteradas en otras condiciones con alteraciones comunes usando GenAnalytics. (figura 15).

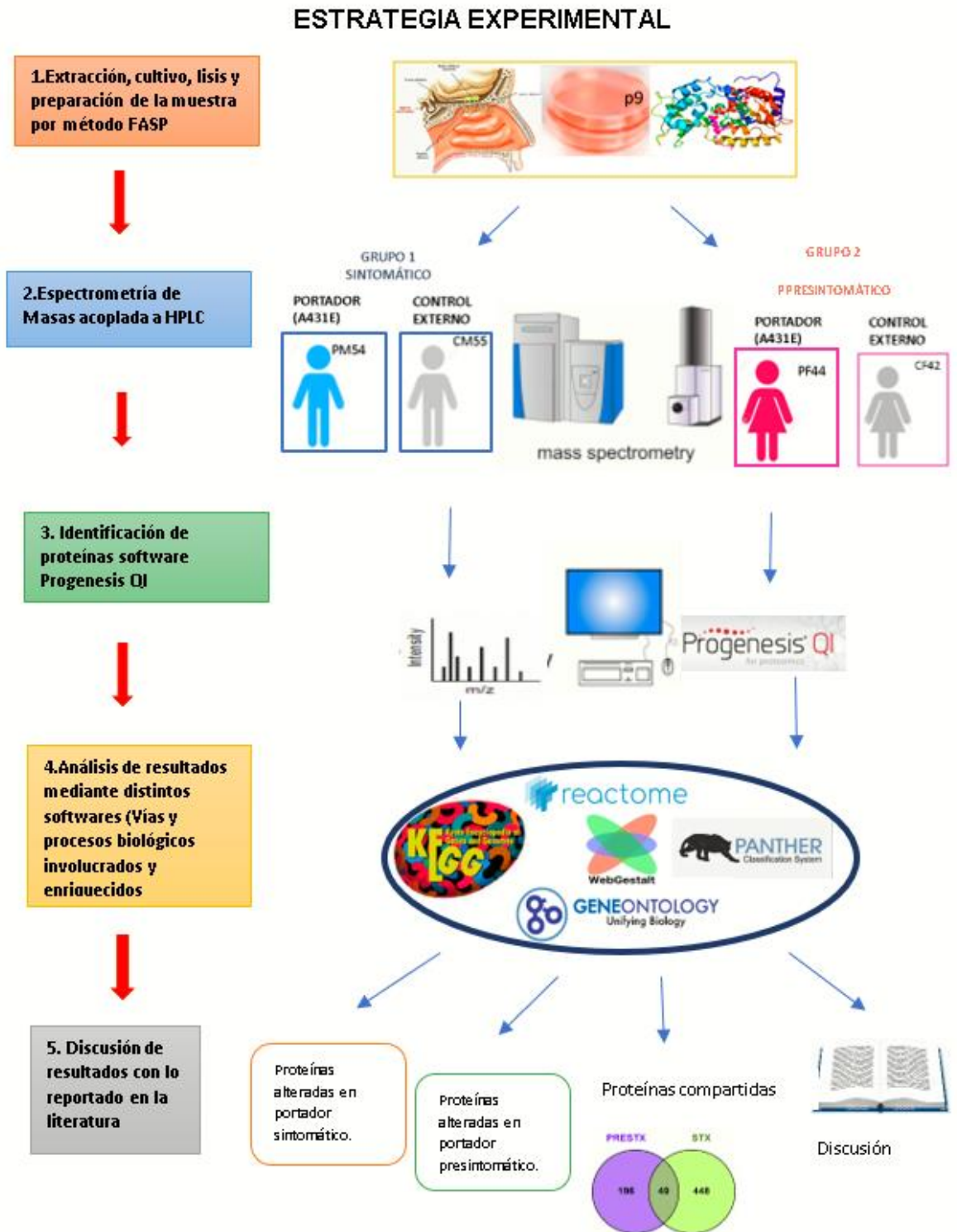


Figura 15 Estrategia Experimental del Proyecto Nomenclatura: P: portador, C:

---

Control, F: femenino, M: masculino, número: edad del individuo al momento de toma de las células. LETRAS: iniciales del nombre del individuo FASP: Filter Aided Sample Preparation HPLC: High Performance Liquid Chromatography

### **Obtención y cultivo de las células ecto-mesenquimales precursoras neurales de epitelio olfatorio**

Las células mesenquimales, precursoras neuronales del epitelio olfatorio se obtuvieron de acuerdo a la metodología reportada por Benítez King et al., en el 2011, la cual consiste en un exfoliado con un cepillo dental, a nivel de la región anterior del cornete medial (en este caso utilizamos cepillos comerciales para limpieza dental GUM azul) el cual se colocó en un tubo falcón de 15 ml con 2 ml de medio DMEM/F12 (Gibco, NY, EU), tibio, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, NY, EU), 4mM L-glutamina (2%), 100 µg/ml de estreptomicina y 100 IU/ml de penicilina (1%)(Gibco, NY, EU).

Previamente a la toma de la muestra de células, la caja p30 donde se cultivaron las células, fue tratada por 2 horas con poli-D-lisina (diluida en agua miliQ a 50mg/ml), se quitó el excedente de poli-D-lisina con PBS (2 lavados) y se despegaron las células del cepillo mediante pipeteo suave, finalmente se colocó el medio en la caja p30 y las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez que las células alcanzan el 80% de confluencia se desprendieron de la caja con tripsina verseno al 0.25% y se sembraron en cajas nuevas, se hicieron los pases necesarios, hasta llegar al pase 9. Las células se cultivaron en el mismo medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4 mM L-glutamina, 100 µg/ml de estreptomicina y 100 IU/ ml de penicilina y se realizó cambio de medio cada tercer día.

### **Citometría de Flujo**

Para los ensayos de citometría, se utilizaron aproximadamente 500,000 a 1,000,000 de células por tubo, se obtuvo el pellet centrifugando por 5 min a 1,300 rpm, y se resuspendieron en 700 ul de PBS, Se prepararon las soluciones con los anticuerpos específicos en PBS en tubos falcon: multiplicando la cantidad de Ab (la cual esta estandarizada por personal del laboratorio con concentraciones de 0.2,

0.4 o 0.5  $\mu$ l por muestra) (**tabla 2**) por el número de muestras analizadas. Se colocaron 100  $\mu$ l de células a cada tubo de citometría con sus respectivos anticuerpos y se almacenaron a 4°C hasta su lectura. Los datos se capturaron en un citómetro de flujo Fortessa (BD) y se analizaron en el programa Flowjo versión 7.6.

**Tabla 2 Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo y sus características**

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>CONJUGADO</b>	<b>CATALOGO</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>
<b>CD105</b>	0.5ul	PECy7	323217	Biolegend
<b>CD73</b>	0.5ul	BV510	563198	BD Biosciences
<b>CD90</b>	0.5ul	PECy5	555597	BD Biosciences
<b>CD45</b>	0.4ul	FITC	130-080-202	MACSMylteny Biotec
<b>CD34</b>	0.2ul	BV421	562577	BD Biosciences
<b>CD19</b>	0.5ul	PECy7	560911	BD Biosciences
<b>CD14</b>	0.4ul	FITC	561712	BD Biosciences

### **Extracción de proteína**

La extracción de proteínas se llevó a cabo con un buffer SDT (SDS al 4% (p/v), DTT 0.1 M, Tris/HCl 100 mM pH 7.6), a partir de 2 cajas p100 con células confluentes al 90% (aproximadamente de 2-3 millones de células), se tripsinizaron las células e incubaron por 3 minutos, se obtuvo el pellet de células centrifugando a 1,3000 rpm por 5 min , posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS frio para eliminar proteínas provenientes del medio. Al terminar el tercer lavado con PBS 1X se descartó el sobrenadante y se lisaron las células en tampón de lisis SDT usando una proporción 1:10 (muestra: tampón), el cual fue previamente calentado a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se sometieron a ultrasonido brevemente (Bioruptor Pico, 20°C, 10 ciclos: 30 segundos ON, 30 segundos OFF), y se clarifico por centrifugación a 16000 x g durante 5 minutos a 20°C.

---

## **Cuantificación de proteínas**

Se cuantificó utilizando el kit 2DQuant (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Este ensayo, se basa en la unión específica de los iones de cobre a la proteína. A diferencia de los métodos de cuantificación de proteínas comunes que se basan en la reducción catalizada por proteínas del ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) al ion cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) ya que estos no se pueden usar en presencia de agentes reductores como el DTT (Ditiotreitol), reactivo presente en nuestro buffer de lisis para MS.

## **Gel de poliacrilamida y tinción de gel con azul de Coomassie**

A las muestras se les agregó buffer de carga 4X y se desnaturalizaron a  $96^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Se realizó la electroforesis cargando  $20\ \mu\text{g}$  de la muestra en geles de poliacrilamida al 8 y 10% en condiciones desnaturalizantes (buffer SDS-Tris-Glicina) durante aproximadamente 120 minutos, a voltaje constante (75-85 Volts). Posteriormente el gel se tiñó con solución Azul de Coomassie durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  y se destiñó el gel con metanol, finalmente se obtuvo la imagen utilizando el equipo ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Ca, Estados Unidos).

## **Preparación de la muestra para Espectrometría de masas por el método FASP (Filter Aided Sample Preparation)**

La preparación y digestión de la muestra fue realizada de acuerdo al protocolo con filtro FASP (Wiśniewski et al., 2009), el cual fue modificado por el equipo de proteómica de LaNSE CINVESTAV. Brevemente,  $50\ \mu\text{g}$  del extracto de proteína fueron resuspendidos en  $200\ \mu\text{l}$  de urea 8 M y se colocaron en el dispositivo de filtración, se centrifugó ( a  $14000\ \times\ g$  a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 40 minutos) y posteriormente se diluyó con solución UA (urea 8 M en 0.1 M Tris/HCl pH 8.5), las muestras se centrifugaron nuevamente,  $100\ \mu\text{l}$  de solución IAA fueron añadidos (iodoacetamida 0.05 M en solución UA) para carbamidometilar las cisteínas , se mezclaron a 600 rpm en un termo-mezclador por un minuto y se incubaron por 30 minutos a  $20^{\circ}\text{C}$  en oscuridad, y se centrifugaron. Los concentrados resultantes se diluyeron con  $100\ \mu\text{l}$

---

de solución UA y se centrifugaron (este paso se repitió 2 veces) Se agregaron 100 µl de ABC (0.05M de bicarbonato de amonio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) en agua) al filtro y se centrifugo (2 veces). Finalmente se agregó la tripsina preparada en la solución ABC (relación enzima: proteína de 1:100), y se mezcló a 600rpm en el termo-mezclador durante un minuto. La digestión triptica se llevó a cabo a 37°C durante toda la noche.

Las muestras fueron centrifugadas por 10 segundos a 1000 x g. Los filtros fueron transferidos a tubos nuevos y se centrifugaron a 14000 x g a 20°C durante 40 minutos. Posteriormente se enjuagaron los filtros con 50 µl de NaCl 0.5 M y se centrifugaron nuevamente (2 veces). Se recuperaron los volúmenes remanentes en el filtro y se mezclaron los eluidos anteriores con los eluidos de los siguientes pasos, por último, se desalaron en una resina C18.

### **Espectrometría de masas**

Los péptidos resultantes se inyectaron en un espectrómetro de masas Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA) en modo MS<sup>E</sup> para calcular el área bajo la curva (AUC) del cromatograma de iones totales (TIC) y normalizar así la inyección de péptidos en la HPLC. Se cargaron en cada condición, la misma cantidad de péptidos tripticos en la precolumna Symmetry C18 Trap V/M (de 180 µm x 20 mm, con un tamaño de poro de 100 Å. y un tamaño de partícula de 5 µm). Las muestras se desalaron utilizando como fase móvil A, ácido fórmico al 0,1% (FA) en H<sub>2</sub>O y una fase móvil B, 0,1% de FA en acetonitrilo (ACN) según el siguiente gradiente isocrático: 99.9% de fase móvil A y 0.1% de fase móvil B a un flujo de 5 µL min<sup>-1</sup> durante 3 min. Posteriormente, los péptidos se cargaron y separaron en la columna HSS T3 C18 (de 75 µm x 150 mm, con un tamaño de poro de 100 Å y un tamaño de partícula de 1.8 µm) utilizando una clase M de UPLC ACQUITY con las mismas fases móviles en el siguiente gradiente: 0 min 7% B, 121.49 min 40% B, 123.15 a 126.46 min 85% B, 129 a 130 min 7% B, a un flujo de 400 nL min<sup>-1</sup> y 45 °C.

Los datos de los espectros se adquirieron en un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización (ESI) y separación de movilidad iónica (IMS) Synapt G2-Si utilizando la estrategia de adquisición independiente de datos (DIA)



---

mediante el modo HDMS<sup>E</sup> (Waters, Milford, MA). La fuente de ionización se ajustó con los siguientes parámetros: 2.75 kV en la muestra capilar, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el offset de la fuente, 70 ° C para la temperatura de la fuente, 0.5 Bar para el gas de nano flujo y 150 L hr<sup>-1</sup> para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modo positivo en un rango de datos m/z 50-2000 con una velocidad de 0.5 exploraciones s<sup>-1</sup>. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía mientras que, para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en la transferencia utilizando una rampa de energía de colisión de 19-55 V. Los archivos .raw generados se analizaron en el software DriftScope v2.8 (Waters, Milford, MA) con el objetivo de eliminar los iones con z = 1<sup>+</sup> y obtener el DrifTime de cada péptido detectado en el espectrómetro de masas para generar un archivo .rul que se utilizó para calcular una energía de colisión específica para cada péptido detectado en el modo UDMS<sup>E</sup> (en lugar de una curva como en el modo HDMS<sup>E</sup>). Con las mismas condiciones cromatográficas y de fuente utilizadas en el modo HDMS<sup>E</sup>, los péptidos trípticos para cada condición se inyectaron 3 veces (réplicas técnicas) y se aplicó el modo UDMS<sup>E</sup>.

### **Análisis de los datos**

Las intensidades de MS y MS / MS contenidas en los archivos .raw generados se normalizaron, alinearon, compararon y cuantificaron relativamente utilizando el software Progenesis QI for Proteomics v3.0.3 (Waters, Milford, MA) con una base de datos Chlorocebus sabaeus invertida (descargada de Uniprot, con 19229 secuencias de proteínas, última modificación el 16 de mayo de 2016). Los parámetros utilizados para la identificación de proteínas fueron: El uso de tripsina como proteasa específica con un solo corte permitido. Como modificación fija se estableció la carbamidometilación (C) y como modificación variable la oxidación (M), y fosforilación (S, T, Y). Además de la tolerancia automática de péptidos y fragmentos, el número de coincidencia mínimo de fragmentos iónicos por péptido fue de 2, los fragmentos iónicos por proteína mínimos fueron 5, y el número mínimo de péptidos por proteínas fue de 1, la tolerancia de masa del péptido se estableció

en un máximo de 10 ppm, y una tasa de descubrimiento falso (FDR) ≤ 4%. El FDR se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$FDR = \left( \frac{(\#Rv (\#2/3/\#3/3))}{(\#2/3/\#3/3)} \right) X 100$$

Donde:

- #Rv = número de proteínas reverse
- # 2/3= número de proteínas que se replicaron en 2 de las 3 corridas (triplicados técnicos)
- #3/3= número de proteínas que se replicaron en las 3 corridas (triplicados técnicos)

El equipo Synapt G2-Si se calibró con el fibrinopéptido [Glu<sup>1</sup>], [M + 2H]<sup>2+</sup> = 785.84261 a ≤ 1 ppm. Los resultados generados por el software Progenesis se exportaron a archivos .xmls para verificar los dos niveles de control de calidad de datos para experimentos tipo “label free” (nivel de péptidos y proteínas) de acuerdo a lo descrito por Souza et al en el 2017(Souza et al., 2017). Todas las gráficas generadas durante el control de calidad se realizaron utilizando el software Spotfire v7.0 (TIBCO, Palo Alto, CA). Las proteínas consideradas expresadas diferencialmente presentaron al menos una relación ± 0.56 (expresada como log<sub>2</sub>); lo que significa que estas proteínas tuvieron al menos ± 1.5 veces el cambio. Las muestras se adquirieron por triplicado técnico y la relación se calculó dividiendo la respuesta de señal de MS promedio de los triplicados (Top3) de cada proteína bien caracterizada en la muestra por el Top3 de cada proteína en la muestra control. Las proteínas cuantificadas se consideraron estadísticamente significativas si el valor de ANOVA p <0.05.

### **Análisis bioinformático**

Se utilizaron las bases de datos de uniprot y GeneCards para evaluar la función de las proteínas. El análisis de vías de señalización se realizó en las bases de datos de bioinformática para evaluar la función de las proteínas, como PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) para ver procesos biológicos, componentes celulares, y funciones moleculares, KEGG ([http://www.genome.jp/kegg/tool/map\\_pathway1.html](http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html)) para evaluar las vías involucradas con las proteínas desreguladas y WEBGESTALT (<http://www.webgestalt.org>), y GO (<http://geneontology.org/>) para realizar análisis de

enriquecimiento tanto de procesos biológicos como de las vías de señalización donde participan las proteínas involucradas.

El valor del enriquecimiento es determinado por los softwares mediante la siguiente fórmula:

$$E = \frac{m/n}{M/N}$$

Donde:

**m**=genes de la lista obtenida que pertenecen a la vía o al proceso biológico

**n**=genes de la lista obtenida

**M**= todos los genes que pertenecen a la vía o al proceso biológico

**N**= todos los genes de la base de datos reportados.

El diagrama de Venn se realizó con la herramienta Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) y adicionalmente se utilizó GenAnalytics (<http://geneanalytics.genecards.org>) para conocer las vías y enfermedades relacionadas con las proteínas alteradas.

## 7. RESULTADOS

### **Crecimiento de las células ecto-mesenquimales de individuos portadores de la mutación A431E en PSEN1 y sus controles.**

Para la realización de este proyecto se emplearon muestras de epitelio olfatorio de portadores de la mutación, así como de sujetos controles pareados por edad y género. Estas muestras fueron extraídas por la M. en C Rosalía Santos Mandujano.

Se utilizaron crioviales de las células en pase 4 y se expandieron hasta llegar al pase 9, pase en el cual se realizaron los experimentos de este proyecto.

**Tabla 3 Información de los individuos de donde se obtuvieron las células empleadas en este estudio.**

ID	Edad	Género	Característica	Estadio Clínico
PM54 mbo	54	Masculino	Portador	Sintomático
CM55 rgt	55	Masculino	Control	Individuo Sano
PF44 dbo	44	Femenino	Portador	Presintomática
CF42 ah	42	Femenino	Control	Individuo sano

---

Debido a que se ha reportado que en la mutación A431E el inicio de los síntomas es a partir de los 45 años se estableció que la portadora femenina de 44 años fuera considerada como presintomática.

### **Verificación de la expresión de marcadores de células mesenquimales precursoras neurales.**

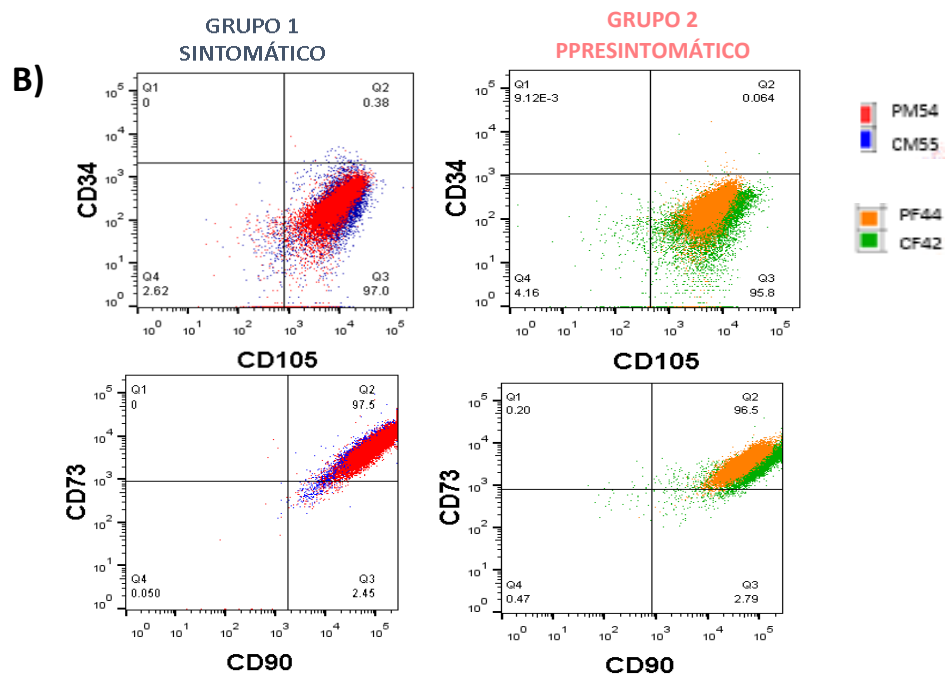
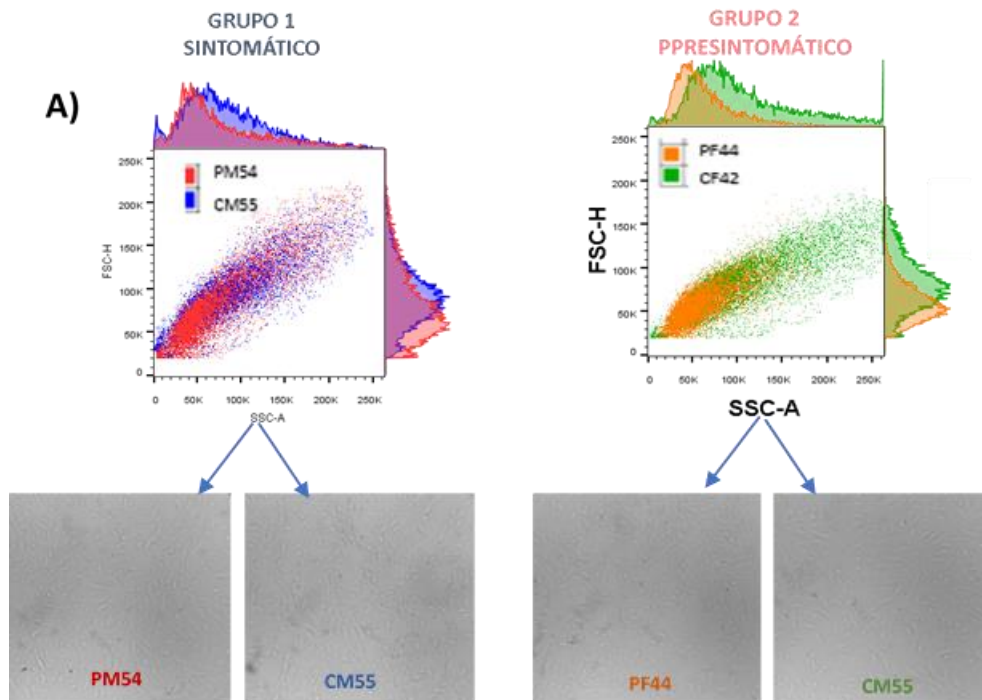
Antes de llevar a cabo el análisis proteómico de las células ecto-mesenquimales derivadas del epitelio olfatorio, procedimos a corroborar el perfil de expresión de los marcadores característicos de células mesenquimales mediante citometría de flujo, el cual consiste en demostrar la presencia de las moléculas CD105, CD73 y CD90 las células deben ser positivas para estos marcadores de superficie, y deben ser negativas en la expresión de marcadores característicos de células hematopoyéticas como: CD45, CD14, CD166 y CD19 y CD34 (**figura 14**).

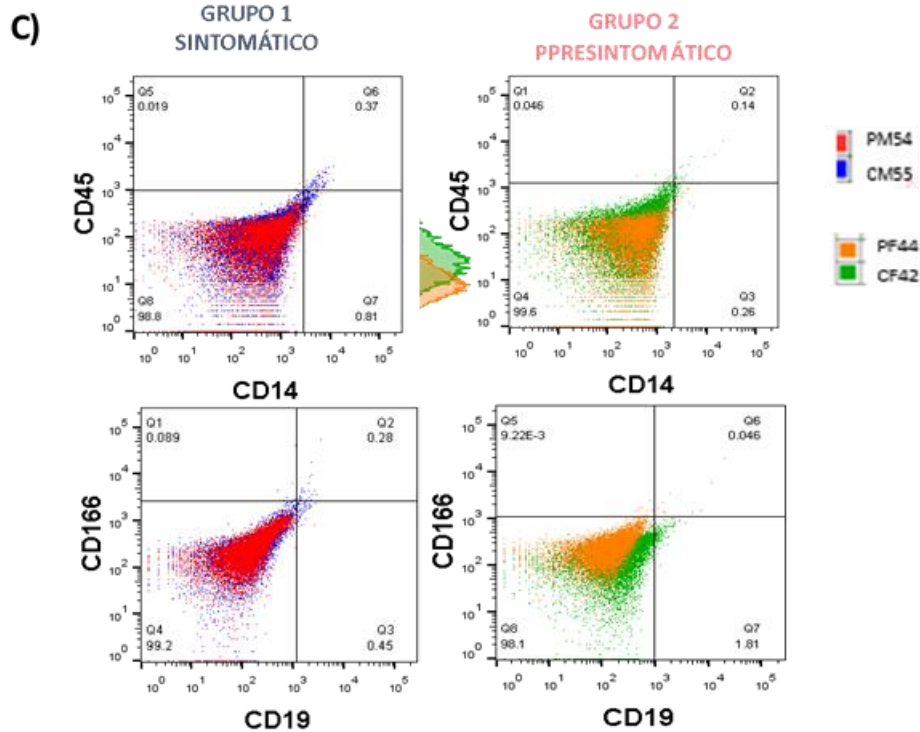
Para que un cultivo de células mesenquimales sea considerado homogéneo, al menos el 95% de la población debe expresar los marcadores positivos y menos del 2% debe expresar los marcadores del linaje hematopoyético (**figura 16**).

Teniendo en mente que para el análisis proteómico se compararían los portadores versus sus controles decidimos comparar desde la citometría de flujo ambas poblaciones celulares. Los resultados se graficaron por grupos, es decir, grupo 1 (portador sintomático PM54 con su control CM55, en rojo y azul respectivamente) y grupo 2 (portador presintomático PF44 con su control CF42 naranja y verde respectivamente). En la **figura 16A (parte superior)** donde esta graficada la granularidad (SSC-A) versus el tamaño (FSC-H) podemos observar que en ambos grupos las poblaciones son parecidas con una granularidad y tamaño muy similares, a pesar de eso en el grupo 2 se observa ligeramente una mayor diferencia entre tamaño y granularidad, siendo las células control un poco más grandes y granuladas. Lo cual se corroboró con fotografías de microscopía invertida de las células con el objetivo 40X (**figura 16A inferior**).

Además, se realizó el perfil de expresión de los marcadores positivos de células mesenquimales (CD105, CD73 y CD90), en donde más del 95% de las células

expresan estos marcadores (**figura 16B**), así como el perfil de ausencia de expresión de los marcadores hematopoyéticos o de células diferenciadas (CD34, CD19, CD45 y CD166) expresando menos del 2% estos marcadores en las 4 poblaciones (**figura 16C**).





**Figura 16 Las células de epitelio olfatorio aisladas constituyen una población homogénea y expresan el perfil de marcadores de las células mesenquimales.**

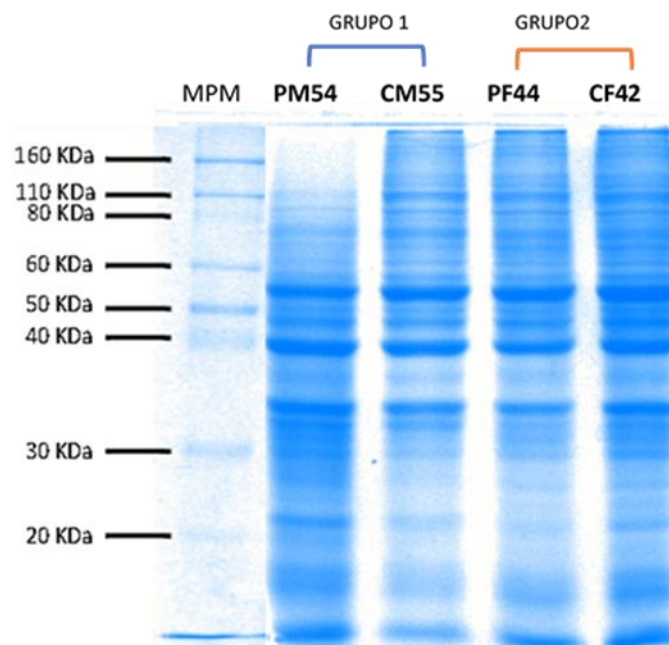
A) parte superior: Dotplots de FSC-H vs SSC-H (tamaño vs granularidad) de las células del grupo 1 Sintomático (izquierda en rojo PM54 y en azul CM55) y del grupo 2 (derecha en naranja PF44 y en verde CF42). A) Parte inferior: Imágenes de microscopía invertida con objetivo 40X B) Dotplots de doble marcaje CD34-CD105 y CD90-CD73 de ambos grupos de estudio. Donde se observa la expresión positiva de CD105, CD90 y CD73 y negativo para CD34 en las 4 poblaciones celulares. D) Dotplots de doble marcaje CD45-CD14 y CD166-CD19 negativos en las 4 poblaciones. Entre más alejado de la 0 mayor expresión del marcador, en las esquinas de cada cuadrante se observa el porcentaje del número total de células con ese marcador.

Por lo anterior podemos concluir que las células de epitelio olfatorio aisladas constituyen una población homogénea y expresan el perfil de células mesenquimales.

## Integridad de las proteínas extraídas

Después de corroborar que nuestras células son efectivamente Ce-MEO. Realizamos la extracción de proteínas con un buffer de lisis SDT (SDS al 4%, DTT 0.1 M, Tris/HCl 100 mM pH 7.6), se cuantificaron las muestras y corroboramos su integridad mediante un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 10% el cual fue teñido con azul de Coomassie (**figura 17**).

En este gel podemos observar la presencia de proteínas tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular corroborando la integridad y presencia de una buena cantidad de proteínas, por lo que procedimos a la preparación de la muestra para espectrometría de masas mediante el protocolo de FASP (Filter Aided Sample Preparation) en el cual de manera resumida permite purificar las muestras de proteínas mediante reducción y alquilación y lavados por varios filtros que liberan la proteína libre de detergente, reductores y agentes alquilantes (Véase Métodos). Una vez preparada y digerida la muestra se procedió al análisis de MS.



**Figura 17** Integridad de las proteínas evaluada en gel de poliacrilamida al 10%. Se cargaron 20µg de proteína en cada carril y se teñó con azul de Coomassie

---

## ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para determinar las proteínas que se encuentran diferencialmente expresadas en las muestras entre las células de portadores y las células de controles, los datos se adquirieron con UDMS<sup>E</sup> con el equipo Synapt G2-Si UDMS (Waters Corporation), mediante un estudio tipo “label free” (veasé métodos).

### Análisis de ms del grupo sintomático

#### Control de calidad a nivel de péptidos

Cuando se lleva a cabo un análisis proteómico, se deben evaluar distintos parámetros de control de calidad a nivel de péptidos:

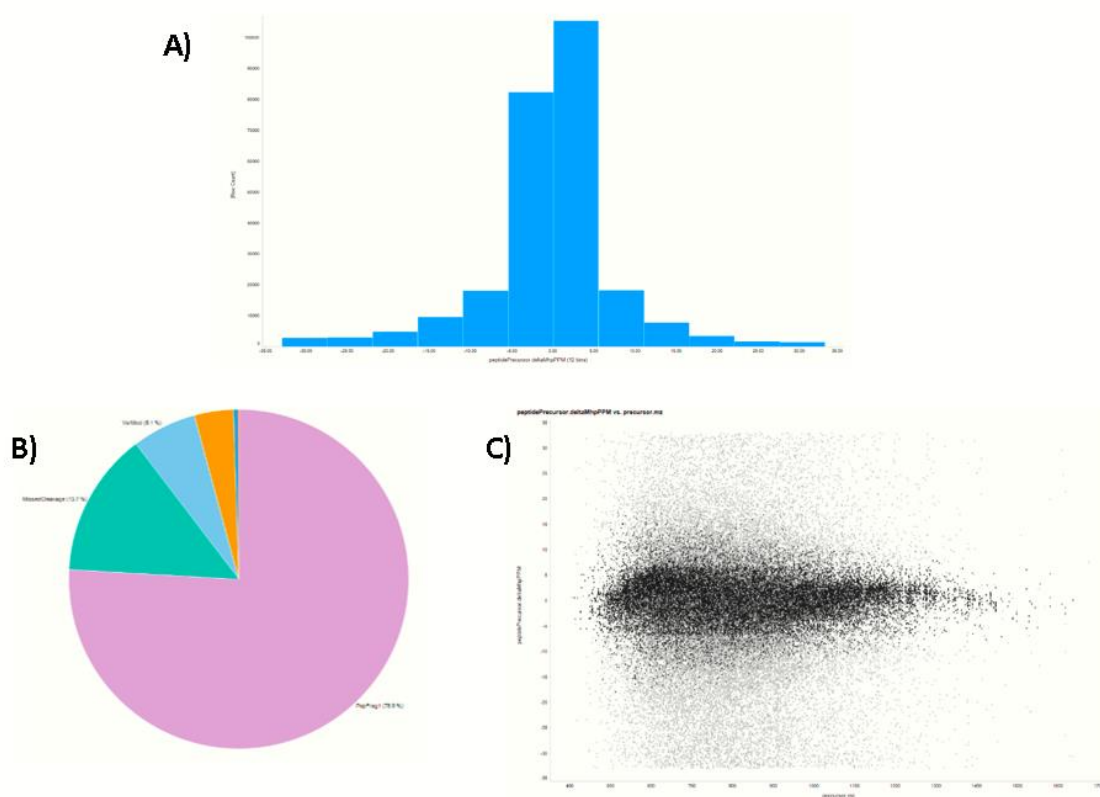
Muchos estudios proteómicos utilizan una tolerancia de masa del péptido en Da de  $\pm 0.5$ Da. Sin embargo, la compañía de Waters utiliza parámetros más estrictos utilizando ppm (partes por millón) como unidad, tomando como parámetro  $\pm 10$ ppm (al realizar la conversión;  $0.5 \text{ Da} = 907.087 \text{ ppm}$ ).

En nuestro análisis del grupo Sintomático se obtuvieron 257,971 péptidos de los cuales el 84.97% se encuentran en  $\pm 10$ ppm, ningún péptido arriba o debajo de  $\pm 34$  ppm fue utilizado en este estudio (**figura 18A**).

Para que un proteoma sea considerado de buena calidad, se debe cuidar que la mayoría de sus péptidos sean Pepfrag1 (los cuales son considerados los de mejor calidad ya que cumplen con 14 parámetros fisicoquímicos de calidad establecidos por la empresa), o por lo menos mayor al porcentaje de pepfrag2 los cuales no cumplen con dichos criterios, además el porcentaje de missed cleavage (péptidos que no se cortaron en el proceso por la tripsina) debe ser menor al 20% y no deben existir muchas modificaciones variables. En la gráfica de pastel de la **figura 18B** podemos observar los porcentajes de estos tipos de péptidos, nosotros obtuvimos un porcentaje de 75.9% de pepfrag1 el cual es considerado un porcentaje muy alto para este tipo de péptidos, 13.7% fue de missed cleavage y 6.1% de modificaciones variables. Lo cual significa que nuestra muestra es de muy buena calidad, y que el equipo fue calibrado perfectamente por el equipo técnico de LanSE



CINVESTAV. Normalmente la mayor densidad de los péptidos (aproximadamente el 70%) de una muestra tienen una relación  $m/z$  de 400-800 $m/z$ . Se eliminaron los péptidos con carga 1 ya que son considerados como posibles contaminantes y se realizó una gráfica para ver esta distribución de la relación  $m/z$  de los péptidos obtenidos, en la **figura 18C** se graficaron los péptidos de acuerdo a su  $m/z$  con respecto a las ppm encontrando que los péptidos oscilan en un rango de 400-1300  $m/z$  donde la mayor densidad de péptidos se encuentra en los rangos antes mencionados, con estos datos, se lleva a cabo la clasificación de acuerdo al tipo de péptidos encontrados; en color negro se encuentran los péptidos fragmentados 1 (pepfrag1).



**Figura 18 Evaluación de calidad a nivel de péptidos del grupo Sintomático** A) Gráfica de barras de tolerancia de error al péptido, B) grafica de pastel con los tipos de péptidos y porcentajes C) Dotplot de péptidos de acuerdo con su  $m/z$  con relación a las ppm

---

Posteriormente al análisis de calidad de los péptidos se realizó la identificación de las proteínas con el software Progenesis Qi de Waters.

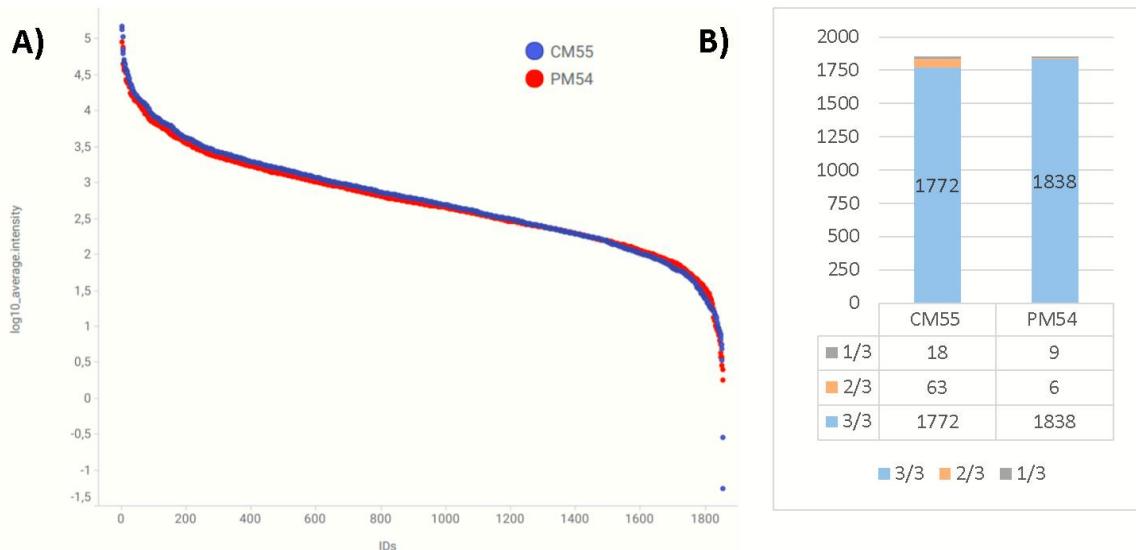
### **Control de calidad a nivel de proteínas**

Un análisis proteómico se puede llevar a cabo sólo si las muestras son similares y comparables, por lo que posterior a la evaluación a nivel peptídico se realizó otro control de calidad, pero ahora a nivel de proteínas.

Primero se analizó el rango dinámico (RD), el cual nos permite graficar el proteoma identificado en órdenes de magnitud abarcando tanto las proteínas menos abundantes como las más abundantes, para determinarlo se gráfica el  $\log_{10}$  del promedio de la intensidad sobre el ranking de proteínas por masa.

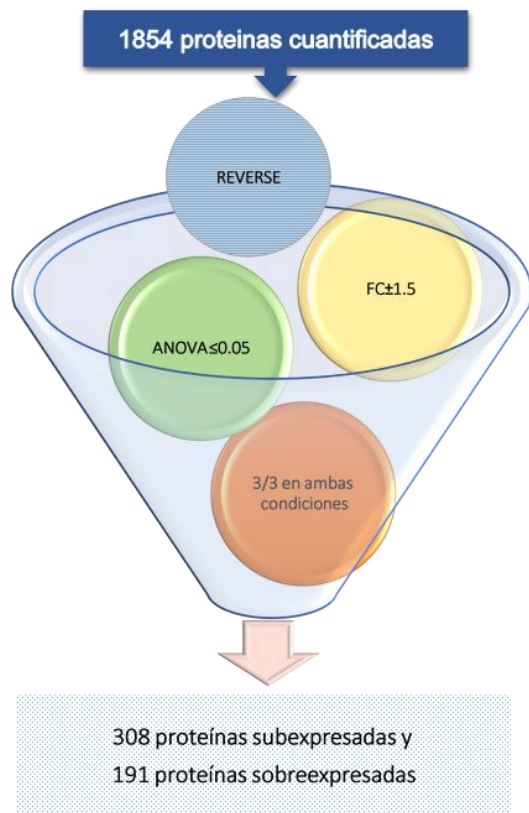
El rango dinámico del proteoma celular se aproxima a siete órdenes de magnitud, la detección mediante la espectrometría de masas cubre de 3-5 órdenes de magnitud del rango dinámico. Nuestros resultados cubrieron 6.5 órdenes de magnitud siendo el estudio proteómico con más proteínas encontradas en el servicio de LanSE CINVESTAV (**figura 19**). En la **figura 19A** graficamos los rangos dinámicos de las dos muestras observando un traslape de las proteínas lo cual nos indica que ambos proteomas son muy similares y por tanto comparables.

Se cuantificaron 1854 proteínas en el grupo Sintomático. Posteriormente también se evaluó el grado de repeticiones entre las proteínas de cada muestra, es decir, el número de proteínas que estaban presentes en las 3 réplicas del triplicado técnico (**figura 19B**), para así comparar las similitudes de expresión de las proteínas y su coeficiente de variación. En la muestra del control el 95.62 %, es decir, 1772 proteínas de las 1854 se encontraron en las 3 réplicas y en la muestra del portador sintomático el 99.1% se encontraron en las 3 réplicas. Lo cual nos habla de un grado de confianza alto en las proteínas resultantes.



**Figura 19 Evaluación de calidad a nivel de proteína del grupo Sintomático**  
 A) Gráfica de Rango Dinámico (En azul se encuentran las proteínas obtenidas en el control y en rojo las del portador) B) gráfica de barras de repeticiones por proteínas.

A esta base se le aplicaron varios filtros: el primero fue quitar las proteínas REVERSE las cuales son proteínas con secuencias invertidas o contaminantes, las cuales sirven para calcular el FDR (false Discovery Rate), el cual nos permite determinar el porcentaje de falsos positivos. Un FDR menor al 2% es lo ideal, pero puede ser de hasta 4% o algunas veces otros estudios reportan FDRs más elevados. Sin embargo, en este análisis el FDR fue de 2.8% en el portador sintomático (PM54) y de 2.5% en su control (CM55) ya que se identificaron 331 proteínas REVERSE, quedando 1523 proteínas en total.



**Figura 20 Filtros para la selección de proteínas**

---

Se consideró un fold change  $\pm 1.5$  como significativo para clasificar a las proteínas diferencialmente expresadas (365 proteínas sub-expresadas y 311 proteínas sobre-expresadas ) posteriormente se realizó otro filtro mediante ANOVA con un valor significativo  $\leq 0.05$ , dando como resultado 890 proteínas totales de las cuales 316 proteínas sub-expresadas y 215 proteínas sobre-expresadas. Y, por último, de estas se seleccionaron solamente las que se repetían en las 3 réplicas en ambas condiciones. Resultando en un total de 857 proteínas: 308 proteínas sub-expresadas y 191 proteínas sobre-expresadas (**figura 20**), lista curada con la cual se realizaron los análisis posteriores (**Anexo 1**).

Una vez curada la base de datos se procedió al análisis de las proteínas que están diferencialmente expresadas en el portador sintomático respecto a su control.

## **PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN EL PORTADOR SINTOMÁTICO**

Las gráficas de volcán son muy utilizadas en los estudios “omicos” ya que muestra la relación entre los valores p de una prueba estadística y la magnitud de la diferencia en los valores de expresión de las muestras. En el eje de las Y se grafica el “fold change” o magnitud de cambio respecto al control y en el eje de las X se representan los valores  $-\log_{10}(p)$ . Cuanto mayor sea la diferencia en la expresión de una característica, más alejado será su punto sobre el eje de las Y cuanto más significativa sea la diferencia, menor será el valor p y, por lo tanto, mayor será el valor  $-\log_{10}(p)$  ANOVA). Por lo tanto, las proteínas (puntos) con diferencias altamente significativas quedarán más alejados de la intersección de los ejes.

En la **figura 21** se muestra la gráfica de volcán de las proteínas filtradas. La magnitud de cambio se graficó como  $\log_2$  de la relación PM54/CM55 o FC debido a que existen proteínas con diferencias de expresión en la muestra del portador con respecto al control muy grandes tanto a la baja como a la alta.

En verde se encuentran las proteínas sobre-expresadas (191 proteínas), en blanco las que no tienen cambios y en rojo las proteínas sub-expresadas (308 proteínas).

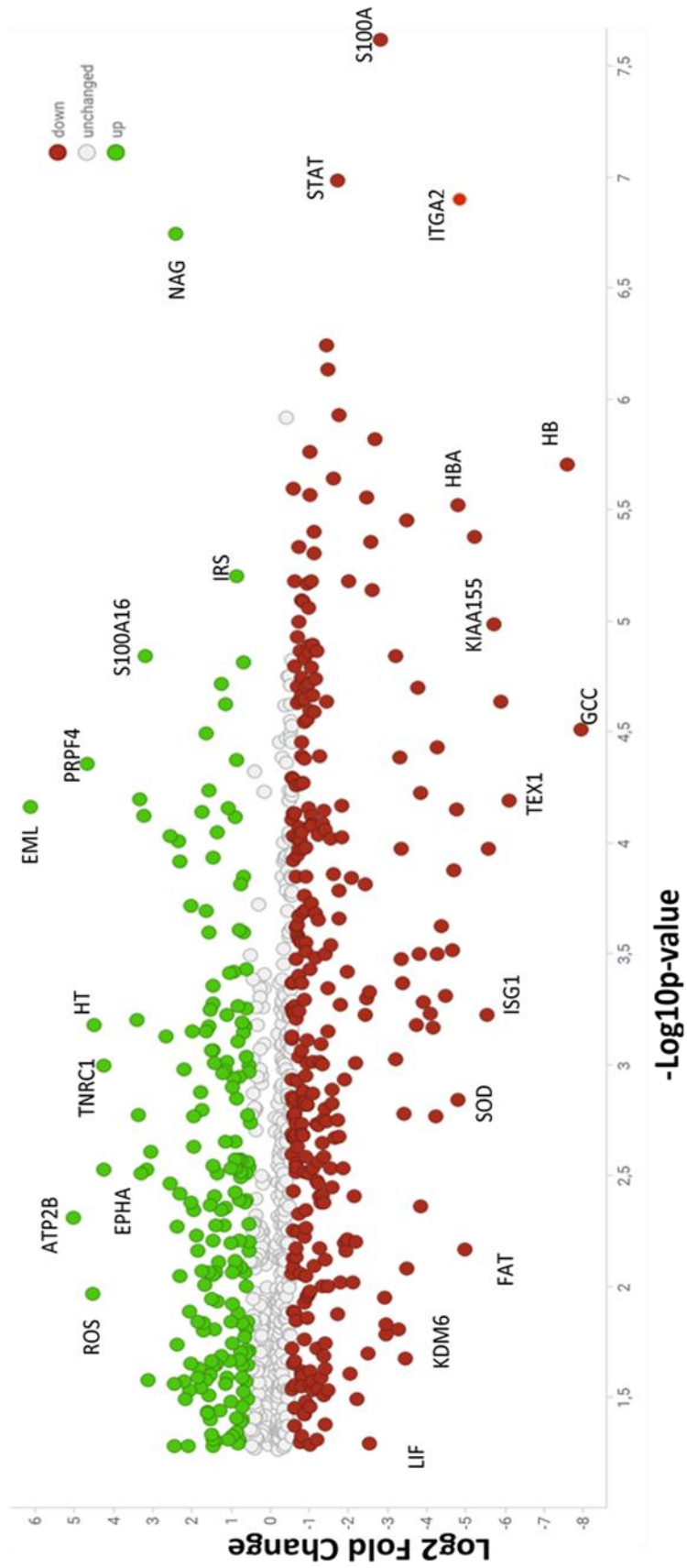


Figura 21 Gráfica de volcán de proteínas filtradas en el portador sintomático respecto a su control

La proteína sobre-expresada con mayor magnitud de cambio es EML5 (Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 5) con un valor en  $\log_2$  de 6.15 equivalente a 70.94 veces de cambio. Y la proteína subexpresada con mayor magnitud de cambio es GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) con un valor expresado en  $\log_2$  de -7.92 equivalente a -242.9 veces de cambio.

En la **tabla 4 y 5** se muestran las 15 proteínas con mayor diferencia en su expresión respecto al control, tanto de las proteínas sub-expresadas (**tabla 4**) como las sobre-expresadas (**tabla 5**) respectivamente.

**Tabla 4 Top 15 de proteínas sub-expresadas en Grupo Sintomático**

FC	ID	DESCRIPTION
-242.9	GCC2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2
-189.5	HBB	Hemoglobin subunit beta
-67.7	TXNL1	Thioredoxin-like protein 1 (Fragment)
-58.9	SERPINB2	Plasminogen activator inhibitor 2
-52.0	KIAA1551	Uncharacterized protein KIAA1551
-46.5	TEX14	Inactive serine/threonine-protein kinase TEX14
-45.8	ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15
-37.1	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
-30.9	FAT2	Protocadherin Fat 2
-27.6	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)
-27.2	SOD2	Superoxide dismutase [Mn] <sub>2</sub> mitochondrial
-26.9	ITGA2	Integrin alpha-2
-25.5	CAPG	Macrophage-capping protein
-24.9	GNAO1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
-21.8	RAD51AP2	RAD51-associated protein 2

**Tabla 5 Top 15 de proteínas sobre-expresadas en Grupo Sintomático**

FC	ID	DESCRIPTION
70.9	EML5	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5
32.8	ATP2B3	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3
25.9	PRPF4B	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
23.6	ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
23.2	HTT	Huntingtin
19.5	TNRC18	Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein
19.2	EPHA3	Ephrin type-A receptor 3
10.7	RPL31	cDNA FLJ57527_ highly similar to 60S ribosomal protein L31
10.5	FASTKD3	FAST kinase domain-containing protein 3_ mitochondrial

10.4	DSCAML1	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1
9.9	TOGARAM1	KIAA0423_ isoform CRA_a
9.4	SVEP1	Sushi_ von Willebrand factor type A_ EGF and pentraxin domain-containing protein 1
9.3	S100A16	Protein S100-A16
9.0	C12orf71	Uncharacterized protein C12orf71
8.9	PLCG2	Phosphoinositide phospholipase C

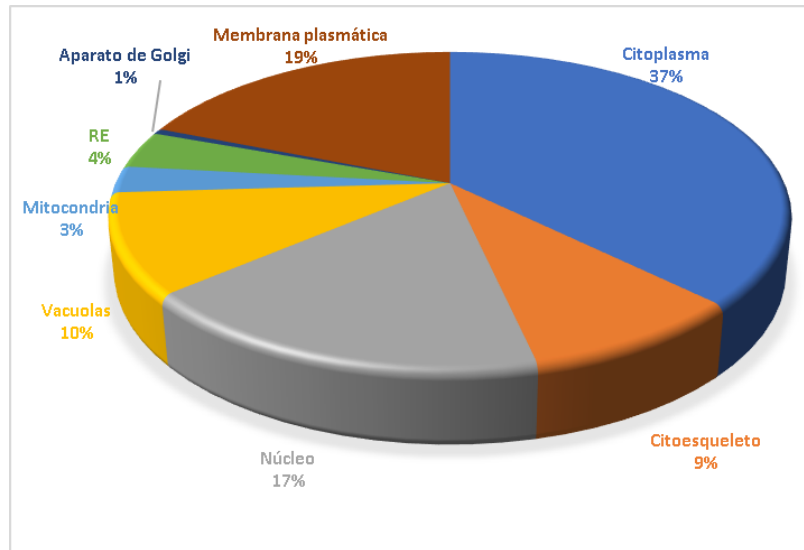
Además, de estas proteínas se reportaron 3 proteínas únicas de la muestra del control (CM55) y 11 proteínas únicas del portador (PM54) (**Tabla 6**), cuyas funciones se discutirán más adelante.

**Tabla 6 Proteínas únicas del grupo Sintomático**

<i>CONDICIÓN</i>	<i>ID</i>	<i>DESCRIPCIÓN</i>
<b>CM55</b>	COL13A1	Collagen alpha-1(XIII) chain
	ARHGAP18	Rho GTPase-activating protein 18
	MYH15	Myosin-15
<b>PM54</b>	PIGN	GPI ethanolamine phosphate transferase 1
	ATP5PF	ATP synthase-coupling factor 6_ mitochondrial
	MCPH1	Microcephalin
	WDR62	WD repeat-containing protein 62
	CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2
	SCUBE2	Signal peptide_ CUB and EGF-like domain-containing protein 2
	ANKRD36C	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C
	HIST1H1B	Histone H1.5
	UTY	Histone demethylase UTY
	KIAA0825	Uncharacterized protein KIAA0825
	KIF5C	Kinesin heavy chain isoform 5C

Una vez que conocíamos las proteínas diferencialmente expresadas se averiguamos las funciones biológicas en las cuales están involucradas estas proteínas mediante diferentes softwares y bases de datos online como Panther, KEGG y reactome para analizar procesos biológicos y vías de señalización involucradas, así como sus enriquecimientos mediante webgestalt y GO. Estas bases de datos mediante diferentes algoritmos permiten agrupar a los genes o en este caso proteínas de acuerdo con las vías y procesos biológicos en común.

Primero mediante PANTHER evaluamos los componentes celulares donde se encuentran las proteínas diferencialmente expresadas, realizamos una gráfica de pastel donde podemos observar que existen proteínas alteradas en los diversos organelos celulares (**figura 22**).



**Figura 22 Componentes celulares de las proteínas alteradas en el portador Sintomático**

## **PROCESOS BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS CON LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN EL PORTADOR SINTÓMATICO**

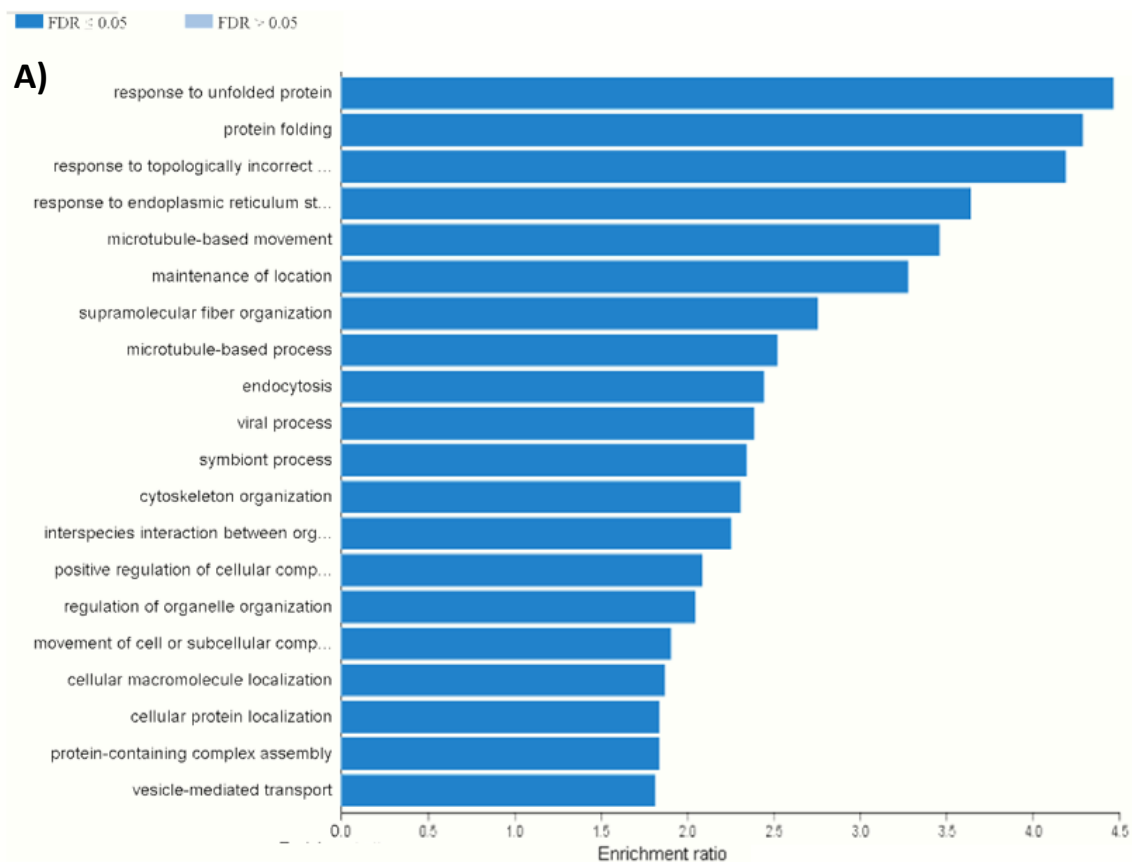
Para evaluar los procesos biológicos que podrían estar alterados en las células portadoras de la mutación A431E PSEN1, utilizamos el software webgestalt, realizamos dos gráficas; una donde incluimos todas las proteínas diferencialmente expresadas y otra donde se analiza por separado las proteínas sobre-expresadas y sub-expresadas (**figura 23**).

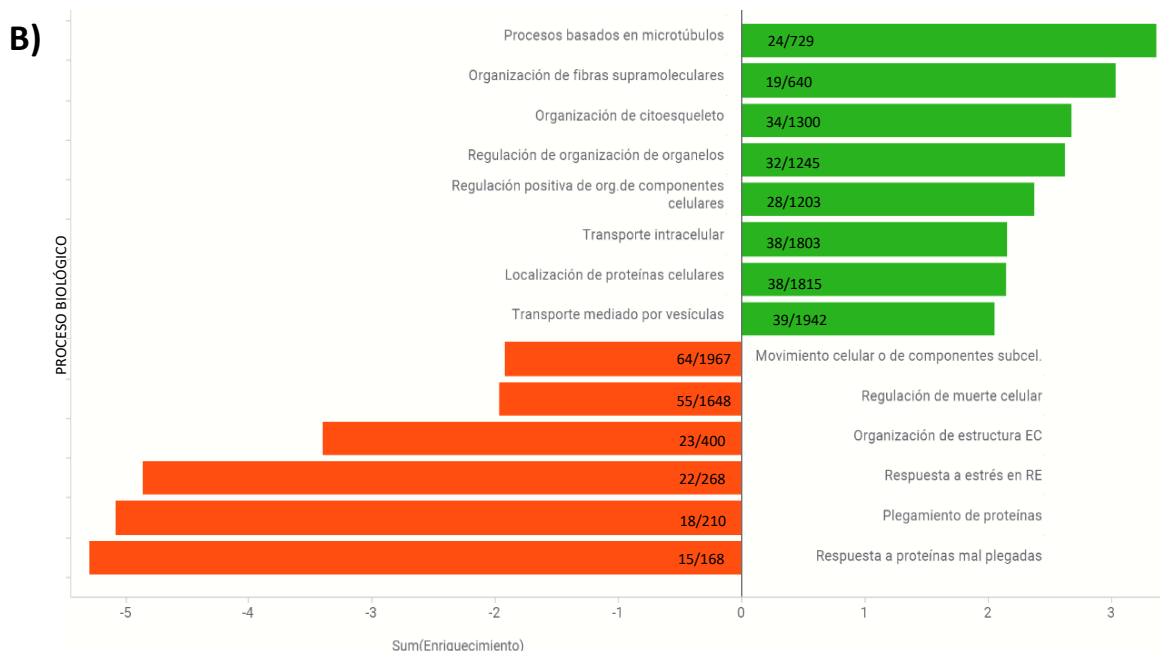
Para realizar la **figura 23A** ingresamos al software las 499 proteínas alteradas (308 sub-expresadas y 191 sobre-expresadas), donde se identificaron 497 de las 499. Y se graficaron los 20 procesos biológicos más significativos. Los procesos biológicos involucrados tienen que ver con el plegamiento y procesamiento de proteínas, la organización del citoesqueleto y el transporte intracelular y vesicular.



En la **figura 23B** se encuentran graficados los procesos biológicos alterados en relación con las proteínas sobre-expresadas (barras verdes) y sub-expresadas (barras rojas). Donde se observa que el enriquecimiento es mucho mayor en el análisis de las proteínas sub-expresadas. Dentro de cada barra se encuentra el número de proteínas de nuestra lista que concuerdan con las proteínas del proceso biológico, sobre el número de proteínas reportadas hasta ahora involucradas en ese proceso biológico.

Como conclusión, las proteínas sub-expresadas en las células del portador sintomático tienen que ver con procesos biológicos relacionados con el mal plegamiento y procesamiento de proteínas, mientras que las proteínas sobre-expresadas tienen que ver con procesos biológicos relacionados con el transporte celular y la organización del citoesqueleto.





**Figura 23 Procesos biológicos posiblemente alterados en el portador Sintomático** A) top 20 de procesos biológicos resultantes en el software webgestalt con todas las proteínas diferencialmente expresadas. B) Procesos biológicos analizados por separado de las proteínas sobreexpresadas (barras en verde) y subexpresadas (barras en rojo).

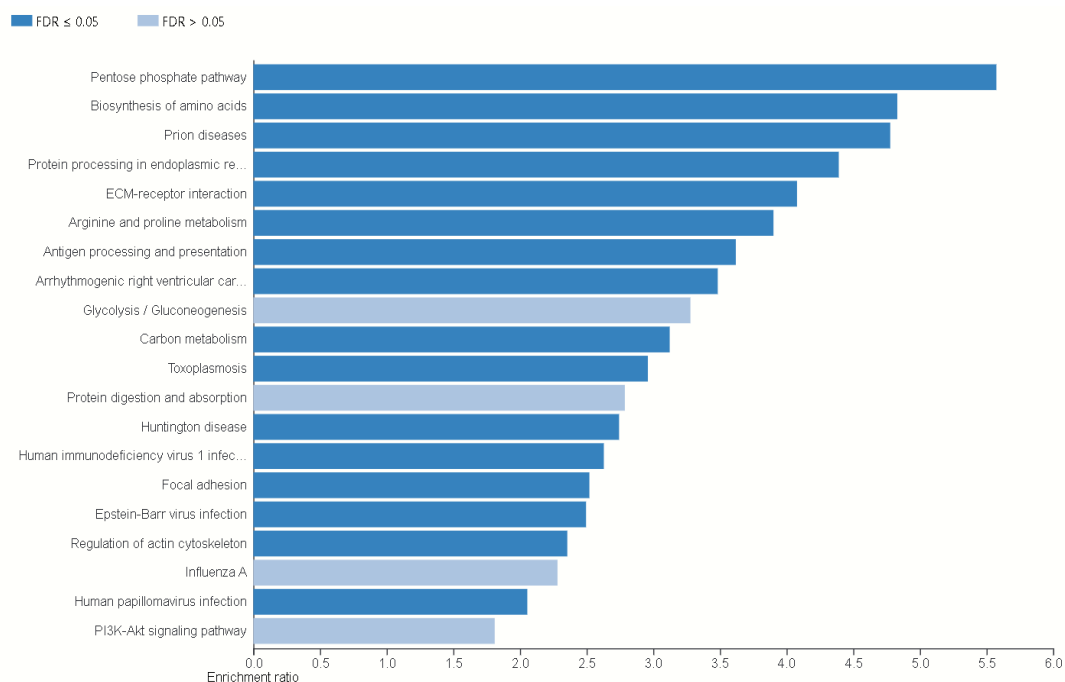
## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADOS CON LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN EL PORTADOR SINTÓMATICO

A continuación, mediante KEGG buscamos las vías de señalización involucradas y por número de proteínas de la vía donde los resultados arrojaron las siguientes vías:

Procesamiento de proteínas en RE con 26 genes involucrados, la vía de PI3K-Akt con 25 proteínas, adhesiones focales, la vía de la enfermedad de Huntington y la regulación de citoesqueleto de actina tuvieron 19 proteínas, endocitosis con 17 genes, e intencionalmente buscamos otras vías como apoptosis con 9, enfermedad de Alzheimer con 7 y el proteasoma con 6 proteínas en común.

Sin embargo al realizar el enriquecimiento mediante webgestalt con la base de datos de KEGG el top 20 de las vías de señalización en las cuales están involucradas estas proteínas se grafican en la **figura 24**, dentro de las principales

se encuentra la vía de las pentosas fosfato, la biosíntesis de aminoácidos, enfermedades priónicas, nuevamente procesamiento de proteínas en RE, procesamiento y presentación de antígeno, glicolisis, enfermedad de Huntington, adhesiones focales, regulación del citoesqueleto de actina y la vía de señalización de PI3k-Akt.



**Figura 24 Vías de señalización enriquecidas en el portador sintomático** mediante el software webgestalt con la base de datos de KEGG en color azul claro se encuentran las vías de señalización no significativas con un  $FDR < 0.05$  y de azul oscuro las que tienen un  $FDR > 0.05$ .

El software de webgestalt también integra la base de datos de PANTHER, Reactome y Wikipathways, por lo que realizamos el enriquecimiento de igual forma el con esas bases de datos para identificar las vías en común. Por lo que realice una tabla donde integro las vías de señalización compartidas o parecidas entre las diferentes bases de datos comparándolas con los resultados obtenidos con la base de datos de KEGG (**tabla 7**).

El análisis con la base de datos de PANTHER también arrojó las siguientes vías de señalización: MAPK, vías de señalización de algunos factores de crecimiento como

la vía de VEGF (factor de crecimiento endotelial Vascular), EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidermal) y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) las cuales son vías involucradas en proliferación, migración, mantenimiento y diferenciación celular. En el análisis de Reactome y wikipathways debido al FDR calculado ninguna es significativa (FDR>0.05) sin embargo hay vías en común.

Como dato interesante Reactome arrojó también la vía de señalización de guía axonal la cual está bien establecida en la literatura su alteración en las enfermedades neurodegenerativas, y vía de interferón  $\alpha/\beta$ .

Y por último en wikipathways también se encuentra la vía de VEGF y TGF $\beta$ , estriado y vía de señalización de Interferones tipo 2., además de la regulación de Calcio.

**Tabla 7 Vías de señalización en común entre las diferentes bases de datos mediante software webgestalt**

BASE	ID de Vía	VÍA DE SEÑALIZACIÓN	ENRIQ
PANTHER	P02762	Vía de las pentosas fosfato	5.19
	P00024	Glicolisis	4.89
	P00016	Regulación de citoesqueleto de actina mediado por Rho GTPasas	2.04
	P00034	Vía de integrinas	2.1
	P00029	Enfermedad de Huntington	1.77
	P00031	Inflamación mediada por citocinas	1.66
Reactome	R-HSA-71336	Vía de pentosas fosfato	10.6
	R-HSA-109581	Apoptosis	3.4
	R-HSA-1474244	Organización de matriz extracelular	2.89
	R-HSA-2262752	Respuesta celular a estrés	2.28
	R-HSA-5653656	Transporte mediado por vesículas	2.01
Wikipathways	WP2911	Receptores-Matriz extracelular	4.86
	WP2864	Apoptosis	3.8
	WP183	Degradación de proteasoma	3.6
	WP51	Citoesqueleto de actina	2.2
	WP3932	Adhesiones focales PI3k-Akt.-mTOR	1.9

En conclusión, las vías alteradas más comunes entre las diferentes bases de datos son, la vía de pentosas fosfato, regulación de citoesqueleto, matriz EC y apoptosis (encontrándose en 3 de las 4 bases), glucolisis, Enfermedad de Huntington y la vía

---

de señalización de PI3k-Akt (en dos de las 4 bases). Estos datos apuntan a que existe una estrecha relación con los mecanismos fisiopatogénicos de la EA lo cual se discutirá más adelante.

Posteriormente se procedió a realizar el análisis de espectrometría de Masas del grupo presintomático (PF44 con su control CF42), para evaluar si estos procesos y vías alteradas se mantienen y si se deben a un efecto de la mutación en sí o si son dependientes del estadio clínico.

## **ANALISIS DE MS DEL GRUPO PRESINTOMÁTICO**

### **Control de calidad a nivel de péptidos**

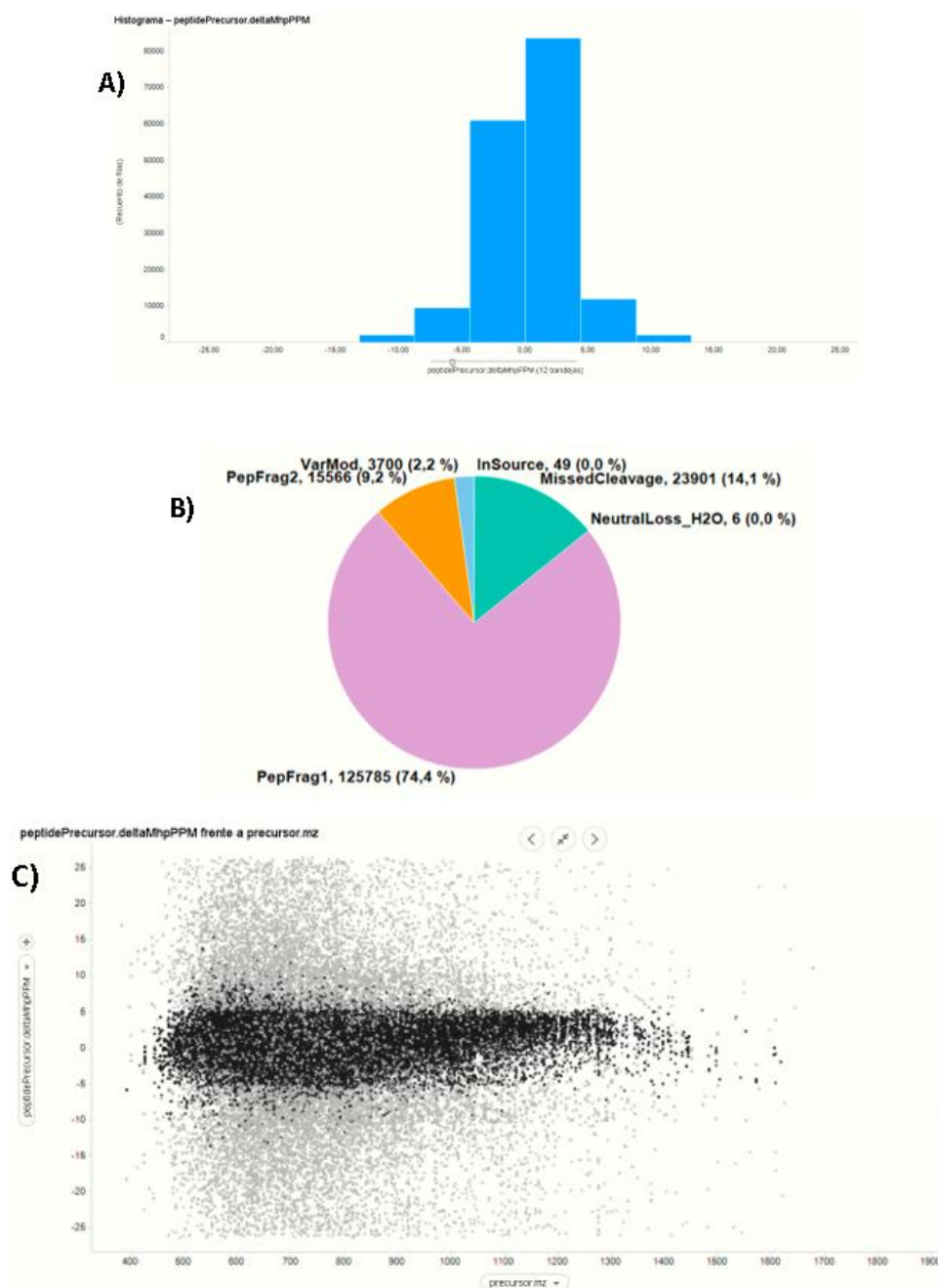
En este grupo se obtuvieron 185,973 péptidos de los cuales el 90.87% (169,014 péptidos) se encuentran en un rango de  $\pm 10$ ppm (**figura 25A**), el porcentaje de pepfrag1 fue del 74.4%, de pepfrag2 de 9.2% y el porcentaje de escisiones perdidas fue de 14.1% con un 2.2% de modificaciones variables (**figura 25B**), además la mayor densidad de los péptidos de igual manera se encuentra en rangos adecuados (400-1450 m/z) (**figura 25C**). Estos resultados nos indican una buena calidad a nivel de péptidos por lo que procedimos, al igual que en el análisis del grupo Sintomático es realizar el control de calidad a nivel de proteínas.

### **Control de calidad a nivel de proteínas**

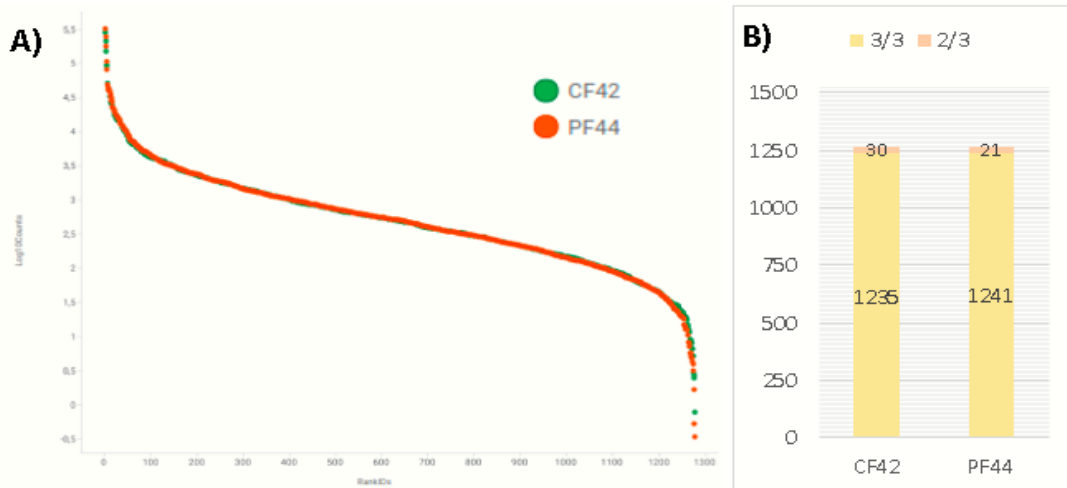
A diferencia del grupo Sintomático en este análisis primero realizamos el filtrado de la base de datos de la misma manera que el grupo uno (**figura 20**). Se cuantificaron 1543 proteínas 266 fueron reverse, las cuales se eliminaron de la lista quedando 1277 proteínas. El rango dinámico se realizó a partir de esta lista, el cual fue de 6 ordenes de magnitud un poco menor que en el análisis del grupo sintomático, en la **figura 26A** muestro la gráfica de los rangos dinámicos de las dos muestras (control en verde y portadora en naranja) los cuales están traslapados indicando que ambos proteomas son muy similares y por tanto comparables.

Posteriormente analice el número de repeticiones de cada proteína (**figura 26B**) donde el 96.7% (1235 proteínas) y el 97.1% (1241 proteínas) del control y la

portadora respectivamente estuvieron presentes en las 3 réplicas, obteniendo un grado de confianza elevado en las proteínas resultantes.



**Figura 25 Evaluación de calidad a nivel de péptidos del grupo Presintomático**  
A) Gráfica de barras de tolerancia de masa al péptido, B) gráfica de pastel con los tipos de péptidos y porcentajes C) Dotplot de péptidos de acuerdo con su m/z con relación a las ppm



**Figura 26 Evaluación de calidad a nivel de péptidos del grupo Presintomático**  
 A) Gráfica de Rango Dinámico (En verde se encuentran las proteínas obtenidas en el control y en naranja las del portador) B) grafica de barras de grado de repeticiones.

El FDR fue de 1.75% en el control y de 1.72% en el portador. Al realizar el segundo filtro del fold change  $\pm 1.5$  obtuvimos 226 proteínas sub-expresadas y 197 proteínas sobre-expresadas, posteriormente se realizó el tercer filtro mediante el valor de ANOVA  $\leq 0.05$ , dando como resultado un total de 164 proteínas sub-expresadas y 120 proteínas sobre-expresadas, por último, se filtraron los datos con las proteínas que se repitieron 3 veces en ambas condiciones.

## PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA PORTADORA PRESINTOMÁTICA

La lista final de proteínas fue de 611 proteínas totales, 354 sin cambios y 257 alteradas, de las cuales 151 estaban sub-expresadas y 106 sobre-expresadas (**anexo 2**). Además, los datos arrojaron 20 proteínas únicas en el control y 12 en el portador (**tabla 8**).

En la **figura 27** se muestra la gráfica de volcán de las proteínas filtradas. Al igual que en la gráfica del grupo sintomático las proteínas sobre-expresadas se encuentran en verde y las sub-expresadas en rojo. El valor más alto de magnitud de cambio (FC) en las proteínas sobre-expresadas fue de 35 el cual corresponde

a la proteína COPS8 (COP9 signalosome complex subunit 8) con un valor en log2 de 5.1 Y la proteína subexpresada con mayor magnitud de cambio KDR (con un valor expresado en log2 de -5.6 equivalente a -49.7 veces de cambio respecto a su control.

**Tabla 8 Proteínas únicas del grupo Presintomático**

<b>CONDICIÓN</b>	<b>ID</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>CF42</b>	STX12	Syntaxin-12 (Fragment)
	CSMD1	CUB and sushi domain-containing protein 1
	ATP13A2	Cation-transporting ATPase 13A2 (Fragment)
	MLH3	DNA mismatch repair protein Mlh3 (Fragment)
	PPP1R12B	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B
	LRP4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
	ANKRD17	Ankyrin repeat domain-containing protein 17
	CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
	ACO1	Cytoplasmic aconitate hydratase
	ITGB8	Integrin beta-8
	PREP	Prolyl endopeptidase
	EPHB3	Ephrin type-B receptor 3
	PDE4C	cAMP-specific 3'_5'-cyclic phosphodiesterase 4C
	GRM2	Metabotropic glutamate receptor 2
	ADAMTS13	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13
	ANKRD13B	Ankyrin repeat domain-containing protein 13B
	ASCC3	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
	RDH11	Retinol dehydrogenase 11
RAB3GAP2	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit	
LNPEP	Leucyl-cystinyl aminopeptidase	
<b>PF44</b>	FCHO1	F-BAR domain only protein 1
	DYNLRB1	Dynein light chain roadblock-type 1
	RTRAF	RNA transcription_ translation and transport factor protein
	BIN3	Bridging integrator 3
	ATP5H	ATP synthase subunit d_ mitochondrial
	YARS	Tyrosine--tRNA ligase_ cytoplasmic
	CNBP	Cellular nucleic acid-binding protein
	CUL9	Cullin-9
	PROX1	Prospero homeobox protein 1
	HLA-B	HLA class I histocompatibility antigen_ B-38 alpha chain
	DIP2C	Disco-interacting protein 2 homolog C
	TIMM13	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim13
	KIF5C	Kinesin heavy chain isoform 5C



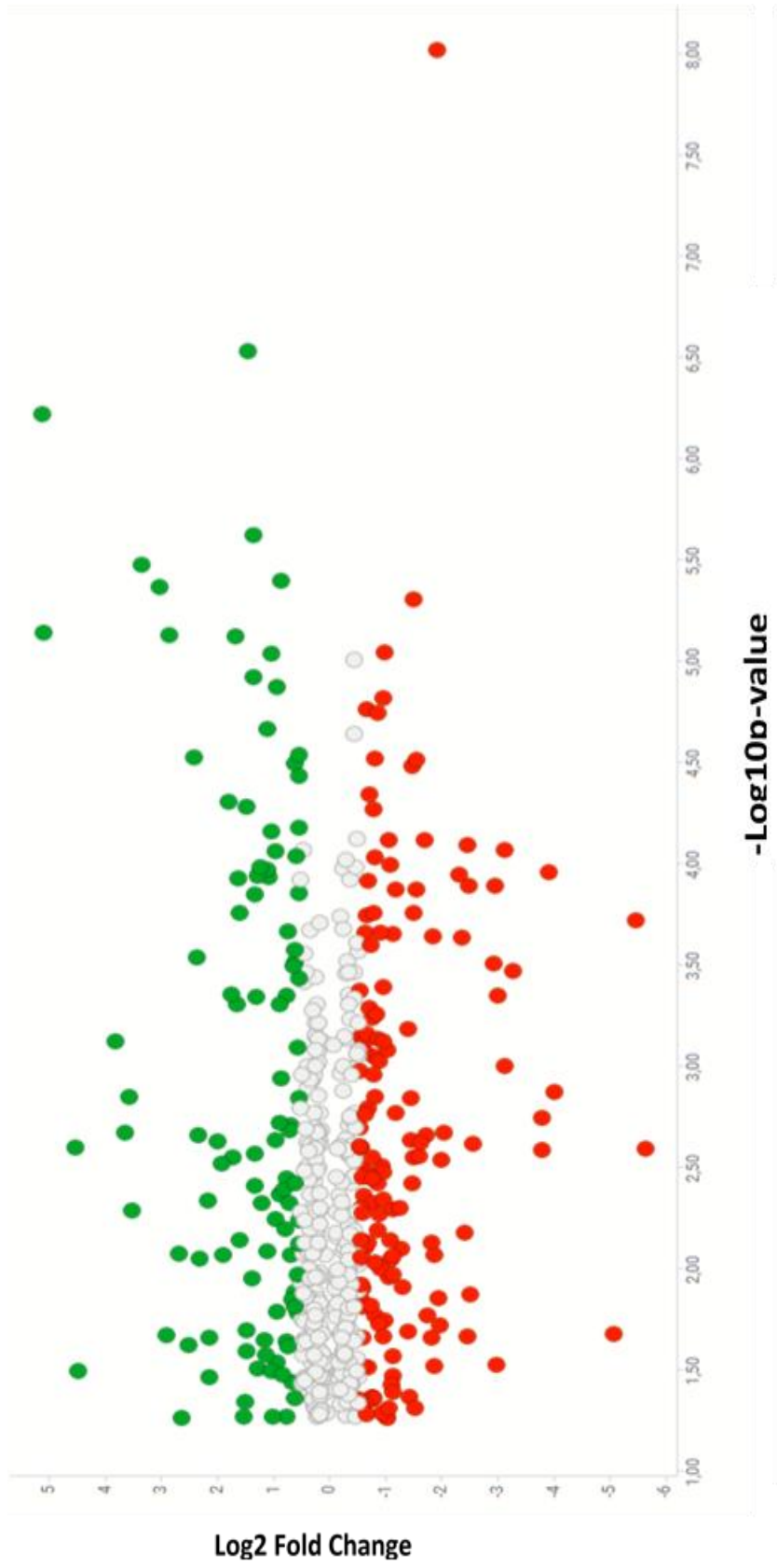


Figura 27 Gráfica de volcán de proteínas filtradas en el portador presintomático respecto a su control

En la tabla 9 y 10 se muestra el top 15 de las proteínas sobre-expresadas y sub-expresadas de este grupo.

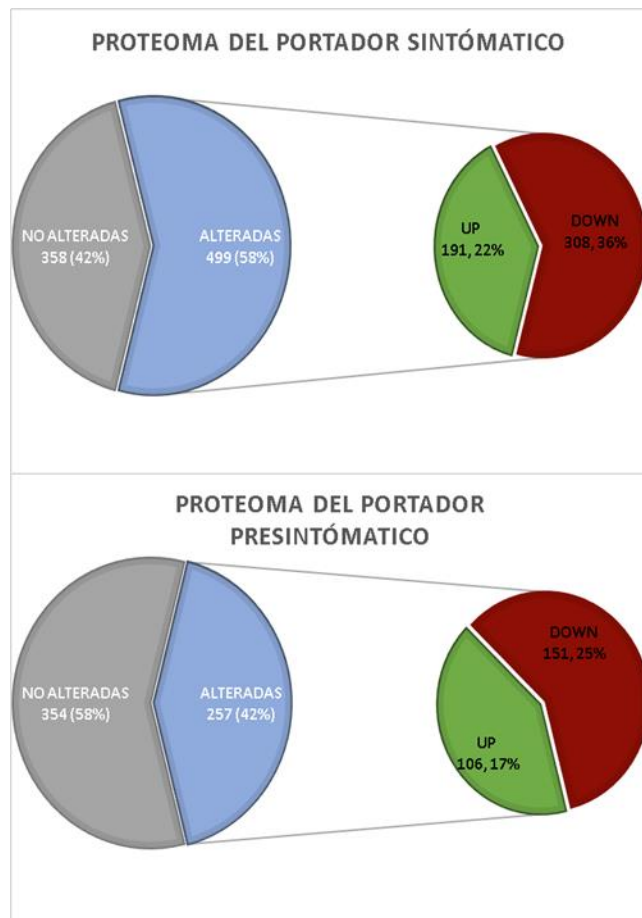
**Tabla 9 Top 15 de proteínas sobre-expresadas en el grupo presintomático**

FC	ID	DESCRIPTION
35.0	COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8
34.3	CSF1R	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor
23.1	FAM129A	Protein Niban
22.6	CRYBG3	Very large A-kinase anchor protein
14.1	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)
12.6	TLDC1	TLD domain-containing protein 1
11.9	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
11.5	GRN	Granulins (Fragment)
10.3	FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A
8.2	ALB	Serum albumin
7.6	PLXND1	Plexin-D1
7.3	OLA1	Obg-like ATPase 1
6.4	SBNO1	Protein strawberry notch homolog 1
6.2	DCLK1	Serine/threonine-protein kinase DCLK1
5.7	G3BP2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2

**Tabla 10 Top 15 de proteínas sub-expresadas en el grupo presintomático**

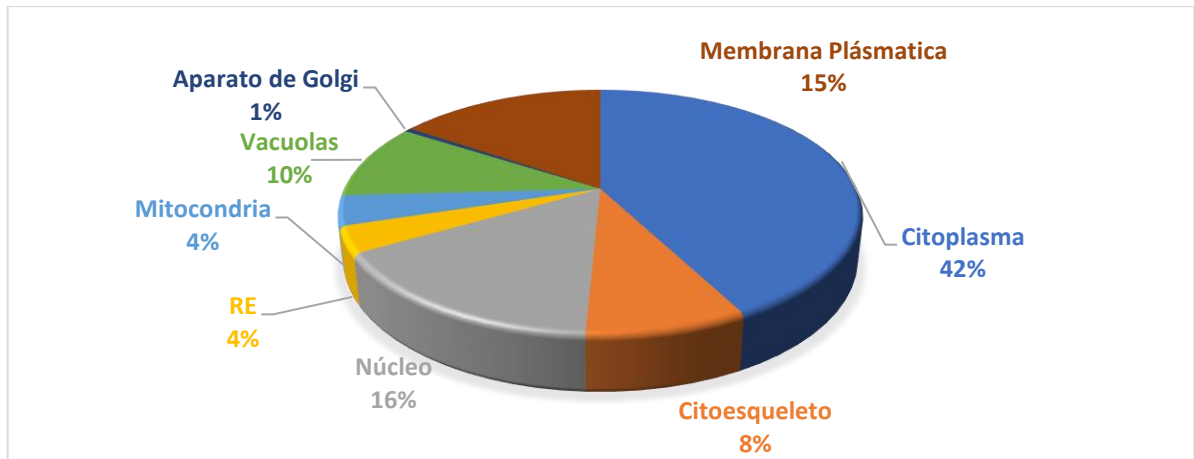
FC	ID	DESCRIPTION
-49.7	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2
-44.2	CHD1L	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like
-33.5	BEND3	BEN domain-containing protein 3
-16.0	COLEC12	Collectin-12
-14.9	SCIN	Adseverin
-13.9	CRMP1	Dihydropyrimidinase-related protein 1
-13.7	TUBA4B	Putative tubulin-like protein alpha-4B
-9.7	EEF1E1-BLOC1S5	EEF1E1-BLOC1S5 readthrough (NMD candidate)
-8.8	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
-8.7	TICRR	Treslin
-8.0	GLOD4	Glyoxalase domain-containing protein 4
-7.9	IGFN1	Isoform 5 of Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1
-7.8	MYH10	Myosin-10
-7.6	NTRK2	BDNF/NT-3 growth factors receptor
-5.9	PGK2	Phosphoglycerate kinase 2

Al comparar estos resultados con los del grupo sintomático, podemos observar que en el grupo sintomático hay una mayor cantidad de proteínas alteradas con relación a su control, el 58% de las proteínas de la lista final (la mayoría) resultaron diferencialmente expresadas en el grupo sintomático (**figura 28A**). Mientras que en el grupo presintomático menos de la mitad de las proteínas (42%) resultaron alteradas (**figura 28B**). Además, se puede observar una mayor alteración en la expresión de proteínas en las células del portador sintomático, ya que como mencione anteriormente los valores más altos de FC en este grupo fueron de 70 en las proteínas sobre-expresadas y de -242 en las sub-expresadas versus los valores del grupo presintomático de 35 y 49 respectivamente. Estos datos sugieren que la expresión diferencial y magnitud de las proteínas puede ser dependiente del estadio clínico de la enfermedad.



**Figura 28** Porcentaje de proteínas alteradas en los portadores de la mutación A431E A) portador sintomático B) portador presintomático

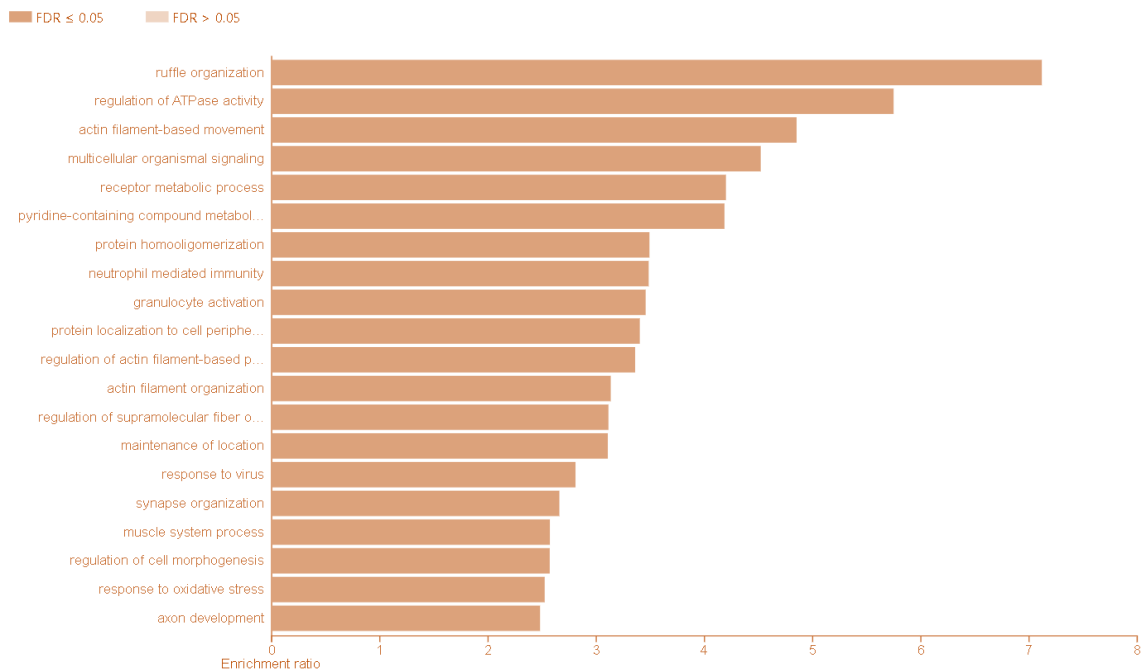
Posteriormente se realizó al análisis de componentes celulares con PANTHER (**figura 29**), donde observamos alteraciones muy similares al grupo sintomático.



**Figura 29** Componentes celulares de proteínas alteradas en el portador presintomático

### **PROCESOS BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS CON LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA PORTADORA PRESINTOMÁTICA**

Al evaluar los procesos biológicos enriquecidos encontramos que estos están relacionados con la migración, movimiento localización y estructura celular principalmente (alteraciones en procesos involucrados con el citoesqueleto de actina y transporte vesicular), así como procesos metabólicos y energéticos (regulación de actividad ATPasa, estrés oxidativo etc.) así como procesos inmunes (activación de granulocitos e inmunidad mediada por neutrófilos) (**figura 30**).



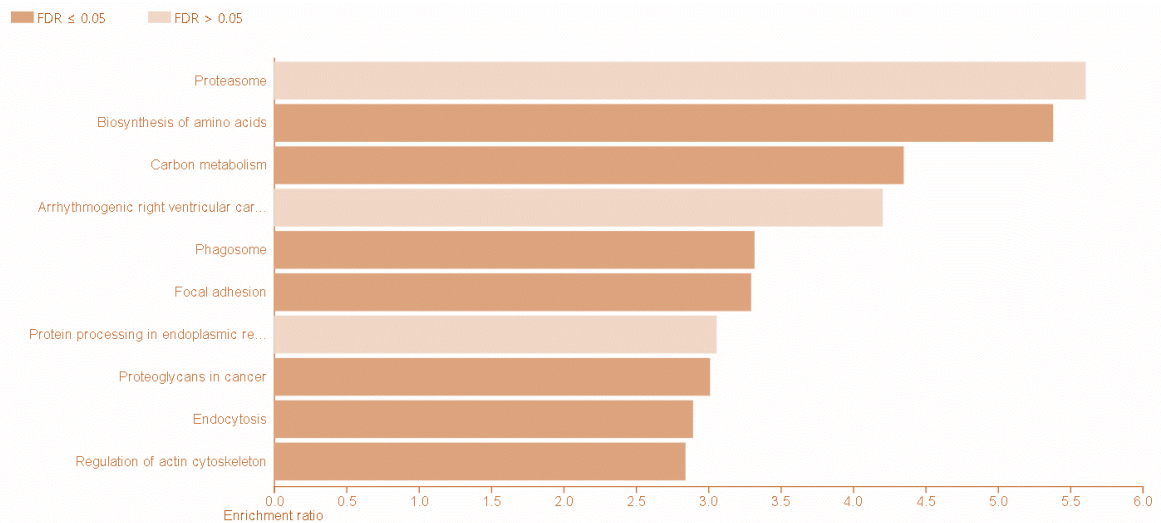
**Figura 30 Procesos biológicos alterados (enriquecidos) en el portador presintomático.**

Los procesos biológicos alterados al analizar solo las proteínas sub-expresadas son endocitosis o y transporte mediante vesículas, localización de proteínas en la periferia celular, la regulación positiva de la organización de componentes celulares y los procesos metabólicos mediados por receptores. Mientras que los alterados en las proteínas sobre-expresadas fueron regulación de procesos basados en filamentos de actina, y ensamblaje de complejos proteicos, secreción y exocitosis, así como la regulación negativa de procesos inmunes.

### **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADOS CON LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN LA PORTADORA PRESINTOMÁTICA**

Las vías principalmente involucradas con la base de datos de KEGG son la biosíntesis de aminoácidos, fagosoma proteasoma, endocitosis y regulación de citoesqueleto de actina. Al comparar las vías con los del grupo sintomático observamos que tienen en común las proteínas involucradas en adhesión focales y el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (debido al FDR esta

última no es considerada significativo, sin embargo, se sugiere el inicio de alteraciones en esta vía en portadores presintomáticos). Aunque ambos grupos tienen alteradas vías que tienen que ver con el citoesqueleto; las células del portador presintomático tienen proteínas involucradas en el citoesqueleto de actina, mientras que en el sintomático las proteínas alteradas están asociadas a microtúbulos (**Figura 31**).



**Figura 31 Vías de señalización alteradas en la portadora presintomática**

Al comparar estos resultados con las diferentes bases de datos solo se encuentran 4 vías en común, endocitosis adhesiones focales, citoesqueleto, y proteasoma.

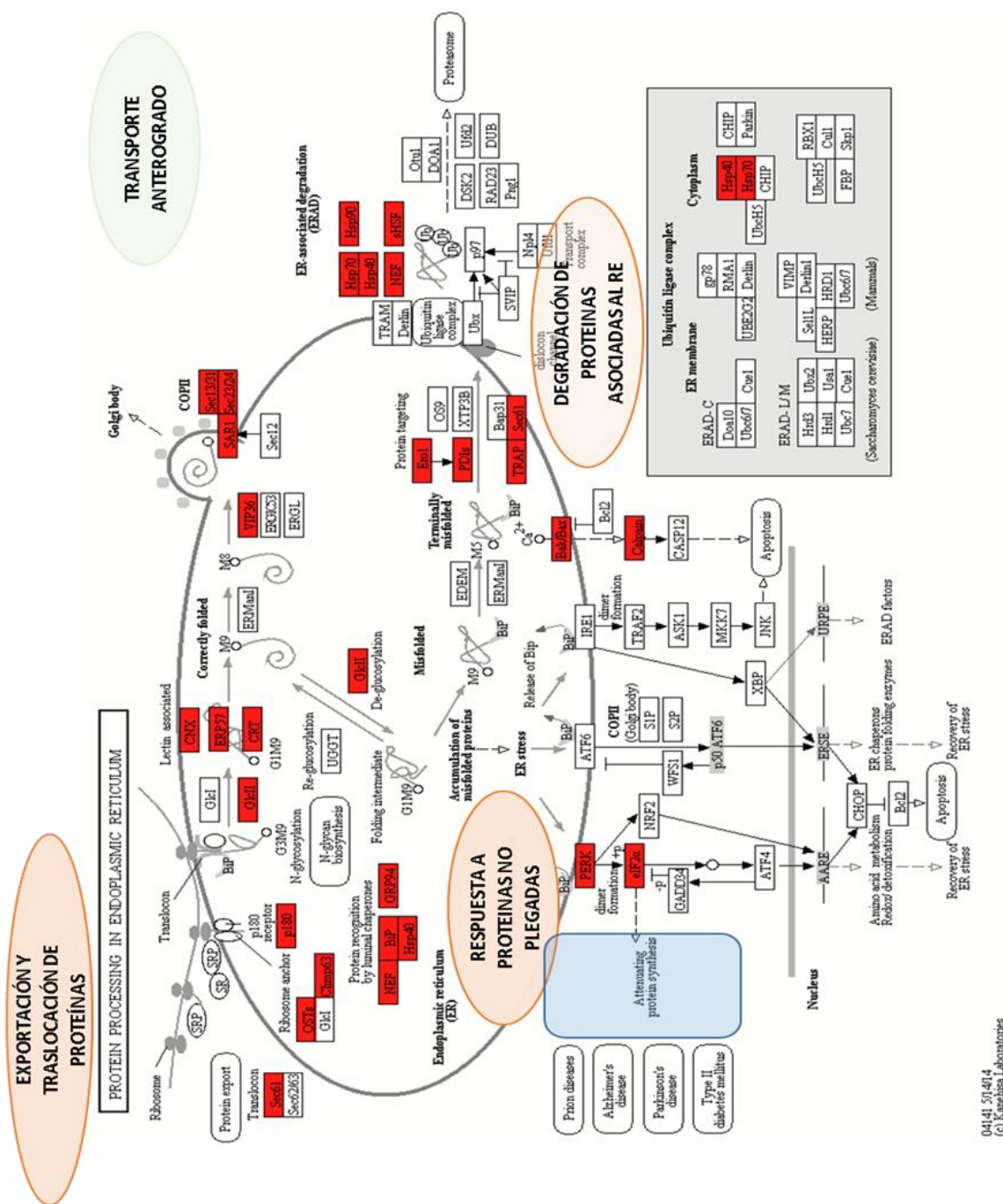
En conclusión y a grandes rasgos, las células de la portadora presintomática tienen alteraciones a nivel de transporte de vesículas y del sistema inmune, así como en la regulación del citoesqueleto de actina.

Con los resultados anteriores decidimos enfocarnos en 3 vías principales: el procesamiento de proteínas en RE la cual esta alterada en el portador sintomático (también se encontró en la portadora presintomática, pero con un  $FDR > 0.05$ ), endocitosis la cual está más alterada en la portadora presintomática y la regulación del citoesqueleto de actina alterada en ambos portadores. Utilizando las herramientas de KEGG obtuvimos los esquemas de estas vías en específico (**Figuras 32, 33 y 34**).

Como podemos observar en la **figura 32** la vía del procesamiento de proteínas en RE es la más importante en el grupo sintomático, y abarca varios procesos en los cuales tenemos proteínas alteradas (en rojo), como la exportación y traslocación de proteínas, respuesta a proteínas mal plegadas, degradación de proteínas y transporte anterógrado, además esta vía ha sido asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas que sugieren que alteraciones en esta vía puede ayudar a la acumulación de proteínas mal plegadas que conlleven a la toxicidad celular.

**Tabla 11 Proteínas alteradas en la vía de procesamiento de proteínas en RE**

ID	DESCRIPCIÓN	FC
STT3B	STT3 oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit B	-14.9
CAPN1	calpain 1	-3.3
CALR	calreticulin	-2.7
ERP29	endoplasmic reticulum protein 29	-2.6
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2	-2.1
PDIA3	protein disulfide isomerase family A member 3 masa 13747.443	-2.0
PDIA6	protein disulfide isomerase family A member 6	-1.9
PRKCSH	protein kinase C substrate 80K-H	-1.9
BAG2	BCL2 associated athanogene 2	-1.8
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	-1.8
HSP90AB1	heat shock protein 90 alpha family class B member 1	-1.8
HYOU1	hypoxia up-regulated 1	-1.7
DNAJB11	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B11	-1.7
HSP90B1	heat shock protein 90 beta family member 1	-1.7
HSPA5	heat shock protein family A (Hsp70) member 5	-1.7
PDIA3	protein disulfide isomerase family A member 3 masa 57181.6493	-1.7
P4HB	prolyl 4-hydroxylase subunit beta	-1.6
LMAN2	lectin, mannose binding 2	-1.5
SSR4	signal sequence receptor subunit 4	-1.5
CANX	calnexin	-1.5
PDIA4	protein disulfide isomerase family A member 4	-1.5
STT3A	STT3 oligosaccharyltransferase complex catalytic subunit A	-1.5
SEC31A	SEC31 homolog A, COPII coat complex component	1.8
DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase non-catalytic subunit	1.8
CRYAB	crystallin alpha B	2.4
SAR1A	secretion associated Ras related GTPase 1A	2.7
DNAJA1	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1	2.8

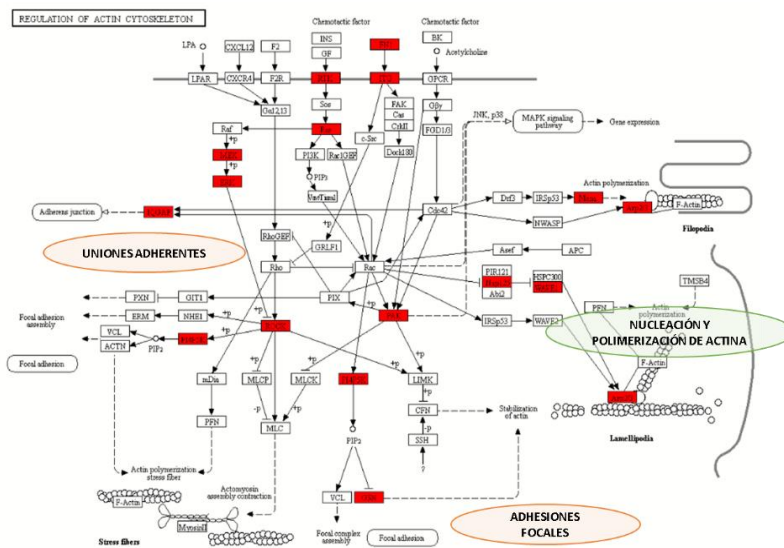


04/41\_5/14/4  
© Kanishk Laboratories

**Figura 32 Vía de procesamiento de proteínas en RE** De rojo se marcan los genes alterados en nuestro estudio coincidentes con la vía de señalización y en óvalos naranjas se encuentran algunos de los subprocesos involucrados en esa vía de señalización.

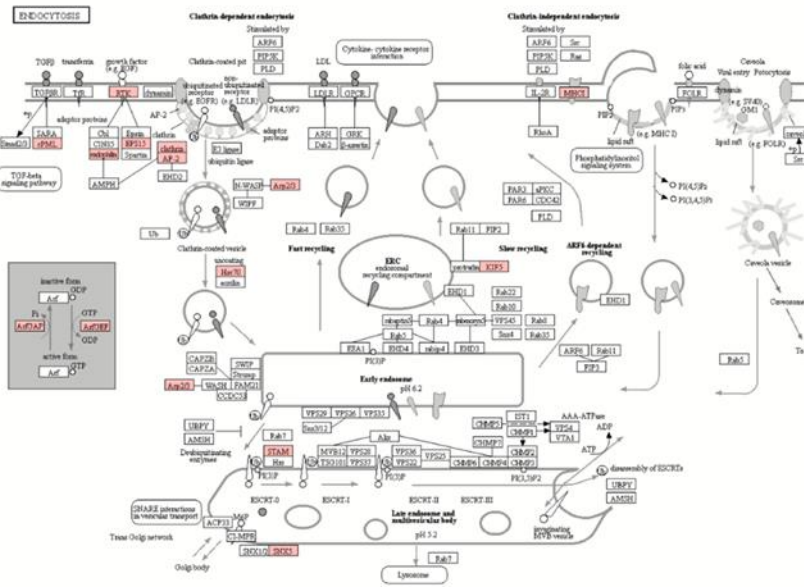


En la **figura 33** se encuentra la vía del citoesqueleto de actina, la cual también va de la mano con otros procesos como la formación de uniones adherentes, la nucleación y polimerización de actina, las adhesiones focales e incluso el transporte vesicular. La cual va de la mano con la tercera vía que es la endocitosis (**figura 34**). Estas 3 vías podrían colaborar en la fisiopatología de la enfermedad ya que las proteínas mal plegadas que se acumulan pueden ser transportadas por medio de vesículas y provocar toxicidad. Los datos apuntan a que en el estadio presintomático de la enfermedad existe una alteración en el metabolismo energético, sistema inmune y en el transporte vesicular específicamente la endocitosis mediada por receptores. Y en el portador sintomático hay más alteraciones en todos los niveles que pueden generar estrés oxidativo y un aumento en el transporte basado en microtúbulos.



ID	Descripción	FC
ITGA2	integrin subunit alpha 2	26.9
IQGAP3	IQ motif containing GTPase activating protein 3	10.1
EGFR	epidermal growth factor receptor	-9.6
FN1	fibronectin 1	-3.3
SCIN	scinderin	-2.9
PAK3	p21 (RAC1) activated kinase 3	-2.0
PIKFYVE	phosphoinositide kinase, FYVE-type zinc finger containing	-1.9
ITGA11	integrin subunit alpha 11	-1.8
RRAS	RAS related	-1.6
GSN	gelsolin	-1.6
ITGA5	integrin subunit alpha 5	-1.5
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	1.6
ROCK1	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1	1.7
PAK2	p21 (RAC1) activated kinase 2	1.8
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	2.1
NCKAP1	NCK associated protein 1	2.5
ARPC1A	actin related protein 2/3 complex subunit 1A	2.8
WASF1	WASP family member 1	2.9
ENAH	ENAH actin regulator	3.5

**Figura 33** Vía de regulación del citoesqueleto de actina y sus proteínas alteradas en la tabla (coloreadas en rojo en el esquema)



ID	Descripción	FC
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	18.8
EGFR	epidermal growth factor receptor	-9.6
HLA-E	major histocompatibility complex, class I, E	-3.5
PSD3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3	-2.8
AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3	-2.5
SNX6	sorting nexin 6	-2.4
HSPA1A	heat shock protein family A (Hsp70) member 1A	-1.8
PML	promyelocytic leukemia	-1.7
SH3GL1	SH3 domain containing GRB2 like 1, endophilin A2	-1.6
AP2B1	adaptor related protein complex 2 subunit beta 1	-1.5
EPS15L1	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 like 1	-1.5
CLTA	clathrin light chain A	-1.5
STAM	signal transducing adaptor molecule	1.5
CLTC1	clathrin heavy chain like 1	1.5
KIF5B	kinesin family member 5B	1.5
ARPC1A	actin related protein 2/3 complex subunit 1A	2.8
STAM2	signal transducing adaptor molecule 2	4.2

Figura 34 Vía de señalización de endocitosis y algunas proteínas alteradas en la tabla (coloreadas en rosa en el esquema)

### COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE AMBOS GRUPOS

Ya que ambos estudios fueron realizados de manera independiente y con su respectivo control no es posible compararlos entre sí de manera directa, sin embargo, para darnos una idea, realice un diagrama de Venn para conocer las proteínas alteradas compartidas y ver su implicación biológica, para darnos una idea de los procesos que se conservan en ambos estadios clínicos de la enfermedad (figura 35). En él se puede observar que entre ambos grupos hay 54 proteínas en común (intersección), 443 se encuentran en el grupo sintomático y 203 en el grupo presintomático (anexo 3).

Estas 54 proteínas tienen que ver con los procesos biológicos de la figura 36. Así como nuevamente vías que involucran transporte, citoesqueleto y matriz extracelular.

SINTOMÁTICO PRESINTOMÁTICO

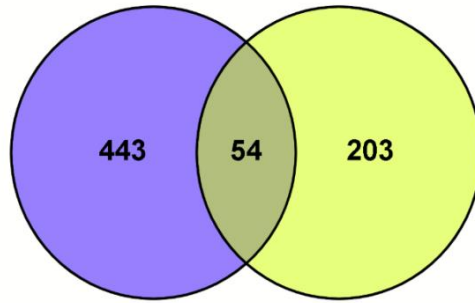


Figura 35 Diagrama de Venn de proteínas alteradas compartidas en ambos grupos.

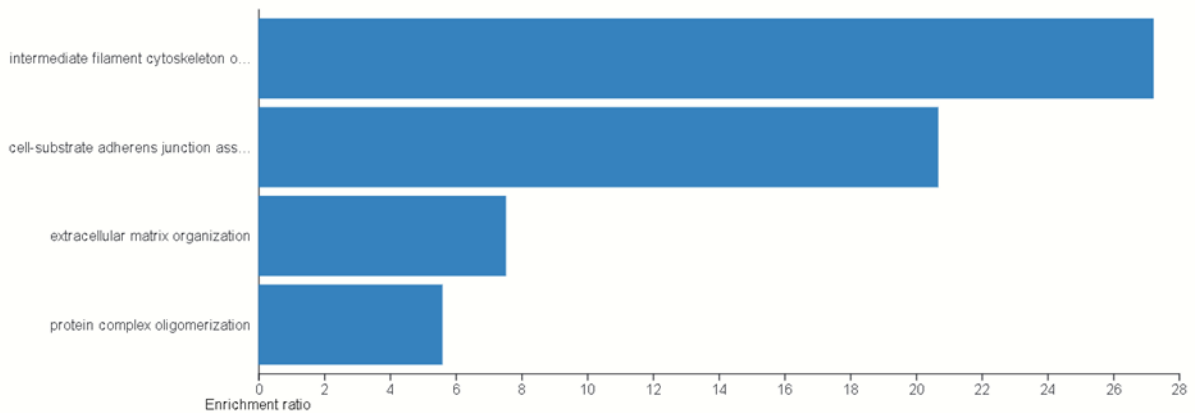


Figura 36 Procesos involucrados en las 54 proteínas compartidas entre grupos

Debido a que estas proteínas participan en algunas vías que juegan un papel importante en la biología de las enfermedades neurodegenerativas, evaluamos las enfermedades posiblemente involucradas con estas proteínas a través de la herramienta GenAnalytics ya que con ella podemos comparar las proteínas que han sido diferencialmente expresadas y reportadas como biomarcadores en otras enfermedades. Para ello juntamos todas las proteínas alteradas tanto del grupo sintomático como presintomático para ver las enfermedades relacionadas obteniendo los resultados descritos en la figura 40 donde se marcan algunos de las proteínas encontradas en diferentes enfermedades. Sorprendentemente

encontramos otras proteínas involucradas en enfermedades similares a la sintomatología atípica de la enfermedad que es paraparesis espástica, como las paraplejas espásticas hereditarias, y algunas distrofias musculares, así como otras enfermedades desmielinizantes como la enfermedad de Huntington (resultado obtenido también en el análisis de las vías de señalización) y la esclerosis lateral amiotrófica. Además de otras proteínas reportadas en la EA, las cuales se discutirán más adelante.

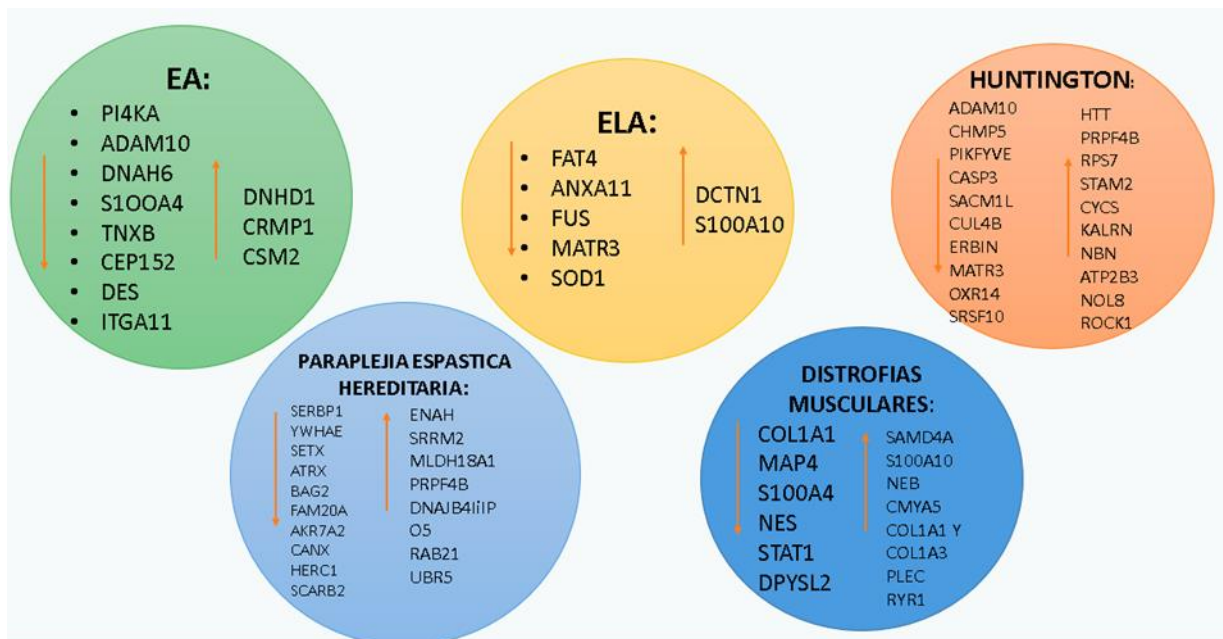


Figura 37 Proteínas reportadas involucradas en otras enfermedades

---

## 8. DISCUSIÓN E INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

LA EA es un problema de salud pública que va en aumento, y aunque es una de las enfermedades más estudiadas, hasta la fecha, su diagnóstico y tratamiento son inadecuados. A pesar de que el proceso patológico de la EA inicia mucho antes de que se manifieste clínicamente, no existe un procedimiento diagnóstico preciso para detectar individuos presintomáticos. Sin embargo, el estudio de la EAF nos permite estudiar estos individuos ya que los portadores de las mutaciones desarrollaran Alzheimer en edades tempranas. El hecho de que los pacientes con EA y otras NDD, presenten disfunción olfatoria desde estadios tempranos de la enfermedad sugiere que la regeneración y neurogénesis a este nivel esta alterada, por lo que el estudio de las células mesenquimales de epitelio olfatorio derivadas de estos pacientes, podrían funcionar como un buen modelo para estudiar las causas celulares de la enfermedad.

Los estudios proteómicos cuantitativos tipo “label free”, nos permiten identificar la expresión diferencial del proteoma de una muestra biológica, comparando una condición con respecto a otra. Ya que las proteínas son las encargadas de llevar a cabo las funciones y estructura de la célula, este tipo de estudios nos puede permitir conocer que mecanismos fisiopatológicos están involucrados en la enfermedad.

El objetivo de este proyecto fue identificar y comprender mejor los cambios bioquímicos y fisiológicos que pudieran tener estas células (Ce-MEO), para así contribuir en el desarrollo de nuevas pautas para el estudio e identificación de nuevas dianas terapéuticas o bases alterativas para el diagnóstico temprano de la EA.

La discusión la abordare de la manera siguiente, primero discutiré algunas de las funciones de las proteínas con mayor expresión diferencial en ambos grupos (tanto sub-expresadas como sobre-expresadas), después, discutiré las funciones de las proteínas únicas resultantes en los portadores y su relación con la EA, y posteriormente integrare los principales procesos biológicos (síntesis,

---

procesamiento y plegamiento de proteínas en RE, organización del citoesqueleto y transporte vesicular, metabolismo energético y estrés oxidativo) y vías de señalización (vía de las pentosas fosfato, biosíntesis de aminoácidos y glicolisis), alterados, con lo reportado en EA y por último mencionare algunas de las proteínas resultantes que pudieran ser considerados como biomarcadores de la EA y otras enfermedades. La discusión de mis resultados es sugerente, ya que no se han validado las proteínas alteradas, por lo que se requiere su confirmación mediante otros estudios adicionales.

## **PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS**

### **Proteínas sub-expresadas en el portador sintomático.**

La GCC2 (GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2) es la proteína más sub-expresadas en el portador sintomático respecto a su control (FC -242.9), esta proteína es una golgina que regula el transporte de endosomas a la red trans-Golgi y el transporte retrogrado de Golgi a RE, interacciona con RAB6A, ARL1 y RAB7 además de que está involucrada en la biogénesis de microtúbulos no centrosómicos asociados con el aparato de Golgi mediante el reclutamiento de CLASP1 y CLASP2. Por lo que su disminución en nuestros resultados sugiere una alteración en el transporte intracelular retrogrado, cabe destacar que en el portador presintomático esta proteína no se encuentra desregulada.

Sorprendentemente encontramos tanto la subunidad beta como la subunidad alfa de hemoglobina disminuidas (FC-189.5 y -27.6 respectivamente). La Hb es la proteína que transporta el oxígeno y el dióxido de carbono en las células del linaje eritroide. Sin embargo, las cadenas de Hb se han detectado en células no eritroides como macrófagos (Liu, Zeng, & Stamler, 1999), células alveolares (Nishi et al., 2008), células mesangiales del riñón (Newton, Rao, Dluhy, & Baatz, 2006) y en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas y células gliales (Biagioli et al., 2009; Richter, Meurers, Zhu, Medvedeva, & Chesselet, 2009). Y aunque no ha sido reportada en células mesenquimales, en el 2012 las dos subunidades fueron encontradas en un estudio proteómico del bulbo olfatorio (Fernández-Irigoyen, Corrales, & Santamaría, 2012). Ya que el oxígeno es un requisito crucial para las células aeróbicas

---

metabólicamente activas y para el cerebro, la hemoglobina puede desempeñar un papel en la homeostasis del oxígeno intraneuronal. Nuestros resultados concuerdan con un estudio realizado por Ferrer I. y cols. donde evaluaron la expresión de hemoglobina por inmunofluorescencia en neuronas provenientes de cerebros de pacientes con EA, EP y demencia con cuerpos de Lewy (DLB), donde observaron una disminución de ambas cadenas de hemoglobina en prácticamente el 80% las neuronas con depósitos o inclusiones proteicas. Sin embargo, en el grupo 2 solo se encontró la subunidad alfa de hemoglobina la cual estaba sobre-expresada en comparación a su control (FC 14.1).

La TXNL1 (thioredoxin like-protein 1) es una proteína antioxidante (reductasa) cuya función es participar en la proteólisis, reducir la fosfatasa oxidativa y promover la resistencia al estrés oxidativo en el cerebro, por lo que al estar disminuida (FC - 67.7) aumenta la susceptibilidad en las células al estrés oxidativo (Andersen et al., 2009; Brown et al., 2013), sin embargo en el portador presintomático esta proteína no se encontró alterada. Junto con tioredoxina 1 (TRX1) (FC-2.0 en PM54 y sin cambios en PF44), TXNL1 fueron utilizadas para medir el estrés oxidativo en ratones durante crisis convulsivas las cuales se encontraron sobre-expresadas (Yu et al., 2019).

SERPINB2 (plasminogen activator inhibitor 2 o PAI-2) es un miembro de la familia de inhibidores de las serinas proteasas, es altamente expresado en plasma y macrófagos, sin embargo, en este contexto es expresado en neuronas y microglía la cual tiene propiedades citoprotectoras en neuronas e interactúa con proteínas intracelulares, así como componentes del sistema ubiquitina—proteasoma (UPS). Es uno de los principales genes AID (Activity-regulated Inhibitor of Death) que median la neuro protección por receptores NMDA. En el 2015 Jordi Lee y su equipo probaron que SerpinB2 modula la proteostasis mediante la unión de proteínas mal plegadas y previene la formación de inclusiones proteicas, ya que protege a las células de la toxicidad inducida por un modelo de agregación de Huntingtina, y además previene la formación de fibrillas beta amiloides in vitro al inhibir su

---

agregación(Biagioli et al., 2009; Liu et al., 1999; Newton et al., 2006; Nishi et al., 2008).

La proteína KIAA1551 es una proteína de la cual no se conoce mucho, sin embargo, también conocida como RESF1(retroelement silencing factor 1), es requerida para mantener un estado represivo de genes en células madre embrionarias no diferenciadas, interactúa con nanog y juega un papel en la expresión génica regulando las modificaciones epigenéticas asociadas a las histonas metiltransferasas SETDB1, o SETD2 las cuales están asociada a la enfermedad de Huntington sin embargo en nuestros resultados solo encontramos SETD2 y se encuentra normal en ambos portadores.

TEX14 (inactive serine/threonine-protein kinase TEX14), es una cinasa inactiva que actúa como un inhibidor endógeno de CEP55 en las células germinales para deshabilitar la abscisión celular y formar los puentes intercelulares. El complejo ESCRT está implicado en este proceso de escisión de membrana, por lo que un aumento de TEX14 impide que ALIX y otras proteínas recluten complejos ESCRT en el cuerpo medio y no se lleve a cabo la abscisión celular, formación de cuerpos multivesiculares y la liberación de vesículas (Kim et al., 2015). También regula la maduración de los cinetocoros externos y la unión de microtúbulos(Mondal, Ohashi, Yang, Rowley, & Couch, 2012). Un estudio en células TNBC (triple negative breast Cancer) sugiere que TEX14 junto con SCYL1 y PLK1 regulan negativamente la abundancia y estabilidad de REST (RE-1 silencing transcription factor) un represor transcripcional de genes neuronales por lo que juega un papel importante en la diferenciación neuronal(Karlin et al., 2014). En nuestros resultados esta proteína resultó sub-expresada en ambos grupos con un FC de -46.5 en el portador sintomático y de -70.4 en el presintomático, sin embargo, esta no es parte de la lista debido a que no se repitió en las 3 réplicas en el portador. Una disminución en esta proteína sugiere una contribución en la formación de complejos multivesiculares, la liberación de vesículas, la abscisión celular y la desestabilización de los microtúbulos.



---

ISG15 (ubiquitin-like protein Interferon Stimulated Gene15) y MX1 (interferon-induced GTP-binding protein Mx1) las cuales resultaron sub-expresadas con un FC de -45.8 y -37.1 son proteínas que interactúan entre sí y tienen que ver con el sistema inmune innato. ISG15 es una proteína la cual esta alterada en diversos canceres, tiene una actividad parecida a la ubiquitina y su principal función es la glicación estimulada por Interferones de tipo1, aunque también puede ser inducida por LPS, ácido retinóico, o agentes inducidos por estrés. Está implicada en múltiples procesos celulares fundamentales como la traducción y homeostasis de proteínas ya que dirige las proteínas a los filamentos intermedios, autofagia, secreción de exosomas, reparación del DNA y modulación inmunológica mediante la vía JAK-STAT(Dzimianski, Scholte, Bergeron, & Pegan, 2019; Han, Moon, & Jeon, 2018) Además ISG15 es target de NFκB y de p53. Por lo que su disminución sugiere una alteración en estos procesos. Desai y cols realizaron un estudio en células ZR-75-1 de cáncer de mama (donde ISG15 está altamente expresada) en donde reportan que esta proteína interrumpe la arquitectura del citoesqueleto F-actina y la formación de adhesiones focales promoviendo la migración, motilidad e invasión celular (Desai et al., 2012). Otro estudio en ratones SOD1 (G93A modelo de ELA), sugiere a ISG15 como un biomarcador de lesiones neuronales agudas y crónicas(R.-G. Wang, Kaul, & Zhang, 2012) Por lo que su disminución podría sugerir una disminución en la migración de las células de los portadores de la mutación, y una alteración del citoesqueleto de actina lo cual concuerda con los procesos biológicos resultantes. Además esta proteína interactúa con múltiples proteínas las cuales están disminuidas en nuestros resultados como IFIT1, CHMP5, EIF2AK2, DDX58, UBE2N, y MX1 la cual es una proteína similar a la dinamina que antagoniza la replicación viral , en el virus de influenza A se ha reportado que disminuye la síntesis de la nucleocápside viral y bloquea el tráfico endocítico de las partículas virales entrantes además de que puede regular la actividad de los canales de calcio(Lussier et al., 2005; Turan, 2004). Estudios sugieren que la señalización de STAT1 es requerido para la expresión de MX1 el cual también esta disminuido con un FC de -3.2. Esta proteína se ha visto aumentada en microglía de cerebros con enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Yamada, Horisberger, Kawaguchi, Moroo, &

---

Toyoda, 1994), así como SNPs en esta proteína ha sido asociado a Esclerosis Múltiple(Furuyama et al., 2006) y EA.(Ma, Huang, Tang, & Lam, 2012).

FAT2 (protocadherin 2) pertenece a la familia de las cadherinas de adhesión dependientes de  $Ca^{2+}$ , es esencial para controlar la proliferación y migración celular, ya que participa en la organización del citoesqueleto de actina, tiene dos repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) el cual también esta disminuido (FC -9.6 sin embargo no está incluido en la lista por que no se encontró en todas las repeticiones). Esta proteína funciona muy probablemente como una molécula de adhesión celular, controla la proliferación celular y desempeña un papel importante en el desarrollo del cerebelo. Por lo que ha sido descrito como un gen asociado a ataxias hereditarias y paraparesias(Horne-Badovinac, 2017; Sullivan, Yau, O'Connor, & Houlden, 2019).

Las Superóxido dismutasas son proteínas anti apoptóticas que transforman el superóxido tóxico resultante de la fosforilación oxidativa en peróxido de hidrogeno y  $O_2$  lo que permite que las especies reactivas de oxígeno disminuyan. Por lo que su disminución contribuye al estrés oxidativo y acumulación de ROS. Esta proteína ha sido asociada a neurodegeneración (Oh et al., 2012). Tanto SOD2 como SOD1 están sub-expresadas en ambos portadores, sin embargo, en el portador sintomático la magnitud de cambio en la expresión es mayor con un FC de -27.2 y -1.5 en SOD2 y SOD1 a diferencia del portador presintomático con un FC de -1.7 y -1.2 respectivamente.

La integrina alfa 2 (ITGA2) media la adhesión de las células a la matriz extracelular, es un receptor para la laminina, el colágeno, la fibronectina y la E-cadherina.

La CAPG (macrophage-capping protein) es una proteína reguladora de actina sensible al  $Ca^{2+}$  que contribuye al control de la motilidad y regulación de estructuras citoplasmáticas y nucleares basada en interacciones de actina.

La GNAO1 (Guanine nucleotide-bindin protein  $G_0$  subunit alpha) es una proteína heterotrimérica que actúa como transductor de GPCR (receptores acoplados a proteínas G), la cual se encuentra disminuida en encefalopatías epileptiformes y

---

trastornos del movimiento, ya que media las señales de una amplia gama de receptores inhibitorios en cerebro como GABA, adrenérgicos y dopaminérgicos(Feng et al., 2017).

RAD51AP2 (RAD51-associated protein 2) interactúa con la recombinasa RAD51 la cual desempeña un papel crítico en la recombinación meiótica y la reparación del DNA, además RAD51 es esencial para la proliferación celular. Por lo que su disminución altera la reparación del DNA así como disminuye la proliferación celular(Kovalenko, Wiese, & Schild, 2006).

En conjunto estas proteínas sugieren una disminución en la migración y proliferación celular (lo cual se observa en el crecimiento celular invitro respecto al control), una mayor susceptibilidad de las células al estrés oxidativo y una alteración en el transporte vesicular y del citoesqueleto.

### **Proteínas sobre-expresadas en portador sintomático**

La proteína EML5 (Echinoderm microtubule associated protein-like 5) puede modificar la dinámica de ensamblaje de los microtúbulos de modo que sean más largos y dinámicos. Esta proteína está altamente expresada en las neuronas y células gliales de pacientes con epilepsia intratable que conlleva a una pérdida neuronal y gliosis, lo cual se asocia a una disfunción microtubular y aunque no se sabe bien su función se sugiere en un estudio en neuronas que promueve la extensión de dendritas y axones promoviendo la plasticidad y sinapsis excitatoria.(Sun, Huang, Xiao, & Xi, 2015) Esta proteína se encuentra diferencialmente expresada en el portador 70.9 veces en comparación a su control.

La ATP2B3 o PMCA2 es una ATPasa de transporte de calcio que remueve los iones de calcio para regular su homeostasis, está asociada a ataxia y atrofia muscular, así como a EA y EM ya que la regulación aberrante de Calcio produce disfunción neuronal y toxicidad. Sin embargo este tipo de ATPasas se han reportado disminuidas en EA ya que existe un aumento de calcio y una alteración en su señalización(Berridge, 2010; Strehler & Thayer, 2018).

---

El proto-oncogen tirosin proteína cinasa ROS1 es una proteína de membrana integral de tipo uno que funciona como receptor de factores de crecimiento o diferenciación.

De manera interesante hay un aumento de la expresión de Huntingtina (HTT) en el portador sintomático (FC 23.2), en su forma natural la Htt contiene de 6-35 residuos de glutamina, sin embargo, en la EH tiene más de 36 residuos, la cual conduce a la formación de agregados intracelulares que provocan un daño neuronal masivo. Esta proteína está involucrada en diferentes procesos como el transporte de vesículas (Caviston & Holzbaur, 2009) y microtúbulos ya que interactúa con la proteína de interacción a Htt HIP1 una proteína de unión a clatrina para mediar la endocitosis. Sin embargo, HIP1 esta sub-expresada -9.1 veces en el portador sintomático, lo cual sugiere que este transporte podría estar alterado. Además la Htt mutante implica la inhibición del transporte de electrones mitocondrial aumentando el estrés oxidativo y el daño al DNA, es una proteína relacionada a autofagia, puede regular la transcripción (Steffan et al., 2000) y coordinar la división celular (Cisbani & Cicchetti, 2012; Saudou & Humbert, 2016). En mayo de este año un estudio reportó en un modelo de ratón transgénico de EA (Tg2576) que la Huntingtina se agrega en las placas de amiloide beta y se induce en astrocitos reactivos de estos ratones (Hartlage-Rübsamen et al., 2019).

La proteína EPHA3 (Ephrin type A receptor 3) es un receptor tirosin cinasa el cual desempeña un papel importante en la homeostasis de tejidos adultos. Estos receptores cuando se unen a sus ligandos; las efrinas generan señales que regulan la forma, el movimiento, la supervivencia y la proliferación celular, además de la endocitosis y la escisión proteolítica, así como la degradación proteosomal (Lisabeth, Falivelli, & Pasquale, 2013). Las efrinas son escindidas por metaloproteinasas como ADAM10 y gama secretasa permitiendo la endocitosis y otros procesos celulares (Pitulescu & Adams, 2010). Por lo que la alteración de su expresión altera estos procesos. Se ha reportado que los EPHA4 y EPHB2 están altamente expresados en varios trastornos del sistema nervioso y cánceres (Barquilla & Pasquale, 2015).

---

FASTKD3 (FAST kinase domain-containing protein3 mitochondrial) es una proteína que regula el balance energético de la mitocondria bajo estrés que actúa regulando el metabolismo y estabilidad del ARN mitocondrial(Jourdain et al., 2017), y está altamente expresada en células o tejidos con alto contenido mitocondrial o que requieren altos niveles ATP como es el caso de nuestras células precursoras neurales de epitelio olfatorio.

La proteína DSCAML1, es una molécula de adhesión celular la cual está involucrada en la diferenciación neuronal, el control de crecimiento del axón, la muerte celular y el autorreconocimiento neuronal (Montesinos, 2014; Sachse et al., 2019). Se ha reportado que la sobreexpresión de DSCAM en neuronas de hipocampo disminuye la complejidad dendrítica, Esta proteína esta aumentada en cerebros de pacientes con síndrome de Down y se ha sugerido que contribuye a la discapacidad cognitiva mediante una acción inhibitoria en el crecimiento de la sinaptogénesis y neuritas. También se ha visto sobre-expresada en ratones transgénicos 6J-APP que tienen deficiencias en el aprendizaje y la memoria (Y. L. Jia, Fu, Zhang, & Jia, 2017; Y.-L. Jia et al., 2011) lo cual sugiere que el aumento de esta proteína puede contribuir al fenotipo neuropatológico y conductual de los ratones APP, posiblemente al alterar las propiedades adhesivas de las neuronas, inhibir su sinaptogénesis o crecimiento de neuritas y la formación de las conexiones neurales adecuadas aumentando la muerte neuronal. Además que DSCAM puede facilitar la formación de placas  $\beta$ A.(Y. L. Jia et al., 2017).

TOGARAM1 es una proteína que participa en la organización y polimerización de los microtúbulos y en la formación de cilios primarios, estructura esencial en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

SVEP1 y S100A16 son proteínas de unión a calcio. Algunas de las proteínas S100 tienen funciones asociadas al procesamiento de APP como S100B, la regulación del  $\beta$ A como S100A9 y S100A8 (C. Wang et al., 2018)y la fosforilación de tau. Participan en funciones como proliferación, diferenciación, fosforilación de proteínas, ensamblaje de citoesqueleto y homeostasis del calcio intracelular(Donato et al., 2013). Y su sobreexpresión ha sido reportadas en EA (Cristóvão & Gomes,

---

2019; Marshak, Pesce, Stanley, & Griffin, 1992; Mrak & Griffinbc, 2001), sin embargo, no se ha reportado a S100A16 en EA.

C12orf71 está también elevada en el portador sintomático sin embargo es una proteína no caracterizada por lo que no se sabe su función.

La proteína PLCG2 (phosphoinositide phospholipase C) es una enzima encargada de la producción de IP3 y DAG a partir de IP2 utilizando calcio como cofactor. Estas moléculas son segundos mensajeros importantes para la señalización de factores de crecimiento y receptores del sistema inmune.

Al igual que las proteínas sub-expresadas muchas de estas tienen que ver con la patología de la EA, por lo que nuestros resultados son novedosos debido a que son realizados a partir de células precursoras neurales, convirtiendo a estas células en un modelo de estudio adecuado para la EA y otras NDD.

### **Proteínas sub-expresadas en portador presintomático**

La proteína KDR es un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, lo cual promueve la proliferación y migración celular, por lo que, si esta disminuida la proliferación celular también lo está, datos que concuerdan con las observaciones in vitro.

La proteína CHC1L es una helicasa involucrada en la reparación del daño al ADN ya que regula la relajación de la cromatina luego del daño en el ADN.

BEND3 es un represor transcripcional que se asocia con el complejo de remodelación del núcleo, desempeña un papel clave en la represión de la transcripción de ADNr. Se une al ADN satélite no metilado y participa en el reclutamiento del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2).

La colectina 12 es un receptor scavenger que muestra varias funciones asociadas con la defensa del huésped. Promueve la unión y fagocitosis de bacterias y media el reconocimiento, la internalización y la degradación de lipoproteínas de baja densidad modificadas oxidativamente. También puede desempeñar un papel en la eliminación de la beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer por lo que su

---

disminución hace a estas células más susceptibles a la toxicidad y acumulación de proteínas(Nakamura et al., 2006).

La Sinderina, es una proteína dependiente de los filamentos de actina, de una manera dependiente de calcio, que tiene una función reguladora en la exocitosis su supresión inhibe la proliferación celular en algunos cánceres. Esta proteína está disminuida en ambos portadores.

La proteína CRMP1 es una dihidrodipirimidasa necesaria para la señalización por semaforinas clase 3 y la posterior remodelación del citoesqueleto. Juega un papel en la guía de axones, el crecimiento invasivo y la migración celular además de que puede participar en la citocinesis.

La USP14 asegura la regeneración de ubiquitina en el proteasoma, sirve también como un inhibidor fisiológico de la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) en condiciones no estresadas al inhibir la degradación de las proteínas del retículo endoplásmico desplegado a través de la interacción con ERN1.

La Treslina (TICRR) regula la activación de la iniciación de la replicación del ADN. Se ha reportado que su disminución afecta progresión de la fase S del ciclo celular debido a la acumulación del daño a ADN(Kumagai, Shevchenko, Shevchenko, & Dunphy, 2010).

La miosina 10 es una miosina no muscular convencional, interviene en la regulación de la citocinesis y la motilidad celular, y las adhesiones focales. Es esencial para el correcto anclaje del huso y la progresión a través de la metafase ya que puede unirse tanto F-actina como a los microtúbulos.

La proteína NTRK2 es el receptor de BDNF/NT3 y NT4, involucrado en el desarrollo y la maduración del sistema nervioso central y periférico a través de la regulación de la supervivencia, proliferación, migración, diferenciación y formación de sinapsis y plasticidad de las neuronas. Estos receptores Trk se acoplan a las vías de señalización Ras, Cdc42 / Rac / RhoG, MAPK, PI3K y PLCγ. Se ha visto disminuido en cerebros de pacientes con esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar. Y está descrito como un factor de riesgo genético para EA (Z. Chen et al., 2008)

---

En conjunto estas proteínas sugieren una alteración en la proliferación, migración y división celular principalmente.

### **Proteínas sobre-expresadas en portador presintomático**

COPS8 (COP9 signalosome complex subunit 8) es una de las ocho subunidades del señalosoma COP9, un complejo proteico altamente conservado que funciona como un regulador importante en múltiples vías de señalización. La estructura y función del signalosoma COP9 es similar a la de la partícula reguladora 19S de la proteasoma 26S. Regula la señalización de cinasas y la degradación de proteínas.

CSF1R (macrophage colony-stimulating factor 1 receptor) es una tirosin protein cinasa que actúa como receptor de superficie celular para CSF1 e IL34, participa en la regulación de la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, así como promueve la reorganización del citoesqueleto de actina y la adhesión celular. Se han reportado niveles aumentados en microglía activa de pacientes con EA.

La proteína FAM129A o protein Niban regula la fosforilación de varias proteínas involucradas en la regulación de la traducción, incluidas EIF2A, EIF4EBP1 y RPS6KB1.y está involucrado en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico.

La proteína CRYBG3 es una proteína de anclaje que media la compartimentación subcelular de la proteína quinasa A (PKA).

La subunidad alfa de la hemoglobina esta sobre-expresada al igual que la proteína MX1 a diferencia del portador sintomático con un FC de 14.1 y 11.9 respectivamente, además la albumina también esta sobre-expresada en este portador (FC 8.2) lo que sugiere que el transporte no esta disminuido a diferencia del portador sintomático e incluso puede estar aumentado.

Las granulinas son proteínas que funcionan como reguladores del tráfico de proteínas al lisosoma y facilita la acidificación de los lisosomas. Además, modula la inflamación en las neuronas al preservar la supervivencia de las neuronas, el crecimiento axonal y la integridad neuronal(Beel et al., 2017).



---

FKBP1A es una proteína de la familia de las inmunofilinas que desempeña un papel en la inmunoregulación y procesos celulares básicos que involucran el plegamiento y el tráfico de proteínas, además interactúa con canales de liberación de calcio intracelular.

La plexina D1 es un receptor de superficie celular para SEMA4A y para semaforinas de clase 3, como SEMA3A, SEMA3C y SEMA3E. Juega un papel importante en la señalización célula-célula, y en la regulación de la migración celular.

OLA1 es un miembro de la familia de las GTPasas y participa en la regulación del centrosoma.

SBNO1 (strawberry notch homolog 1) es un nuevo factor de cromatina de la superfamilia de helicasas 2, se cree que tiene un papel en la transcripción, sin embargo sus funciones no están bien dilucidadas, pero se sabe por estudios en *Drosophila* y gusanos que es relevante para los procesos de desarrollo que involucran a Notch, la cual desempeña un papel importante en la determinación de la diferenciación celular mediante Cdx2, y desempeña un papel esencial en su diferenciación y mantenimiento(Y. Watanabe et al., 2017).

La DCLK1 es una proteína serina treonina cinasa parecida a doblecortina que puede estar involucrada en la vía de señalización de calcio y que controla la migración neuronal en el cerebro en desarrollo, es una proteína asociada a microtúbulos expresada por células precursoras neuronales y neuronas inmaduras en estructuras corticales embrionarias y adultas(Koizumi et al., 2017).

G3BP2 es una GTPasa que está involucrada en la formación de gránulos de estrés.

La sobreexpresión de estas proteínas sugiere una alteración en el citoesqueleto de actina, con un posible aumento en el transporte y tráfico vesicular, así como una alteración en el procesamiento y degradación de proteínas.

## **PROTEÍNAS ÚNICAS EXPRESADAS EN LAS CÉLULAS DE LOS PORTADORES.**

### **Proteínas únicas de portador sintomático**

---

Se reportaron 11 proteínas únicas del portador:

-PIGN (GPI ethanolamine phosphate transferase 1) es una proteína involucrada en la biosíntesis del glucosilfosfatidilinositol (GPI) el cual ancla proteínas a la superficie celular, esta proteína se expresa en RE y transfiere fosfatidiletanolamina (PE) a la primer manosa del GPI. Las proteínas glicosiladas (unidas a GPI) contienen una secuencia señal que las dirige a RE donde se insertan cotraduccionalmente a través de un translocón y es escindida por la fosfolipasa C (la cual esta aumentada en nuestros resultados) y es liberada. Cabe mencionar que la PE es uno de los fosfolípidos más frecuentes en la bicapa lipídica de las membranas celulares y de la membrana externa de las mitocondrias (Becker et al., 2013), en el 2012 Area Gómez y cols observaron que los niveles de PE en fibroblastos de pacientes con mutaciones en PSEN1 y PSEN2 están aumentados en las mitocondrias, la Membrana plasmática y las membranas mitocondriales asociadas a RE (MAMs)(Area-Gomez et al., 2012) y se ha visto que un aumento en los niveles de PE aumenta la actividad de  $\gamma$  secretasa y por consiguiente la producción de  $\beta$ A ya que el procesamiento de APP se realiza a través de la vía amiloidogénica y que su disminución aumenta la actividad de ADAM10(Nesic et al., 2012).

La ATP5PF (ATP synthase-coupling factor 6 mitochondrial) es una subunidad del canal de protones que forma parte de la ATP sintasa mitocondrial para catalizar la síntesis de ATP, La cual está compuesta por dos complejos; el F1 que comprende el núcleo catalítico en la membrana y el complejo  $F_o$  que comprende el canal de protones, el cual tiene 9 subunidades, una de ellas es la ATP5PF o F6 que es necesaria para las interacciones entre ambos complejos.

En el portador presintomático se encontró la ATP5H como proteína única la cual es otra subunidad del complejo  $F_o$  (subunidad D) la cual si ha sido asociada con EA.

La MCPH1 o microcefalina es una proteína de respuesta al daño del DNA, involucrada en la neurogénesis durante el desarrollo por lo que su alteración provoca microcefalia. Actúa regulando la integridad de los telómeros y controla el ciclo celular mediante la retención del punto de control G2/M mediante el mantenimiento de la fosforilación inhibitoria de la CDK1 (Arroyo et al., 2019),Se ha

---

asociado como un factor de riesgo para esquizofrenia, trastorno bipolar y EA (Al Eissa et al., 2019; Erten-Lyons et al., 2011).

La proteína WDR62 es el segundo gen causante de microcefalia primaria autosómica recesiva, juega un papel importante en la formación del huso y la proliferación de células progenitoras neurales, es necesaria para la neurogénesis adecuada a través de JNK1(Xu, Zhang, Wang, Sun, & Xu, 2014).

CDK5RAP2 (CDK5 regulatory subunit-associated protein 2) es un regulador de la actividad de CDK5, se localiza en el centrosoma y Golgi, participa en la nucleación y polimerización de los microtúbulos al interactuar con MAPRE1 (la cual tiene un aumento en su expresión de 19.8 en nuestros resultados), y es un regulador negativo de la separación de los centriolos. Se ha asociado a microcefalia y EA (Erten-Lyons et al., 2011; Miron et al., 2018), se cree que facilita la formación y acumulación de ovillos neurofibrilares mediante la sobre activación de CDK5 en neuronas.

SCUBE2 (Signal Peptide, CUB and EGF-like domain containing protein 2) es una proteína de unión a lípidos para la señalización de SHH, en un estudio en cáncer de mama reportan que su sobreexpresión aumenta la formación de uniones adherentes que contienen E cadherina(Lin, Lee, Li, Cheng, & Yang, 2014)y en otro estudio en células de glioma su sobreexpresión inhibe la proliferación, migración e invasión celular.(Guo, Liu, & Liu, 2017).

La HIST1H1B (histone H1.5) interactúa con el DNA de enlace (histona enlazadora) entre los nucleosomas y funciona en la compactación de la cromatina. Se une a genes relacionados con la membrana en células diferenciadas, su enriquecimiento es dependiente de la diferenciación celular (J.-Y. Li, Patterson, Mikkola, Lowry, & Kurdistani, 2012) además que es un marcador de agresividad en cáncer, además se ha encontrado la histona enlazadora en placas amiloides de tejidos y se sugiere que las histonas enlazadoras son capaces de formar fibras tipo amiloide(Duce et al., 2006; Roque, Sortino, Ventura, Ponte, & Suau, 2015).

---

La proteína UTY es una histona desmetilasa ligada al cromosoma Y que contiene repeticiones de tetratricopeptidos que se creen que están involucrados en las interacciones proteína-proteína, también es un antígeno de histocompatibilidad.

KIAA0825 es una proteína no caracterizada sin embargo esta fue reportada en cultivo de bulbo olfatorio.(Marei et al., 2013).

Y por último el KIF5C es un miembro de la familia de las kinesinas que tiene funciones críticas en el desarrollo, supervivencia y plasticidad en el cerebro, al regular el transporte de material intracelular a lo largo de los microtúbulos. Esta proteína es la única proteína única que se comparte ente ambos portadores.

Como podemos observar, en conjunto las proteínas sobre-expresadas también tienen que ver con el transporte mediado por microtúbulos, y con genes causantes de microcefalia y alterados en EA.

### **Proteínas únicas del portador pre-sintomático**

La proteína FCHO1 es una proteína involucrada en el transporte mediado por vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos y la endocitosis mediada por clatrina en pasos tempranos. (Henne et al., 2010). También la proteína BIN3 está involucrada en la endocitosis y el transporte intracelular mediante sus dominios BAR, además participa en la citocinesis y la localización de la F-actina.

La DYNLRB1 es un miembro de la familia de cadenas ligeras de dineína, se une a proteínas de cadena intermedia e interactúa con el TGF $\beta$  y se ha relacionado con la regulación de proteínas moduladoras de la actina.

RTRAF es el factor de transcripción, traducción y transporte de RNA, involucrado en la modulación de la transcripción del RNAm por la polimerasa II y se requiere para la ligadura del RNAt. La proteína YARS es una tirosin ARNt ligasa la cual cataliza la amino acilación de los RNAt en dos pasos primero se activa con ATP y después se transfiere al extremo aceptor del RNAt. PROX1 es otro factor de transcripción involucrado en la determinación del destino celular y de la regulación de células progenitoras por lo que tiene un papel clave en la neurogénesis. Otro factor de transcripción encontrado como proteína única fue el DIP2C el cual está

---

asociado con algunos cánceres, y se ha reportado que su disminución desencadena cambios en la metilación del DNA, la expresión génica, la senescencia y la transición epitelio mesenquimal (J. Li, Ping, Ma, Chen, & Li, 2017).

CNBP es una proteína de unión a ADN y ARN con 7 dominios de dedos de zinc (también se conoce como ZNF9) puede funcionar en la regulación transcripcional mediada por esterol. Está asociado a distrofia miotónica tipo2.

La culina 9 (CUL9) es el componente central del complejo de ubiquitina ligasas que media la ubiquitinación y degradación de BIRC5 y se requiere para mantener la dinámica de los microtubos y la integridad del genoma, además regula la localización celular de p53/TP53 por lo que controla la proliferación celular, la senescencia y la apoptosis a través de p53(Z. Li et al., 2014).

Por último, la proteína TIMM13 la cual es una translocasa de la membrana interna mitocondrial que funciona como chaperonas de la importación de proteínas desde el citoplasma a la membrana interna mitocondrial. Por lo que el transporte de proteínas mediado por chaperonas y dirigido a mitocondrias está presente en el portador presintomático.

## **VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y PROCESOS BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS**

La neurodegeneración es uno de los principales mecanismos involucrados en la EA e implica varios procesos subyacentes como la neuroinflamación debido a la liberación y acumulación de varias moléculas y proteínas, ya que como sabemos muchas de las NDD son también consideradas proteinopatías. Se ha visto que en estas enfermedades las vías de señalización de eliminación y procesamiento de proteínas, como el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía de autofagia-lisosoma (Ghavami et al., 2014; Ryter, Cloonan, & Choi, 2013), las proteínas de respuesta al estrés y las chaperonas tienen un alto impacto en la patogénesis. Estas vías interactúan con otras, como las de desregulación energética, el daño molecular y al ADN, cambios metabólicos y la desregulación de la homeostasis iónica (von Bernhardt & Eugénin, 2012).

---

Las categorías principales que resultaron alteradas en los portadores de la mutación A431E en este proyecto; involucran funciones relacionadas con el procesamiento, síntesis y plegamiento de las proteínas, la organización del citoesqueleto, y transporte intracelular y vesicular. Los cuales, a continuación, abordaré de manera independiente.

### **Procesamiento y plegamiento de proteínas en RE**

La proteostasis u homeostasis de las proteínas se mantiene mediante varias vías que controlan la síntesis, el plegamiento, la agregación, la desagregación, el tráfico y la degradación de las proteínas, incluida la respuesta proteica desplegada (UPR), la respuesta al choque térmico, el sistema de proteasoma de ubiquitina (UPS) y los programas epigenéticos (Hutt, Powers, & Balch, 2009).

El RE participa en la síntesis y plegamiento de proteínas así como en la señalización de calcio (Patergnani et al 2011) y es el principal organelo involucrado en el plegamiento de proteínas y el control de calidad de las proteínas, este se ha visto afectado en las neuronas de pacientes con EA (Wiep Scheper & Hoozemans, 2009).

El plegamiento de las proteínas convierte las proteínas recién sintetizadas en moléculas fisiológicamente funcionales, proceso controlado por chaperonas moleculares que evitan la interacción inapropiada entre polipéptidos no nativos y promueven el replegamiento de proteínas que se han plegado incorrectamente como resultado del estrés celular. La agregación de proteínas es el resultado de un plegamiento incorrecto que conduce a un cambio estructural de una proteína normal y funcional. Si las proteínas mal plegadas se acumulan dentro de la luz del RE, exceden la capacidad de la maquinaria de plegamiento de proteínas, y se activa la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) para restaurar la proteostasis (Scheper & Hoozemans, 2009; Walter & Ron, 2011) (Díaz-Villanueva et al., 2015). Aunque inicialmente la activación de UPR está vinculada al desequilibrio de calcio (las presenilinas funcionan como canales de calcio pasivos en RE, y muchas mutaciones de EAF en presenilinas dan como resultado la sobrecarga de calcio en RE y la alteración en la homeostasis del calcio (Supnet & Bezprozvanny, 2011)) y al plegamiento incorrecto de proteínas también puede ser inducido por estrés

---

oxidativo, defectos en la autofagia, la inhibición del proteasoma y las disfunciones metabólicas o mitocondriales, todos ellos mecanismos involucrados en la fisiopatología de la EA (Huang, Tang, Lu, & Jiang, 2015; Ihara, Morishima-Kawashima, & Nixon, 2012) Durante la EA, se propone que la acumulación continua de A $\beta$  o p-tau produzca niveles anormales de estrés en la ER, lo que contribuye a la disfunción de la sinapsis y la neurodegeneración (Gerakis & Hetz, 2018; Plácido et al., 2014) .

En nuestros resultados encontrando sub-expresadas algunas proteínas chaperonas como HSPA5/BiP, PDIA3, PDIA4 y PDIA6 HSP90, HSPA1A, HSPA5, EIF2AK2 y calreticulina y calnexina y sobre-expresadas CRYAB, DDST, ERO1A, HSP40, SAR1A y SEC31A.

Las alteraciones en el mantenimiento de la proteostasis y el plegamiento incorrecto de las proteínas se consideran una característica común en diversas enfermedades neurodegenerativas (EP, ELA, EH Enfermedades priónicas y EA), los cuales se caracterizan por una larga fase silenciosa, donde las proteínas anormales se acumulan y se agregan en el cerebro, lo que lleva a una función sináptica alterada y, eventualmente, a una pérdida neuronal.

La proteostasis está estrechamente relacionada con la mitocondria debido a que la acumulación de proteínas conlleva a toxicidad y estrés oxidativo (Olivero et al., 2018; Poirier, Grimm, Schmitt, & Eckert, 2019)

### **Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.**

La mitocondria es el organelo energético por excelencia su principal función es generar energía en forma de ATP, sin embargo, también regula otros procesos como la apoptosis, la homeostasis del calcio y sodio, o la generación de especies reactivas de oxígeno. La respiración celular es el proceso por el cual se genera CO<sub>2</sub> y se consume O<sub>2</sub>, en el cual la energía liberada se acumula en NADH y FADH reducidos que son usados para la generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa.

---

En la EA existe una disfunción mitocondrial que genera una incapacidad para mantener suficientes niveles de ATP a través de la fosforilación oxidativa así como las alteraciones en el número de mitocondrias, la arquitectura mitocondrial y/o respuestas fisiológicas que desembocan en daños metabólicos (Gao et al 2014, (de Bari, Atlante, Armeni, & Kalapos, 2019; Poirier et al., 2019). Los radicales libres producen la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA. La acumulación excesiva de ROS desencadena estrés oxidativo (Romano et al 2014), el cual produce peroxidación lipídica (Paradies et al 2009), oxidación de proteínas (Stadtman 2006) y mutaciones en el ADN mitocondrial y nuclear (Bohr 2002) (Meijer, Lorin, Blommaert, & Codogno, 2015; Onodera & Ohsumi, 2005).

El estrés oxidativo es el causante de daño en el ADN, RNA lípidos y proteínas que implican la pérdida de función de vías metabólicas y de señalización importantes como la glicólisis la cual es una vía alterada en nuestros resultados, el metabolismo lipídico, el citoesqueleto la degradación de proteínas y neuroinflamación, la mayoría alteradas en nuestros resultados.

También se ha visto que la alcohol deshidrogenasa está aumentada en EA evidenciando niveles elevados de daño oxidativo en el ADN mitocondrial que permite la acumulación gradual de mutaciones en el ADN (Poirier et al., 2019; Santos & Ferreira, 2018). Además, la formación de radicales superóxidos en la mitocondria y su conversión a peróxido de hidrógeno por la enzima SOD2 causa estrés oxidativo, fragmentación de las mitocondrias y apoptosis celular. Además el peróxido de hidrógeno mitocondrial difunde al citosol donde por iones hierro cobre y zinc es catalizado para formar radicales hidroxilo, la peroxidación de lípidos de la membrana, permite la permeabilidad al calcio y otros iones provocando el daño y desequilibrio energético, lo cual altera la función y expresión de algunas ATPasas, estimulando la entrada de calcio a través de receptores NMDA y la formación de poros iónicos que sobrecarga a la célula de calcio y por consiguiente activa la ruta de las caspasas, JNK, y p53 (Butterfield & Boyd-Kimball, 2018; von Bernhardt & Eugén, 2012).



---

En un estudio se realizó el proteoma mitocondrial de las cortezas cerebrales de ratones 3xTg-AD observaron que las alteraciones encontradas en vías relacionadas con el ciclo del ácido cítrico, la fosforilación oxidativa, el metabolismo del piruvato, la glucólisis, el estrés oxidativo, la oxidación de los ácidos grasos, el transporte de iones, la apoptosis y la síntesis de proteínas ocurrieron antes del desarrollo de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, lo que indica que la desregulación mitocondrial es un evento temprano en la EA (Chou et al., 2011; Völgyi et al., 2018). Estos datos concuerdan con nuestros resultados observando alteraciones en el metabolismo energético principalmente en el portador presintomático.

### **Endocitosis y transporte vesicular**

La endocitosis es el proceso celular, por el cual la célula mueve hacia su interior moléculas grandes o partículas, este proceso se puede dar por evaginación, invaginación o por receptores a través de su membrana citoplasmática, formando una vesícula que luego se desprende de la membrana celular y se incorpora al citoplasma. Esta vesícula, llamada endosoma, luego se fusiona con un lisosoma que realizará la digestión del contenido celular.

Dentro de las proteínas sub-expresadas en el portador se encuentra a cadena ligera de clatrina, PML, AP2B1, SNX6, Sortilina, CHMP5.

La endocitosis es crítica para la función y el destino de las moléculas importantes para la etiología de la enfermedad de Alzheimer (EA), ya que los endosomas tempranos son un sitio importante de la generación de péptidos  $\beta$ A, los cuales están notablemente agrandados dentro de las neuronas en el cerebro de Alzheimer (Cataldo et al., 2000; Van Acker, Declerck, Luyckx, Vanden Berghe, & Dewilde, 2019), en estadios tempranos de la EA, datos que concuerdan con nuestros resultados teniendo enriquecida la vía de endocitosis en el portador presintomático.

Las presenilinas también interactúan con proteínas involucradas en el tráfico vesicular intracelular, incluyendo Rab11 (Dumanchin, 1999), con RabGDI (el cual está disminuido en nuestros resultados) (W. Scheper, 2000), con la fosfolipasa D1,

---

sintaxinas y anexina A2 (Smith et al., 2000). Además, la deficiencia de PS1 afecta negativamente a la endocitosis y la transcitosis mediada por receptores en neuronas portadoras de mutaciones en APP y PSEN1 derivadas de iPSCs (Woodruff et al., 2016). Además en células mutantes de PSEN1 se altera el transporte de muchas moléculas como APP, ICAM5, EGFR LRP1 (estos dos últimos disminuidos en el portador sintomático), ITGB1, el receptor de transferrina, ephB y TREM2 (Repetto, Yoon, Zheng, & Kang, 2007; Tamboli et al., 2008).

Además, los endosomas pueden formar los cuerpos multivesiculares (MVBs), los cuales secuestran proteínas en vesículas que pueden ser entregadas a los lisosomas o bien secretadas por exocitosis al exterior de la célula. Debido a su biogénesis los MVBs comparten proteínas con otros organelos como el endosoma, el aparato de Golgi o el lisosoma como RAB5, RAB7, RAB27 y RAB35. Los exosomas son las micro vesículas intraluminales que son secretadas al exterior de la célula y se ha demostrado que los exosomas diseminan la amiloide beta tóxica y la tau hiperfosforilada entre las células (Malm, Loppi, & Kanninen, 2016), así como proteínas patogénicas que están involucradas con otras NDD y, por lo tanto, contribuyen a la pérdida neuronal.

### **Autofagia, fagosomas y Sistema Ubiquitin-Proteosoma (UPS).**

La autofagia es un proceso dinámico mediante el cual el material citosólico, incluidos los orgánulos, las proteínas y los patógenos, se secuestran en las vesículas de membrana llamadas autofagosomas, y luego se envían al lisosoma para su degradación. La autofagia representa un mecanismo celular primordial que prolonga la supervivencia celular durante la inanición.

Durante la autofagia, las proteínas se degradan en aminoácidos, que proporcionan una fuente de energía y probablemente se usan como bloques de construcción para la síntesis de proteínas (Meijer et al., 2015; Onodera & Ohsumi, 2005). Por lo tanto, la autofagia desregulada puede resultar en la acumulación de proteínas dentro de la célula). La autofagia desempeña un papel clave en el metabolismo de las proteínas A $\beta$  y tau, la vía mTOR, la neuroinflamación y el sistema endocannabinoide por lo que el mal funcionamiento de la autofagia neuronal es uno de los factores

---

clave que influyen en el desarrollo de trastornos neurodegenerativos, incluida la EA (Metcalf, García-Arencibia, Hochfeld, & Rubinsztein, 2012), por ejemplo, la inhibición de la fusión de un autofagosoma con un lisosoma (Boland et al., 2008), el aumento en el número de autofagosomas en cerebros humanos con enfermedad de Alzheimer (J.-F. Ma, Huang, Chen, & Halliday, 2010), la reducción de la acidificación lisosomal (Shen & Mizushima, 2014) o la acumulación de proteínas en las células (García-Arencibia, Hochfeld, Toh, & Rubinsztein, 2010). En modelos de ratón, las deficiencias genéticas de las proteínas de autofagia promueven la neurodegeneración dependiente de la edad asociada con la acumulación de agregados de proteínas (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Pickford et al., 2008). Además, el A $\beta$  puede alterar la función lisosomal y, por lo tanto, inhibir su propio aclaramiento autofágico. Además, el autofagosoma, que contiene  $\gamma$ -secretasa y enzimas relacionadas involucradas en la generación de A $\beta$  a partir de formas precursoras, también puede representar una fuente de A $\beta$  en condiciones de fusión autofagosoma-lisosoma deteriorada (Meng et al., 2019). También la angiotensina II desencadena la autofagia y la apoptosis en un modelo in vitro de la enfermedad de Alzheimer (línea PC12) (Tian et al., 2019)

Al igual que la autofagia, el sistema ubiquitina-proteasoma es otra vía de degradación para las proteínas celulares. Los proteasomas son complejos de proteasas de múltiples subunidades que son responsables de la degradación de proteínas innecesarias o dañadas por la proteólisis. La degradación proteasomal produce aminoácidos, que pueden usarse posteriormente en la generación de nuevas proteínas (Tanaka, Suzuki, Hattori, & Mizuno, 2004).

La degradación inadecuada de la proteína mediada por ubiquitina se ha relacionado con varios trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (Atkin & Paulson, 2014)

### **Organización del Citoesqueleto**

El citoesqueleto es la estructura de soporte que integra la señalización intracelular por lo que está estrechamente conectado con muchos procesos y funciones

---

celulares. Hay 3 tipos de fibras que componen el citoesqueleto: los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios.

Los microfilamentos son finas fibras compuestas predominantemente de actina, de 3-6 nm de diámetro, se encuentra en la membrana plasmática ya que se encargan de dar forma a la célula, y participa en las uniones intercelulares o de células con la matriz, la transducción de señales, la movilidad celular y en la citocinesis.

Los microtúbulos son tubos cilíndricos de 20-25 nm en diámetro, compuestos dos proteínas globulares, tubulinas alfa y beta. Cada microtúbulo está compuesto de 13 protofilamentos formados por los dímeros de tubulina. Intervienen en diversos procesos celulares que involucran desplazamiento de vesículas de secreción, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias, así como en la división celular (mitosis y meiosis), ya que forman el huso acromático. Además, constituyen la estructura interna de cilios y flagelos.

Y los filamentos intermedios los cuales son el componente del citoesqueleto más estable, proveen la fuerza de tensión a la célula y miden cerca de 12 nm.

Nuestros resultados arrojan que en el portador sintomático hay una alteración en los procesos basados en microtúbulos. Dentro de las proteínas sub-expresadas están MAP4, KIF5 NIN y TAC2 y dineínas como DYNLRB2, DNAH6, DNAH1 y de las sobre-expresadas Tubulinas como TUBAL3, TUBA4B, TUBB3, kinesinas KIF20B y KIF9, MACF1 y dineínas como DNAH7 y DNHD1.

Los microtúbulos son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de los axones y dendritas a lo largo de la vida de la neurona, y son vulnerables a la degradación y desorganización en una variedad de enfermedades neurodegenerativas ya que estos deben conservar una polaridad para realizar el transporte anterógrado y retrogrado adecuadamente mediante dineínas y kinesinas, sin embargo, en EA y NDD existe una desorganización en los microtúbulos y por tanto un atasco en el transporte (Vickers et al., 2009). Además, como se mencionó en la introducción las taupatías despolimerizan los microtúbulos de las neuronas por una hiperfosforilación de la proteína tau. Las alteraciones en estos procesos asociados

---

a microtúbulos involucran procesos asociados al transporte intracelular y por consiguiente puede contribuir a la acumulación de proteínas dentro de la célula. Algunas de las proteínas sub-expresadas en el portador sintomático en relación al citoesqueleto de actina son la fibronectina, la gelsolina, scinderina e integrinas como ITGAP3, ITGA11, ITGA2 e ITGA5 y las sobre-expresadas ARPC1A, ENAH, MAP2K1, PAK2, ROCK1 y WASF1.

Por otro lado, en el portador presintomático se observó una alteración en el citoesqueleto, pero a nivel de microfilamentos y citoesqueleto de actina lo cual sugiere alteraciones en el movimiento y migración celular, así como en la proliferación celular y la fagocitosis.

### **Vía de las Pentosas Fosfato**

Las células de los tejidos normales generan principalmente adenosina 5'-trifosfato (ATP), a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En estas células, la glucosa se transforma en piruvato a través de la glucólisis, y la mayoría del piruvato entra en el metabolismo oxidativo mitocondrial para generar energía de manera eficiente. Sin embargo, la mayoría de las células cancerosas consumen glucosa a través de la glucólisis, incluso en presencia de suficiente oxígeno (fenómeno llamado efecto de Warburg, que conduce a la producción de piruvato y lactato como metabolitos finales)(Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009). Esta glucólisis aeróbica permite que las células cancerosas generen cantidades suficientes de ATP y otras biomoléculas, incluidos nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos(Jin & Zhou, 2019). La vía de fosfato de pentosa (PPP), también conocida como la vía de fosfogluconato o derivación de monofosfato de hexosa, es una vía metabólica paralela a la glucólisis y representa el primer paso comprometido del metabolismo de la glucosa (Ramos-Martinez, 2017), para la síntesis de ácidos nucleicos y al proporcionar el fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH), que es necesario para la síntesis de ácidos grasos y la supervivencia celular en condiciones de estrés. Nuestros resultados sugieren que pueda existir un proceso similar en las células de epitelio olfatorio de pacientes con EAF.

---

Dentro de las proteínas sub-expresadas en esta vía se encuentran la aldolasa, PGD, PGM2 y la transcetolasa.

### **Glicolisis**

Fisiológicamente, la acumulación de ROS crónica durante el envejecimiento conlleva a la acumulación de mutaciones en el ADNmt que a la larga provocan un daño progresivo y una disfunción de las mitocondrias y esta disfunción es típica en EA y otras NDD como EP. Este deterioro mitocondrial y disminución en la producción de ATP puede causar un cambio metabólico aumentando la glucólisis, características compartidas entre las neuronas en EA y cáncer(Currais, 2015). Este aumento en la glicolisis puede derivar en productos tóxicos como el metioglixal y aumentar la producción de ROS. Además existe una disminución progresiva en la actividad proteolítica relacionada con la edad que puede conducir a la acumulación de proteínas alteradas (Hipkiss, 2017).

En conclusión las enfermedades neurodegenerativas forman un grupo de patologías caracterizadas por ser de origen multifactorial con características neuropatológicas comunes tales como la dinámica anormal de proteínas con degradación y agregación de proteínas defectuosas, estrés oxidativo y formación de radicales libres, alteraciones bioenergéticas y disfunciones mitocondriales y procesos neuroinflamatorios(Ganguly et al., 2017; Jellinger, 2010). Todos estos mecanismos funcionan en conjunto y contribuyen entre ellos impulsando el desarrollo de la patología de la EA. Además de que pueden explicar las alteraciones en el olfato desde estadios tempranos de la enfermedad, ya que estas células están estrechamente relacionadas con el bulbo olfatorio, estructura anatómica atrofiada en este tipo de pacientes y donde se encuentran células precursoras neurales encargadas de la regeneración de las neuronas sensoriales.

### **BIOMARCADORES EN LA EA Y OTRAS ENFERMEDADES**

Además de los marcadores conocidos y reportados para la EA y encontrados en nuestros resultados como PI4KA, ADAM10, DNAH6, S100A4, TNXB, CEP152, DES, ITGA11, DNHD1, CRMP1, CSM2. Encontramos algunos marcadores o proteínas reportadas en otras enfermedades neurodegenerativas como ELA: FAT4,

---

ANXA11, FUS, MATR3, SOD1 y SOD2, DCTN1 y S100A10, Enfermedad de Parkinson: YWHAE, YWHAB, HSPA5, y unidades del proteasoma como PSMA4 y PSMA6, Enfermedad de Huntington: ADAM10, CHMP5, PIKFYVE, CASP3, SACM1L, CUL4B, ERBIN, MATR3 , OXR14, SRSF10 las cuales resultaron sub-expresadas en nuestro estudio y HTT, PRPF4B, RPS7, STAM2, CYCS, KALRN, NBN, ATP2B3, NOL8, ROCK1 sobre-expresadas . Además de algunas proteínas reportadas y asociados a paraplejias espásticas hereditarias SERBP1, YWHAE, SETX, ATRX, BAG2, FAM20A, AKR7A2, CANX, HERC1, SCARB2 sub-expresadas, y ENAH, SRRM2, MLDH18A1, PRPF4B, RAB21, UBR5 sub-expresadas y con distrofias musculares, como COL1A1, MAP4, S100A4, NES, STAT1, DPYSL2 y SAMD4A

S100A10, NEB, CMYA5, COL1A1 Y COL1A3, PLEC, RYR1 las cuales son dos grupos de enfermedades con sintomatología muy similar a la encontrada en estos portadores.

Nuestro estudio proporciona una lista de posibles proteínas, procesos biológicos y vías de señalización involucradas en la fisiopatología de la enfermedad, la mayoría de los cuales coinciden con lo reportado en estudios de EA, y otras NDD; sin embargo, este tipo de estudios han sido realizados en tejido cerebral y neuronas, a diferencia de este proyecto, el cual fue realizado en células mesenquimales precursoras neurales, lo cual sugiere que estas células mesenquimales de epitelio olfatorio son un modelo adecuado y con alto potencial de investigación para el estudio de la EA e incluso otras NDD.

Otros estudios son necesarios para profundizar en el entendimiento de algunos mecanismos alterados, así como la identificación de otros mecanismos, además de que se debe ampliar la población de estudio para corroborar los resultados.

Este estudio da las bases y pautas iniciales para el descubrimiento de nuevos marcadores para el diagnóstico temprano y el desarrollo de terapias más efectivas para el tratamiento de la EA.

---

## 9. CONCLUSIONES

- Las células aisladas del epitelio olfatorio poseen los marcadores característicos de las células mesenquimales y además presentan marcadores de linaje ectodérmico.
- La mutación A431E induce alteraciones en el perfil de expresión de proteínas, en las células precursoras neurales de epitelio olfatorio aislados de individuos presintomáticos de la enfermedad y estas alteraciones aumentan en los individuos sintomáticos.
- Las proteínas diferencialmente expresadas en las células portadoras de la mutación A431E PSEN1, están relacionadas principalmente a alteraciones en el citoesqueleto, la acumulación y transporte de proteínas, mal plegamiento de proteínas, sobre todo en los aislados de individuos que se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad. Así mismo ocurre con las proteínas alteradas, relacionadas con el metabolismo energético y la endocitosis, estas alteraciones se presentan en estadios presintomáticos de la enfermedad.
- Estos resultados sugieren que la expresión de las proteínas alteradas podría afectar mecanismos fundamentales que se comparten con alteraciones presentadas en otras enfermedades neurodegenerativas, desmielinizantes y musculares.
- El presente estudio es el primer estudio proteómico cuantitativo realizado en células precursoras neurales, derivadas del epitelio olfatorio donde se reportan alteraciones en la fisiología celular en portadores de la mutación A431E PSEN1, causante de EAF que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad y que concuerdan con algunos mecanismos fisiopatológicos de la EA reportados en la literatura e incluso que podrían ayudar a explicar un poco la sintomatología de la enfermedad.
- Estos resultados dan la pauta para seguir investigando sobre el papel que tienen las proteínas alteradas y evaluar si pueden ser utilizadas como biomarcadores tempranos de la enfermedad y futuros blancos terapéuticos.



- 
- El modelo de estudio de células precursoras neurales de epitelio olfatorio es un modelo útil, accesible, sencillo y no invasivo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

## 10. PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de muestras de pacientes portadores de la mutación y controles, así como de pacientes con EAIT para compararlos.
- Realizar un análisis proteómico tipo “label free” entre portadores presintomáticos y sintomáticos.
- Corroborar y validar por diferentes metodologías, como WB e IF las proteínas diferencialmente expresadas.
- Evaluación de vías de señalización, así como interacciones proteína-proteína
- Definir un panel de proteínas que puedan ser útiles para el diagnóstico precoz de la EAIT.
- Diferenciación celular a estirpes neurales y realización de estudios proteómicos con/sin inducción de beta amiloide.

## 11. REFERENCIAS

- Abdi, F., Quinn, J. F., Jankovic, J., McIntosh, M., Leverenz, J. B., Peskind, E., ... Zhang, J. (2006). Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 9(3), 293-348.
- Ahmad, K., Baig, M. H., Mushtaq, G., Kamal, M. A., Greig, N. H., & Choi, I. (2017). Commonalities in Biological Pathways, Genetics, and Cellular Mechanism between Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Diseases: An In Silico-Updated Overview. *Current Alzheimer research*, 14(11), 1190-1197.
- Al Eissa, M. M., Sharp, S. I., O'Brien, N. L., Fiorentino, A., Bass, N. J., Curtis, D., & McQuillin, A. (2019). Genetic association and functional characterization of MCPH1 gene variation in bipolar disorder and schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 180(4), 258-265.
- An, J., Zhou, Y., Zhang, M., Xie, Y., Ke, S., Liu, L., ... Chen, Z. (2019). Exenatide alleviates mitochondrial dysfunction and cognitive impairment in the 5x<sup>FAD</sup> mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 370, 111932.
- Andersen, K. M., Madsen, L., Prag, S., Johnsen, A. H., Semple, C. A., Hendil, K. B., & Hartmann-Petersen, R. (2009). Thioredoxin Txn1/TRP32 Is a Redox-active Cofactor of the 26 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 15246-15254.
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853-1861.
- Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M. D., Guardia-Laguarta, C., de Groof, A. J. C., Madra, M., ... Schon, E. A. (2012). Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *The EMBO Journal*, 31(21), 4106-4123.
- Arroyo, M., Kuriyama, R., Guerrero, I., Keifenheim, D., Cañuelo, A., Calahorra, J., ... Marchal, J. A. (2019). MCPH1 is essential for cellular adaptation to the G2-phase decatenation checkpoint. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(7), 8363-8374.
- Atkin, G., & Paulson, H. (2014). Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 63.
- Attems, J., Walker, L., & Jellinger, K. A. (2014). Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 127(4), 459-475.
- Baksh, D., Song, L., & Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(3), 301-316.
- Barquilla, A., & Pasquale, E. B. (2015). Eph receptors and ephrins: Therapeutic opportunities. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, 465-487.
- Becker, T., Horvath, S. E., Böttinger, L., Gebert, N., Daum, G., & Pfanner, N. (2013). Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(23), 16451-16459.

- Beel, S., Moisse, M., Damme, M., De Muynck, L., Robberecht, W., Van Den Bosch, L., ... Van Damme, P. (2017). Progranulin functions as a cathepsin D chaperone to stimulate axonal outgrowth in vivo. *Human Molecular Genetics*, 26(15), 2850-2863.
- Benítez-King, G., Riquelme, A., Ortíz-López, L., Berlanga, C., Rodríguez-Verdugo, M. S., Romo, F., ... 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.
- Berridge, M. J. (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(3), 441-449.
- Bezprozvanny, I. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends in molecular medicine*, 15(3), 89-100.
- Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2012). An Involvement of Oxidative Stress in Endoplasmic Reticulum Stress and Its Associated Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 434-456.
- Biagioli, M., Pinto, M., Cesselli, D., Zaninello, M., Lazarevic, D., Roncaglia, P., ... Gustincich, S. (2009). Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15454-15459.
- Braak, H., & Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiology of Aging*, 18(4), 351-357.
- Brown, J. D., Day, A. M., Taylor, S. R., Tomalin, L. E., Morgan, B. A., & Veal, E. A. (2013). A Peroxiredoxin Promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling and Oxidative Stress Resistance by Oxidizing a Thioredoxin Family Protein. *Cell Reports*, 5(5), 1425-1435.
- Bustos, V., Pulina, M. V., Bispo, A., Lam, A., Flajolet, M., Gorelick, F. S., & Greengard, P. (2017). Phosphorylated Presenilin 1 decreases  $\beta$ -amyloid by facilitating autophagosome-lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), 7148-7153.
- Butterfield, D. A., & Boyd-Kimball, D. (2018). Oxidative Stress, Amyloid- $\beta$  Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 62(3), 1345-1367.
- Cai, D., Netzer, W. J., Zhong, M., Lin, Y., Du, G., Frohman, M., ... Greengard, P. (2006). Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1941-1946.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., ... Frebourg, T. (1999). Early-Onset Autosomal Dominant Alzheimer Disease: Prevalence, Genetic Heterogeneity, and Mutation Spectrum. *The American Journal of Human Genetics*, 65(3), 664-670.
- Caplan, A. I. (2005). Review: Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Engineering*, 11(7-8), 1198-1211.
- Carrette, O., Demalte, I., Scherl, A., Yalkinoglu, O., Corthals, G., Burkhard, P., ... Sanchez, J.-C. (2003). A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics*, 3(8), 1486-1494.

- Carroll, C. M., & Li, Y.-M. (2016). Physiological and pathological roles of the  $\gamma$ -secretase complex. *Brain Research Bulletin*, 126(Pt 2), 199-206.
- Cataldo, A. M., Peterhoff, C. M., Troncoso, J. C., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., & Nixon, R. A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: Differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *The American Journal of Pathology*, 157(1), 277-286.
- Caviston, J. P., & Holzbaur, E. L. F. (2009). Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends in Cell Biology*, 19(4), 147-155.
- Chakraborty, A. B., Berger, S. J., & Gebler, J. C. (2007). Use of an integrated MS – multiplexed MS/MS data acquisition strategy for high-coverage peptide mapping studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(5), 730-744.
- Chang, C.-Y., Ke, D.-S., & Chen, J.-Y. (2009). Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurologica Taiwanica*, 18(4), 231-241.
- Chen, W.-W., Zhang, X., & Huang, W.-J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(4), 3391-3396.
- Chen, Z., Simmons, M. S., Perry, R. T., Wiener, H. W., Harrell, L. E., & Go, R. C. P. (2008). Genetic association of neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) With Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 147(3), 363-369.
- Chou, J. L., Shenoy, D. V., Thomas, N., Choudhary, P. K., Laferla, F. M., Goodman, S. R., & Breen, G. A. M. (2011). Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Proteomics*, 74(4), 466-479.
- Chouraki, V., & Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's Disease. En *Advances in Genetics* (Vol. 87, pp. 245-294).
- Cisbani, G., & Cicchetti, F. (2012). An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. *Cell Death & Disease*, 3(8), e382-e382.
- Craft, G. E., Chen, A., & Nairn, A. C. (2013). Recent advances in quantitative neuroproteomics. *Methods (San Diego, Calif.)*, 61(3), 186-218.
- Cristóvão, J. S., & Gomes, C. M. (2019). S100 Proteins in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 463.
- Currais, A. (2015). Ageing and inflammation – A central role for mitochondria in brain health and disease. *Ageing Research Reviews*, 21, 30-42.
- de Bari, L., Atlante, A., Armeni, T., & Kalapos, M. P. (2019). Synthesis and metabolism of methylglyoxal, S-D-lactoylglutathione and D-lactate in cancer and Alzheimer's disease. Exploring the crossroad of eternal youth and premature aging. *Ageing Research Reviews*, 53, 100915.
- De La Rosa-Prieto, C., De Moya-Pinilla, M., Saiz-Sanchez, D., Ubeda-Banon, I., Arzate, D. M., Flores-Cuadrado, A., ... Martinez-Marcos, A. (2015). Olfactory and cortical projections to bulbar and hippocampal adult-born neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 4.

- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, 38(1), 9-12.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and  $\gamma$ -secretase: Structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a006304.
- Desai, S. D., Reed, R. E., Burks, J., Wood, L. M., Pullikuth, A. K., Haas, A. L., ... Sankar, S. (2012). ISG15 disrupts cytoskeletal architecture and promotes motility in human breast cancer cells. *Experimental Biology and Medicine*, 237(1), 38-49.
- Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., & García-González, V. (2015). Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 17193-17230.
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., & Tenzer, S. (2016). Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nature Protocols*, 11(4), 795-812.
- Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Donato, R., Cannon, B. R., Sorci, G., Riuzzi, F., Hsu, K., Weber, D. J., & Geczy, C. L. (2013). Functions of S100 proteins. *Current Molecular Medicine*, 13(1), 24-57.
- Duce, J. A., Smith, D. P., Blake, R. E., Crouch, P. J., Li, Q.-X., Masters, C. L., & Trounce, I. A. (2006). Linker histone H1 binds to disease associated amyloid-like fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 361(3), 493-505.
- Dumanchin, C. (1999). Presenilins interact with Rab11, a small GTPase involved in the regulation of vesicular transport. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1263-1269.
- Dumanchin, C., Czech, C., Campion, D., Cuif, M. H., Poyot, T., Martin, C., ... Frebourg, T. (1999). Presenilins interact with Rab11, a small GTPase involved in the regulation of vesicular transport. *Human Molecular Genetics*, 8(7), 1263-1269.
- Dzimianski, J. V., Scholte, F. E. M., Bergeron, É., & Pegan, S. D. (2019). ISG15: It's Complicated. *Journal of Molecular Biology*, S0022283619301366.
- Erde, J., Ogorzalek Loo, R. R., & Loo, J. A. (2017). Improving Proteome Coverage and Sample Recovery with Enhanced FASP (eFASP) for Quantitative Proteomic Experiments. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1550, 11-18.
- Erten-Lyons, D., Wilmot, B., Anur, P., McWeeney, S., Westaway, S. K., Silbert, L., ... Kaye, J. (2011). Microcephaly genes and risk of late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 25(3), 276-282.
- Fan, J., Hu, Z., Zeng, L., Lu, W., Tang, X., Zhang, J., & Li, T. (2008). Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26(6), 523-534.
- Feng, H., Sjögren, B., Karaj, B., Shaw, V., Gezer, A., & Neubig, R. R. (2017). Movement disorder in GNAO1 encephalopathy associated with gain-of-function mutations. *Neurology*, 89(8), 762-770.

- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4926), 64-71.
- Fenselau, C., & Yao, X. (2007). Proteolytic labeling with <sup>18</sup>O for comparative proteomics studies: Preparation of <sup>18</sup>O-labeled peptides and the <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O peptide mixture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 359, 135-142.
- Fernández-Irigoyen, J., Corrales, F. J., & Santamaría, E. (2012). Proteomic atlas of the human olfactory bulb. *Journal of Proteomics*, 75(13), 4005-4016.
- Fields, S. (2001). Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5507), 1221-1224.
- Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007). Amyloid- $\beta$  Aggregation. *Neurodegenerative Diseases*, 4(1), 13-27.
- Finehout, E. J., Franck, Z., Choe, L. H., Relkin, N., & Lee, K. H. (2007). Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 61(2), 120-129.
- Furuyama, H., Chiba, S., Okabayashi, T., Yokota, S., Nonaka, M., Imai, T., ... Matsumoto, H. (2006). Single nucleotide polymorphisms and functional analysis of MxA promoter region in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 249(2), 153-157.
- Galimberti, D., & Scarpini, E. (2011). Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: Friend or foe? *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 3, 252-266.
- Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U., & Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 797-810.
- Ge, L., Jiang, M., Duan, D., Wang, Z., Qi, L., Teng, X., ... Lu, M. (2016). Secretome of Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cell, a Multiple Potential Stem Cell. *Stem Cells International*, 2016, 1-16.
- Gerakis, Y., & Hetz, C. (2018). Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *The FEBS Journal*, 285(6), 995-1011.
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., ... Łos, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24-49.
- Gonatas, N. K., Stieber, A., & Gonatas, J. O. (2006). Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *Journal of the Neurological Sciences*, 246(1-2), 21-30.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913-4917.
- Guo, E., Liu, H., & Liu, X. (2017). Overexpression of SCUBE2 Inhibits Proliferation, Migration, and Invasion in Glioma Cells. *Oncology Research*, 25(3), 437-444.
- Haapasalo, A., & Kovacs, D. M. (2011). The many substrates of presenilin/ $\gamma$ -secretase. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 25(1), 3-28.
- Han, H. G., Moon, H. W., & Jeon, Y. J. (2018). ISG15 in cancer: Beyond ubiquitin-like protein. *Cancer Letters*, 438, 52-62.

- Hany E. Marei, A. A. (s. f.). Recent Perspective About the Amyloid Cascade Hypothesis and Stem Cell-Based Therapy in the Treatment of Alzheimer's Disease. *FCDR-Alzheimer Disorder*, 2016, Vol. 5, 3-33 3.
- Haque, Md. M., Murale, D. P., Kim, Y. K., & Lee, J.-S. (2019). Crosstalk between Oxidative Stress and Tauopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8).
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353-356.
- Hartlage-Rübsamen, M., Ratz, V., Zeitschel, U., Finzel, L., Machner, L., Köppen, J., ... Roßner, S. (2019). Endogenous mouse huntingtin is highly abundant in cranial nerve nuclei, co-aggregates to Abeta plaques and is induced in reactive astrocytes in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 79.
- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5983), 1281-1284.
- Herbert, B., Galvani, M., Hamdan, M., Olivieri, E., MacCarthy, J., Pedersen, S., & Righetti, P. G. (2001). Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: Why, when, and how? *Electrophoresis*, 22(10), 2046-2057.
- Hipkiss, A. R. (2017). On the Relationship between Energy Metabolism, Proteostasis, Aging and Parkinson's Disease: Possible Causative Role of Methylglyoxal and Alleviative Potential of Carnosine. *Aging and Disease*, 8(3), 334.
- Horne-Badovinac, S. (2017). Fat-like cadherins in cell migration-leading from both the front and the back. *Current Opinion in Cell Biology*, 48, 26-32.
- Huang, H.-C., Tang, D., Lu, S.-Y., & Jiang, Z.-F. (2015). Endoplasmic reticulum stress as a novel neuronal mediator in Alzheimer's disease. *Neurological Research*, 37(4), 366-374.
- Hutt, D. M., Powers, E. T., & Balch, W. E. (2009). The proteostasis boundary in misfolding diseases of membrane traffic. *FEBS Letters*, 583(16), 2639-2646.
- Ihara, Y., Morishima-Kawashima, M., & Nixon, R. (2012). The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8).
- Jazurek, M., Ciesiolka, A., Starega-Roslan, J., Bilinska, K., & Krzyzosiak, W. J. (2016). Identifying proteins that bind to specific RNAs—Focus on simple repeat expansion diseases. *Nucleic Acids Research*, 44(19), 9050-9070.
- Jellinger, K. A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 457-487.
- Jia, Y. L., Fu, Z. X., Zhang, B. H., & Jia, Y. J. (2017). Hippocampal overexpression of Down syndrome cell adhesion molecule in amyloid precursor protein transgenic mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 50(6), e6049.
- Jia, Y.-L., Jing, L.-J., Li, J.-Y., Lu, J.-J., Han, R., Wang, S.-Y., ... Jia, Y.-J. (2011). Expression and significance of DSCAM in the cerebral cortex of APP transgenic mice. *Neuroscience Letters*, 491(2), 153-157.

- Jiménez-Vaca, A. L., Benitez-King, G., Ruiz, V., Ramírez-Rodríguez, G. B., Hernández-de la Cruz, B., Salamanca-Gómez, F. A., ... Ordoñez-Razo, R. M. (2018). Exfoliated Human Olfactory Neuroepithelium: A Source of Neural Progenitor Cells. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2516-2523.
- Jin, L., & Zhou, Y. (2019). Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncology Letters*, 17(5), 4213-4221.
- Jourdain, A. A., Popow, J., de la Fuente, M. A., Martinou, J.-C., Anderson, P., & Simarro, M. (2017). The FASTK family of proteins: Emerging regulators of mitochondrial RNA biology. *Nucleic Acids Research*, 45(19), 10941-10947.
- Karas, Michael., & Hillenkamp, Franz. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301.
- Karlin, K. L., Mondal, G., Hartman, J. K., Tyagi, S., Kurley, S. J., Bland, C. S., ... Westbrook, T. F. (2014). The Oncogenic STP Axis Promotes Triple-Negative Breast Cancer via Degradation of the REST Tumor Suppressor. *Cell Reports*, 9(4), 1318-1332.
- Kim, H. J., Yoon, J., Matsuura, A., Na, J.-H., Lee, W.-K., Kim, H., ... Lee, H. H. (2015). Structural and biochemical insights into the role of testis-expressed gene 14 (TEX14) in forming the stable intercellular bridges of germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(40), 12372-12377.
- Knopman, D. S., Haeberlein, S. B., Carrillo, M. C., Hendrix, J. A., Kerchner, G., Margolin, R., ... Siemers, E. (2018). The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 563-575.
- Koizumi, H., Fujioka, H., Togashi, K., Thompson, J., Yates, J. R., Gleeson, J. G., & Emoto, K. (2017). DCLK1 phosphorylates the microtubule-associated protein MAP7D1 to promote axon elongation in cortical neurons. *Developmental Neurobiology*, 77(4), 493-510.
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2010). Current concepts of neuropathological diagnostics in practice: Neurodegenerative diseases. *Clinical Neuropathology*, 29(5), 271-288.
- Kovalenko, O. V., Wiese, C., & Schild, D. (2006). RAD51AP2, a novel vertebrate- and meiotic-specific protein, shares a conserved RAD51-interacting C-terminal domain with RAD51AP1/PIR51. *Nucleic Acids Research*, 34(18), 5081-5092.
- Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., & Dunphy, W. G. (2010). Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication. *Cell*, 140(3), 349-359.
- LaFerla, F. M., & Green, K. N. (2012). Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a006320-a006320.
- Lanoiselée, H.-M., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., ... collaborators of the CNR-MAJ project. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLOS Medicine*, 14(3), e1002270.
- Li, J., Ping, J. L., Ma, B., Chen, Y. R., & Li, L. Q. (2017). DIP2C expression in breast cancer and its clinical significance. *Pathology, Research and Practice*, 213(11), 1394-1399.



- Li, J.-Y., Patterson, M., Mikkola, H. K. A., Lowry, W. E., & Kurdistani, S. K. (2012). Dynamic distribution of linker histone H1.5 in cellular differentiation. *PLoS Genetics*, *8*(8), e1002879.
- Li, Z., Pei, X.-H., Yan, J., Yan, F., Cappell, K. M., Whitehurst, A. W., & Xiong, Y. (2014). CUL9 mediates the functions of the 3M complex and ubiquitylates survivin to maintain genome integrity. *Molecular Cell*, *54*(5), 805-819.
- Lian, T.-H., Zhu, W.-L., Li, S.-W., Liu, Y.-O., Guo, P., Zuo, L.-J., ... Zhang, W. (2019). Clinical, Structural, and Neuropathological Features of Olfactory Dysfunction in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*.
- Lin, Y.-C., Lee, Y.-C., Li, L.-H., Cheng, C.-J., & Yang, R.-B. (2014). Tumor suppressor SCUBE2 inhibits breast-cancer cell migration and invasion through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 1), 85-100.
- Lisabeth, E. M., Falivelli, G., & Pasquale, E. B. (2013). Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(9).
- Liu, L., Zeng, M., & Stamler, J. S. (1999). Hemoglobin induction in mouse macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(12), 6643-6647.
- Lussier, M. P., Cayouette, S., Lepage, P. K., Bernier, C. L., Francoeur, N., St-Hilaire, M., ... Boulay, G. (2005). MxA, a Member of the Dynamin Superfamily, Interacts with the Ankyrin-like Repeat Domain of TRPC. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(19), 19393-19400.
- Ma, S. L., Huang, W., Tang, N. L. S., & Lam, L. C. W. (2012). MxA polymorphisms are associated with risk and age-at-onset in Alzheimer disease and accelerated cognitive decline in Chinese elders. *Rejuvenation Research*, *15*(5), 516-522.
- Malik, R., Dulla, K., Nigg, E. A., & Körner, R. (2010). From proteome lists to biological impact—Tools and strategies for the analysis of large MS data sets. *Proteomics*, *10*(6), 1270-1283.
- Malm, T., Loppi, S., & Kanninen, K. M. (2016). Exosomes in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *97*, 193-199.
- Manza, L. L., Stamer, S. L., Ham, A.-J. L., Codreanu, S. G., & Liebler, D. C. (2005). Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics*, *5*(7), 1742-1745.
- Marei, H. E. S., Althani, A., Afifi, N., Abd-Elmaksoud, A., Bernardini, C., Michetti, F., ... Cenciarelli, C. (2013). Over-expression of hNGF in adult human olfactory bulb neural stem cells promotes cell growth and oligodendrocytic differentiation. *PloS One*, *8*(12), e82206.
- Marshak, D. R., Pesce, S. A., Stanley, L. C., & Griffin, W. S. (1992). Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiology of Aging*, *13*(1), 1-7.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., Yardin, C., & Terro, F. (2013). Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, *12*(1), 289-309.

- McCarthy, J. V., Twomey, C., & Wujek, P. (2009). Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(9), 1534-1555. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8435-9>
- Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E., & Sitek, B. (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(8), 1581-1590.
- Meijer, A. J., Lorin, S., Blommaart, E. F., & Codogno, P. (2015). Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids*, 47(10), 2037-2063.
- Mendez, M. F. (2017). Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurologic Clinics*, 35(2), 263-281.
- Meng, T., Lin, S., Zhuang, H., Huang, H., He, Z., Hu, Y., ... Feng, D. (2019). Recent progress in the role of autophagy in neurological diseases. *Cell Stress*, 3(5), 141-161.
- Miron, J., Picard, C., Nilsson, N., Frappier, J., Dea, D., Thérroux, L., ... Poirier, J. (2018). CDK5RAP2 gene and tau pathophysiology in late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(6), 787-796.
- Mondal, G., Ohashi, A., Yang, L., Rowley, M., & Couch, F. J. (2012). Tex14, a Plk1-Regulated Protein, Is Required for Kinetochore-Microtubule Attachment and Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint. *Molecular Cell*, 45(5), 680-695.
- Monteoliva, L., & Albar, J. P. (2004). Differential proteomics: An overview of gel and non-gel based approaches. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 3(3), 220-239.
- Montesinos, M. L. (2014). Roles for DSCAM and DSCAML1 in central nervous system development and disease. *Advances in Neurobiology*, 8, 249-270.
- Morfini, G. A., Burns, M., Binder, L. I., Kanaan, N. M., LaPointe, N., Bosco, D. A., ... Brady, S. T. (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(41), 12776-12786.
- Mrak, R. E., & Griffinbc, W. S. (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 22(6), 915-922.
- Muchowski, P. J., & Wacker, J. L. (2005). Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(1), 11-22.
- Mungenast, A. E., Siegert, S., & Tsai, L.-H. (2016). Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Molecular and cellular neurosciences*, 73, 13-31.
- Murrell, J., Ghetti, B., Cochran, E., Macias-Islas, M. A., Medina, L., Varpetian, A., ... 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.
- Murrell, W., Féron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellette, B., ... Mackay-Sim, A. (2005). Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Developmental Dynamics*, 233(2), 496-515.

- Naiki, H., & Nagai, Y. (2009). Molecular pathogenesis of protein misfolding diseases: Pathological molecular environments versus quality control systems against misfolded proteins. *Journal of Biochemistry*, *146*(6), 751-756.
- Nakamura, K., Ohya, W., Funakoshi, H., Sakaguchi, G., Kato, A., Takeda, M., ... Nakamura, T. (2006). Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *84*(4), 874-890.
- Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2013). The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters*, *587*(13), 2046-2054.
- Nesic, I., Guix, F. X., Vennekens, K., Michaki, V., Van Veldhoven, P. P., Feiguin, F., ... Wahle, T. (2012). Alterations in phosphatidylethanolamine levels affect the generation of A $\beta$ . *Aging Cell*, *11*(1), 63-72.
- Newton, D. A., Rao, K. M. K., Dluhy, R. A., & Baatz, J. E. (2006). Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(9), 5668-5676.
- Nisbet, R. M., & Götz, J. (2018). Amyloid- $\beta$  and Tau in Alzheimer's Disease: Novel Pathomechanisms and Non-Pharmacological Treatment Strategies. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *64*(s1), S517-S527.
- Nishi, H., Inagi, R., Kato, H., Tanemoto, M., Kojima, I., Son, D., ... Nangaku, M. (2008). Hemoglobin is expressed by mesangial cells and reduces oxidant stress. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *19*(8), 1500-1508.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *250*(10), 4007-4021.
- Oh, S. S., Sullivan, K. A., Wilkinson, J. E., Backus, C., Hayes, J. M., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2012). Neurodegeneration and early lethality in superoxide dismutase 2-deficient mice: A comprehensive analysis of the central and peripheral nervous systems. *Neuroscience*, *212*, 201-213.
- Olivero, P., Lozano, C., Sotomayor-Zárate, R., Meza-Concha, N., Arancibia, M., Córdova, C., ... Marchant, I. (2018). Proteostasis and Mitochondrial Role on Psychiatric and Neurodegenerative Disorders: Current Perspectives. *Neural Plasticity*, *2018*, 6798712.
- Olsen, J. V., Ong, S.-E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *3*(6), 608-614.
- Onodera, J., & Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(36), 31582-31586.
- Pagano, S. F., Impagnatiello, F., Girelli, M., Cova, L., Grioni, E., Onofri, M., ... Parati, E. A. (2000). Isolation and Characterization of Neural Stem Cells from the Adult Human Olfactory Bulb. *Stem Cells*, *18*(4), 295-300.
- Parra, M. A., Baez, S., Allegri, R., Nitri, R., Lopera, F., Slachevsky, A., ... Ibanez, A. (2018). Dementia in Latin America: Assessing the present and envisioning the future. *Neurology*, *90*(5), 222-231.
- Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M., & Atkin, J. D. (2015). The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*, 80.

- Pitulescu, M. E., & Adams, R. H. (2010). Eph/ephrin molecules—A hub for signaling and endocytosis. *Genes & Development*, *24*(22), 2480-2492.
- Plácido, A. I., Pereira, C. M. F., Duarte, A. I., Candeias, E., Correia, S. C., Santos, R. X., ... Moreira, P. I. (2014). The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: Implications for Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1842*(9), 1444-1453.
- Poirier, Y., Grimm, A., Schmitt, K., & Eckert, A. (2019). Link between the unfolded protein response and dysregulation of mitochondrial bioenergetics in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *76*(7), 1419-1431.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *9*(1), 63-75.e2.
- Puchades, M., Hansson, S. F., Nilsson, C. L., Andreasen, N., Blennow, K., & Davidsson, P. (2003). Proteomic studies of potential cerebrospinal fluid protein markers for Alzheimer's disease. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *118*(1-2), 140-146.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, *362*(4), 329-344.
- Ramos-Martinez, J. I. (2017). The regulation of the pentose phosphate pathway: Remember Krebs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *614*, 50-52.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 640-651.
- Repetto, E., Yoon, I.-S., Zheng, H., & Kang, D. E. (2007). Presenilin 1 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Turnover and Signaling in the Endosomal-Lysosomal Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(43), 31504-31516.
- Richter, F., Meurers, B. H., Zhu, C., Medvedeva, V. P., & Chesselet, M.-F. (2009). Neurons express hemoglobin alpha- and beta-chains in rat and human brains. *The Journal of Comparative Neurology*, *515*(5), 538-547.
- Ringman, J. M., Casado, M., Van Berlo, V., Pa, J., Joseph-Mathurin, N., Fagan, A. M., ... Morris, J. C. (2017). A novel PSEN1 (S230N) mutation causing early-onset Alzheimer's Disease associated with prosopagnosia, hoarding, and Parkinsonism. *Neuroscience Letters*, *657*, 11-15.
- Rogaeva, E. A., Fafel, K. C., Song, Y. Q., Medeiros, H., Sato, C., Liang, Y., ... St George-Hyslop, P. (2001). Screening for PS1 mutations in a referral-based series of AD cases: 21 novel mutations. *Neurology*, *57*(4), 621-625.
- Roher, A. E., Maarouf, C. L., Sue, L. I., Hu, Y., Wilson, J., & Beach, T. G. (2009). Proteomics-derived cerebrospinal fluid markers of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, *14*(7), 493-501.
- Roisen, F. J., Klueber, K. M., Lu, C. L., Hatcher, L. M., Dozier, A., Shields, C. B., & Maguire, S. (2001). Adult human olfactory stem cells. *Brain Research*, *890*(1), 11-22.
- Roque, A., Sortino, R., Ventura, S., Ponte, I., & Suau, P. (2015). Histone H1 Favors Folding and Parallel Fibrillar Aggregation of the 1-42 Amyloid- $\beta$  Peptide. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, *31*(24), 6782-6790.

- Rowe, C. C., Bourgeat, P., Ellis, K. A., Brown, B., Lim, Y. Y., Mulligan, R., ... Villemagne, V. L. (2013). Predicting Alzheimer disease with  $\beta$ -amyloid imaging: Results from the Australian imaging, biomarkers, and lifestyle study of ageing: Predicting AD. *Annals of Neurology*, *74*(6), 905-913.
- Ruan, Y., Zheng, X.-Y., Zhang, H.-L., Zhu, W., & Zhu, J. (2012). Olfactory dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroscience Research*, *90*(9), 1693-1700.
- Rudzinski, L. A., Fletcher, R. M., Dickson, D. W., Crook, R., Hutton, M. L., Adamson, J., & Graff-Radford, N. R. (2008). Early Onset Familial Alzheimer Disease With Spastic Paraparesis, Dysarthria, and Seizures and N135S Mutation in PSEN1: *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, *22*(3), 299-307.
- Ryter, S. W., Cloonan, S. M., & Choi, A. M. K. (2013). Autophagy: A Critical Regulator of Cellular Metabolism and Homeostasis. *Molecules and Cells*, *36*(1), 7-16.
- Sachse, S. M., Lievens, S., Ribeiro, L. F., Dascenco, D., Masschaele, D., Horr , K., ... Schmucker, D. (2019). Nuclear import of the DSCAM-cytoplasmic domain drives signaling capable of inhibiting synapse formation. *The EMBO Journal*, *38*(6).
- Santos, L. E., & Ferreira, S. T. (2018). Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, *136*(Pt B), 350-360.
- Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, *89*(5), 910-926.
- Scheper, W. (2000). Alzheimer's presenilin 1 is a putative membrane receptor for rab GDP dissociation inhibitor. *Human Molecular Genetics*, *9*(2), 303-310.
- Scheper, Wiep, & Hoozemans, J. J. M. (2009). Endoplasmic reticulum protein quality control in neurodegenerative disease: The good, the bad and the therapy. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(5), 615-626.
- Smith, S. K., Anderson, H. A., Yu, G., Robertson, A. G., Allen, S. J., Tyler, S. J., ... Dawbarn, D. (2000). Identification of syntaxin 1A as a novel binding protein for presenilin-1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *78*(1-2), 100-107.
- Soosman, S. K., Joseph-Mathurin, N., Braskie, M. N., Bordelon, Y. M., Wharton, D., Casado, M., ... Ringman, J. M. (2016). Widespread white matter and conduction defects in PSEN1-related spastic paraparesis. *Neurobiology of Aging*, *47*, 201-209.
- Souza, G. H. M. F., Guest, P. C., & Martins-de-Souza, D. (2017). LC-MSE, Multiplex MS/MS, Ion Mobility, and Label-Free Quantitation in Clinical Proteomics. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1546*, 57-73.
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, *12*(6), 609-622.
- Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., ... Thompson, L. M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6763-6768.
- Strehler, E. E., & Thayer, S. A. (2018). Evidence for a role of plasma membrane calcium pumps in neurodegenerative disease: Recent developments. *Neuroscience Letters*, *663*, 39-47.
- Suga, K., Tomiyama, T., Mori, H., & Akagawa, K. (2004). Syntaxin 5 interacts with presenilin holoproteins, but not with their N- or C-terminal fragments, and affects beta-amyloid peptide production. *The Biochemical Journal*, *381*(Pt 3), 619-628.

- Sullivan, R., Yau, W. Y., O'Connor, E., & Houlden, H. (2019). Spinocerebellar ataxia: An update. *Journal of Neurology*, 266(2), 533-544.
- Sun, J.-J., Huang, M., Xiao, F., & Xi, Z.-Q. (2015). Echinoderm microtubule-associated protein -like protein 5 in anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(10), 1008-1013.
- Supnet, C., & Bezprozvanny, I. (2011). Presenilins as endoplasmic reticulum calcium leak channels and Alzheimer's disease pathogenesis. *Science China. Life Sciences*, 54(8), 744-751.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., ... Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*, 422(6930), 438-441.
- Tamboli, I. Y., Prager, K., Thal, D. R., Thelen, K. M., Dewachter, I., Pietrzik, C. U., ... Walter, J. (2008). Loss of -Secretase Function Impairs Endocytosis of Lipoprotein Particles and Membrane Cholesterol Homeostasis. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 12097-12106.
- Tanaka, K., Suzuki, T., Hattori, N., & Mizuno, Y. (2004). Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1695(1-3), 235-247.
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M. R., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 33(4), 244-253.
- Thal, D. R. (2015). Clearance of amyloid  $\beta$ -protein and its role in the spreading of Alzheimer's disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7.
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.
- Tian, M., Lin, X., Wu, L., Lu, J., Zhang, Y., & Shi, J. (2019). Angiotensin II triggers autophagy and apoptosis in PC12 cell line: An in vitro Alzheimer's disease model. *Brain Research*, 1718, 46-52.
- Turan, K. (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Research*, 32(2), 643-652.
- Urbán, V. S., Kiss, J., Kovács, J., Gócza, E., Vas, V., Monostori, É., & Uher, F. (2008). Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes. *STEM CELLS*, 26(1), 244-253.
- Van Acker, Z. P., Declerck, K., Luyckx, E., Vanden Berghe, W., & Dewilde, S. (2019). Non-Methylation-Linked Mechanism of REST-Induced Neuroglobin Expression Impacts Mitochondrial Phenotypes in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroscience*.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029-1033.
- Vickers, J. C., King, A. E., Woodhouse, A., Kirkcaldie, M. T., Staal, J. A., McCormack, G. H., ... Dickson, T. C. (2009). Axonopathy and cytoskeletal disruption in degenerative diseases of the central nervous system. *Brain Research Bulletin*, 80(4-5), 217-223.

- Völgyi, K., Badics, K., Sialana, F. J., Gulyássy, P., Udvari, E. B., Kis, V., ... Juhász, G. (2018). Early Presymptomatic Changes in the Proteome of Mitochondria-Associated Membrane in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55(10), 7839-7857.
- von Bernhardt, R., & Eugenin, J. (2012). Alzheimer's disease: Redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(9), 974-1031.
- Wang, C., Iashchishyn, I. A., Pansieri, J., Nyström, S., Klementieva, O., Kara, J., ... Morozova-Roche, L. A. (2018). S100A9-Driven Amyloid-Neuroinflammatory Cascade in Traumatic Brain Injury as a Precursor State for Alzheimer's Disease. *Scientific Reports*, 8(1), 12836.
- Wang, R.-G., Kaul, M., & Zhang, D.-X. (2012). Interferon-stimulated gene 15 as a general marker for acute and chronic neuronal injuries. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 64(5), 577-583.
- Watanabe, N., Tomita, T., Sato, C., Kitamura, T., Morohashi, Y., & Iwatsubo, T. (2005). Pen-2 is incorporated into the gamma-secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 41967-41975.
- Watanabe, Y., Miyasaka, K. Y., Kubo, A., Kida, Y. S., Nakagawa, O., Hirate, Y., ... Ogura, T. (2017). Notch and Hippo signaling converge on Strawberry Notch 1 (Sbno1) to synergistically activate *Cdx2* during specification of the trophectoderm. *Scientific Reports*, 7, 46135.
- Wetzig, A., Mackay-Sim, A., & Murrell, W. (2011). Characterization of olfactory stem cells. *Cell Transplantation*, 20(11-12), 1673-1691.
- Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E., & Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *PROTEOMICS*, 7(3), 340-350.
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, 6(5), 359-362.
- Woodruff, G., Reyna, S. M., Dunlap, M., Van Der Kant, R., Callender, J. A., Young, J. E., ... Goldstein, L. S. B. (2016). Defective Transcytosis of APP and Lipoproteins in Human iPSC-Derived Neurons with Familial Alzheimer's Disease Mutations. *Cell Reports*, 17(3), 759-773.
- Xu, D., Zhang, F., Wang, Y., Sun, Y., & Xu, Z. (2014). Microcephaly-Associated Protein WDR62 Regulates Neurogenesis through JNK1 in the Developing Neocortex. *Cell Reports*, 6(1), 104-116.
- Yamada, T., Horisberger, M. A., Kawaguchi, N., Moroo, I., & Toyoda, T. (1994). Immunohistochemistry using antibodies to alpha-interferon and its induced protein, MxA, in Alzheimer's and Parkinson's disease brain tissues. *Neuroscience Letters*, 181(1-2), 61-64.
- Yescas, P., Huertas-Vazquez, A., Villarreal-Molina, M. T., Rasmussen, A., Tusié-Luna, M. T., López, M., ... 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(3), 195-200.

- 
- Yin, G. N., Lee, H. W., Cho, J.-Y., & Suk, K. (2009). Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. *Brain Research*, 1265, 158-170.
- Yu, J.-T., Liu, Y., Dong, P., Cheng, R.-E., Ke, S.-X., Chen, K.-Q., ... Zhang, Z. (2019). Up-regulation of antioxidative proteins TRX1, TXNL1 and TXNRD1 in the cortex of PTZ kindling seizure model mice. *PLOS ONE*, 14(1), e0210670.
- Zarco, N., Norton, E., Quiñones-Hinojosa, A., & Guerrero-Cázares, H. (2019). Overlapping migratory mechanisms between neural progenitor cells and brain tumor stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*.
- Zhang, L., & Elias, J. E. (2017). Relative Protein Quantification Using Tandem Mass Tag Mass Spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1550, 185-198.
- Zhang, Y., Luo, W., Wang, H., Lin, P., Vetrivel, K. S., Liao, F., ... Xu, H. (2005). Nicastrin Is Critical for Stability and Trafficking but Not Association of Other Presenilin/ $\gamma$ -Secretase Components. *The Journal of biological chemistry*, 280(17), 17020-17026.
- Zhao, Y., & Zhao, B. (2013). Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
- Zhou, X., & Ashford, J. W. (2019). Advances in screening instruments for Alzheimer's disease. *AGING MEDICINE*, 2(2), 88-93.
- Zou, Y., Lu, D., Liu, L., Zhang, H., & Zhou, Y. (2016). Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, 869-875.



## 12. ANEXOS

### ANEXO 1 LISTA DE PROTEÍNAS ALTERADAS EN EL PORTADOR SINTÓMÁTICO

(p)	FC	ID	Description
0.01	-1.6	EFTUD2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component
0.00	-3.0	YWHAB	14-3-3 protein beta/alpha
0.00	-1.5	YWHAE	14-3-3 protein epsilon
0.00	-1.9	PIKFYVE	1-phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase
0.00	2.1	PLCH1	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1
0.00	-13.5	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthase 3
0.01	2.6	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
0.08	-1.5	PSMD4	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 (Fragment)
0.05	4.3	PSMD5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5
0.01	3.4	PSMC1	26S proteasome regulatory subunit 4
0.00	2.7	RPS24	40S ribosomal protein S24
0.00	1.7	FAU	40S ribosomal protein S30
0.00	5.0	RPS7	40S ribosomal protein S7
0.00	1.5	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain
0.03	13.2	ALDH9A1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase
0.00	1.7	RPL6	60S ribosomal protein L6
0.00	-2.2	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase_ decarboxylating
0.09	2.0	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase_ mitochondrial
0.06	2.6	ACACA	Acetyl-CoA carboxylase 1
0.05	2.8	ARPC1A	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A
0.00	-13.9	DBI	Acyl-CoA-binding protein
0.00	-2.0	ADSS	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2
0.00	1.7	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2
0.20	1.7	NUDT5	ADP-sugar pyrophosphatase
0.00	-2.9	SCIN	Adseverin
0.00	-1.6	AKR7A2	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2 (Fragment)
0.00	-2.2	SPHKAP	A-kinase anchor protein SPHKAP
0.03	3.2	AARS	Alanine--tRNA ligase_ cytoplasmic

0.08	1.5	ADH1B	Alcohol dehydrogenase 1B
0.00	-6.3	AKR1B1	Aldose reductase
0.02	-2.6	A2ML1	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1
0.01	-1.9	ACTN2	Alpha-actinin-2
0.00	-1.8	ALDH7A1	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase
0.00	2.4	CRYAB	Alpha-crystallin B chain (Fragment)
0.00	5.4	NAGA	Alpha-N-acetylgalactosaminidase
0.20	1.5	ALPK1	Alpha-protein kinase 1
0.00	-1.8	ALMS1	Alstrom syndrome protein 1
0.00	-1.6	ADGB	Androglobin
0.22	3.0	ANKRD13A	Ankyrin repeat domain-containing protein 13A
0.00	-3.0	ANKRD26	Ankyrin repeat domain-containing protein 26
0.01	-1.6	ANKRD36	Ankyrin repeat domain-containing protein 36A
0.00	-1.7	ANXA11	Annexin A11
0.00	-1.6	ANXA5	Annexin A5
0.00	-1.5	AP2B1	AP-2 complex subunit beta
0.00	-2.5	AGAP3	Arf-GAP with GTPase_ ANK repeat and PH domain-containing protein 3 (Fragment)
0.06	-4.5	ARAP2	Arf-GAP with Rho-GAP domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 2
0.13	5.2	GOT1	Aspartate aminotransferase_ cytoplasmic
0.00	1.8	DARS	Aspartate--tRNA ligase_ cytoplasmic
0.08	7.7	ATP5H	ATP synthase subunit d_ mitochondrial
0.10	-1.8	ATAD2	ATPase family AAA domain-containing protein 2
0.02	33.8	ABCE1	ATP-binding cassette sub-family E member 1
0.03	1.5	RECQL5	ATP-dependent DNA helicase Q5
0.01	-7.8	DHX36	ATP-dependent RNA helicase DHX36
0.01	-1.8	ARID4B	AT-rich interactive domain-containing protein 4B
0.00	-2.6	ATRNL1	Attractin-like protein 1
0.00	-6.0	ATG16L1	Autophagy-related protein 16-1
0.00	-17.5	AXDND1	Axonemal dynein light chain domain-containing protein 1
0.01	-1.8	BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2
0.00	-2.4	BAHCC1	BAH and coiled-coil domain-containing protein 1

0.07	3.5	EPB41L2	Band 4.1-like protein 2
0.17	1.9	BOD1L1	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1
0.00	-1.8	MS4A1	B-lymphocyte antigen CD20
0.00	1.5	BASP1	Brain acid soluble protein 1
0.00	1.6	ABRAXAS2	BRISC complex subunit Abraxas 2
0.00	1.5	MTHFD1	C-1-tetrahydrofolate synthase _ cytoplasmic
0.00	-2.1	C2CD3	C2 domain-containing protein 3
0.00	4.0	CPAMD8	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8
0.00	-1.5	CAD	CAD protein
0.01	55.4	CDH11	Cadherin-11
0.03	1.6	CDH6	Cadherin-6
0.00	-1.6	CDH9	Cadherin-9
0.02	2.8	PDE1A	Calcium/calmodulin-dependent 3' 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A
0.00	2.3	CAMK2D	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta
0.00	-1.5	CANX	Calnexin
0.09	1.5	CNN1	Calponin-1
0.00	-2.7	CALR	Calreticulin
0.14	-1.6	PDE10A	cAMP and cAMP-inhibited cGMP 3' 5'-cyclic phosphodiesterase 10A
0.00	-16.9	PRKAR2A	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit
0.00	-2.6	CBR1	Carbonyl reductase [NADPH] 1
0.00	-1.8	CPD	Carboxypeptidase D
0.03	5.6	CMYA5	Cardiomyopathy-associated protein 5
0.04	-1.5	CRTAP	Cartilage-associated protein
0.06	-1.8	CASP8AP2	CASP8-associated protein 2
0.00	2.8	CARD11	Caspase recruitment domain-containing protein 11
0.04	-1.8	CASP3	Caspase-3
0.16	2.8	CAT	Catalase
0.00	-1.6	CTNNA2	Catenin alpha-2
0.01	-2.6	CTNND1	Catenin delta-1
0.00	-1.5	CTSD	Cathepsin D
0.13	2.7	IGF2R	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
0.00	-1.6	ALCAM	CD166 antigen
0.00	1.6	CD59	CD59 glycoprotein

0.00	-1.8	CD81	CD81 antigen
0.00	8.5	C11orf74	cDNA FLJ51661
0.00	10.7	RPL31	cDNA FLJ57527_ highly similar to 60S ribosomal protein L31
0.00	-2.5	CENPF	Centromere protein F
0.42	-1.6	CENPE	Centromere-associated protein E
0.00	-3.0	CEP152	Centrosomal protein of 152 kDa
0.00	-19.2	CEP192	Centrosomal protein of 192 kDa
0.01	-1.9	CEP250	Centrosome-associated protein CEP250
0.00	-1.5	CHMP5	Charged multivesicular body protein 5
0.01	2.0	SLC44A2	Choline transporter-like protein 2
0.00	-2.5	CHD7	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7
0.00	1.5	CHD9	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 9
0.00	1.8	CGNL1	Cingulin-like protein 1
0.02	2.4	CS	Citrate synthase
0.10	3.9	MAPK8IP3	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3
0.02	1.5	CLTCL1	Clathrin heavy chain 2
0.01	-1.7	CLUL1	Clusterin
0.00	-2.4	CCDC130	Coiled-coil domain-containing protein 130
0.01	3.3	CCDC150	Coiled-coil domain-containing protein 150
0.03	3.5	COL11A2	COL11A2
0.02	1.5	CSDE1	Cold shock domain-containing protein E1
0.00	-2.0	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain
0.02	4.1	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain
0.00	-2.7	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain
0.00	2.8	COL6A3	Collagen alpha-3(VI) chain
0.03	-2.3	COL6A5	Collagen alpha-5(VI) chain
0.01	-1.5	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein _ mitochondrial
0.01	-2.0	CTGF	Connective tissue growth factor
0.00	-13.2	FAM120A	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1
0.04	2.5	CNTNAP3B	Contactin-associated protein-like 3B
0.01	-3.3	CNTNAP4	Contactin-associated protein-like 4
0.00	2.3	CTPS1	CTP synthase 1
0.04	2.9	CSMD2	CUB and sushi domain-containing protein 2

0.05	-2.0	CUL4B	Cullin 4B_isoform CRA_e
0.05	2.0	CUL3	Cullin-3
0.19	2.9	CCNT1	Cyclin-T1
0.00	2.8	ATG4C	Cysteine protease ATG4C
0.00	2.6	CYCS	Cytochrome c (Fragment)
0.00	-435.4	MT-CO2	Cytochrome c oxidase subunit 2
0.10	5.6	CYP26A1	Cytochrome P450 26A1
0.01	60.6	DYNC1I2	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2 (Fragment)
0.01	2.8	DYNC1L1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1
0.00	1.9	DYNC2H1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1
0.00	-5.8	LAP3	Cytosol aminopeptidase
0.00	4.7	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
0.31	-1.6	DOCK1	Dedicator of cytokinesis protein 1
0.02	2.0	DOCK2	Dedicator of cytokinesis protein 2
0.02	-1.5	DOCK4	Dedicator of cytokinesis protein 4 (Fragment)
0.02	1.6	ALDH18A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
0.01	1.7	SAMHD1	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1
0.00	-5.8	DES	Desmin
0.01	-1.5	DSP	Desmoplakin
0.36	1.5	VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135
0.00	6.3	DGKG	Diacylglycerol kinase gamma (Fragment)
0.00	2.2	CRMP1	Dihydropyrimidinase-related protein 1
0.00	-1.9	DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2
0.00	-1.6	DIP2A	Disco-interacting protein 2 homolog A
0.00	-1.8	ADAM10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
0.09	8.2	DMXL1	DmX-like protein 1
0.02	3.6	DMXL2	DmX-like protein 2
0.00	-2.3	REV1	DNA repair protein REV1
0.03	-1.7	RFX7	DNA-binding protein RFX7
0.03	-2.6	POLR3A	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1
0.01	2.8	DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1
0.03	-1.7	DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11
0.04	13.7	DNAJB4	DnaJ homolog subfamily B member 4

0.04	1.8	DDOST	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit
0.00	-1.5	STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
0.00	-14.9	STT3B	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3B
0.00	1.5	ADAR	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase (Fragment)
0.00	10.4	DSCAML1	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein 1
0.05	2.1	MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
0.01	-1.9	MAP2K3	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3
0.02	1.6	DCTN1	Dynactin subunit 1
0.11	-4.5	OPA1	Dynamin-like 120 kDa protein_mitochondrial
0.00	-1.5	DNAH1	Dynein heavy chain 1_axonemal
0.00	-1.5	DNAH10	Dynein heavy chain 10_axonemal
0.00	-5.4	DNAH14	Dynein heavy chain 14_axonemal
0.00	-2.3	DNAH6	Dynein heavy chain 6_axonemal
0.02	2.7	DNAH7	Dynein heavy chain 7_axonemal
0.01	2.7	DNHD1	Dynein heavy chain domain-containing protein 1
0.00	-1.5	DYNLRB2	Dynein light chain roadblock-type 2
0.07	2.3	DYNLT1	Dynein light chain Tctex-type 1
0.00	-9.1	DYSF	Dysferlin
0.31	-2.8	DZIP3	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3
0.03	3.0	HECTD3	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD3
0.12	1.8	TRIM13	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM13
0.26	-1.7	TRIP12	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
0.03	-1.8	UBR2	E3 ubiquitin-protein ligase UBR2
0.04	1.7	UBR5	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5
0.00	70.9	EML5	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5
0.01	2.7	EML6	Echinoderm microtubule-associated protein-like 6
0.01	-11.1	EFHB	EF-hand domain-containing family member B
0.20	-3.2	GCN1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1
0.14	1.8	ELAVL1	ELAV-like protein 1
0.09	7.1	ETFB	Electron transfer flavoprotein subunit beta
0.00	-1.5	EEF1B2	Elongation factor 1-beta
0.07	6.4	ELOVL1	Elongation of very long chain fatty acids protein 1
0.00	-3.2	ENG	Endoglin

0.08	-3.0	NEIL3	Endonuclease 8-like 3
0.00	-1.6	SH3GL1	Endophilin-A2
0.00	-1.7	HSPA5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
0.00	-2.6	ERP29	Endoplasmic reticulum resident protein 29
0.26	1.6	ERGIC1	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 1
0.00	-1.7	HSP90B1	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
0.03	-1.5	ERH	Enhancer of rudimentary homolog
0.03	4.2	EVPL	Envoplakin
0.06	4.1	EPX	Eosinophil peroxidase
0.00	-3.6	NGEF	Ephexin-1
0.00	19.2	EPHA3	Ephrin type-A receptor 3
0.00	-1.5	EPS15L1	Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1
0.00	-5.5	ERBIN	Erbin
0.00	2.8	ERO1A	ERO1-like protein alpha
0.01	46.6	ETF1	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1
0.00	1.9	EIF3C	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C
0.00	-2.2	EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
0.04	3.1	FANCM	Fanconi anemia group M protein
0.00	10.5	FASTKD3	FAST kinase domain-containing protein 3 mitochondrial
0.03	-2.4	FHOD3	FH1/FH2 domain-containing protein 3
0.00	-3.4	FBN1	Fibrillin-1
0.00	6.0	PKHD1L1	Fibrocystin-L
0.00	-3.3	FN1	Fibronectin
0.00	-5.3	FSTL1	Follistatin-related protein 1
0.00	-2.1	FMNL2	Formin-like protein 2
0.00	1.5	FHL2	Four and a half LIM domains protein 2
0.00	-5.5	FREM2	FRAS1-related extracellular matrix protein 2
0.00	-1.7	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C
0.37	1.6	TUBGCP2	Gamma-tubulin complex component 2
0.00	-1.6	GSN	Gelsolin
0.00	1.9	GTF3C1	General transcription factor 3C polypeptide 1
0.00	-1.9	PRKCSH	Glucosidase 2 subunit beta
0.00	-1.6	GFPT1	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1

0.02	1.5	QARS	Glutamine--tRNA ligase
0.00	-1.6	GSTO1	Glutathione S-transferase omega-1
0.06	1.7	PYGB	Glycogen phosphorylase_brain form
0.01	-1.5	GORASP2	Golgi reassembly-stacking protein 2
0.06	1.5	GOLGA4	Golgin subfamily A member 4
0.01	2.0	GOLGB1	Golgin subfamily B member 1
0.00	-3.3	GRAMD2B	GRAM domain-containing protein 2B
0.06	-5.2	GRN	Granulins
0.00	-242.9	GCC2	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2
0.04	13.4	AK3	GTP:AMP phosphotransferase AK3_mitochondrial
0.00	2.7	SAR1A	GTP-binding protein SAR1a
0.00	1.8	GNAI1	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1
0.00	-1.9	GNAI2	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
0.00	-1.8	GNB2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
0.00	-24.9	GNAO1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha
0.00	-1.8	HSPA1A	Heat shock 70 kDa protein 1A
0.00	-2.2	HSPB7	Heat shock protein beta-7
0.00	-1.8	HSP90AB1	Heat shock protein HSP 90-beta
0.02	34.9	GUCY2C	Heat-stable enterotoxin receptor
0.20	2.3	HELZ2	Helicase with zinc finger domain 2
0.00	-27.6	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)
0.00	-189.5	HBB	Hemoglobin subunit beta
0.01	2.0	HEPH	Hephaestin_isoform CRA_c
0.00	-1.7	HNRNPCL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1
0.00	-1.5	HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
0.00	-1.5	HNRNPR	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R
0.00	-1.6	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
0.12	5.2	KAT6A	Histone acetyltransferase KAT6A
0.15	2.6	HIST1H1D	Histone H1.3
0.00	-1.9	ASH1L	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
0.11	1.7	SETD2	Histone-lysine N-methyltransferase SETD2
0.03	4.7	NSD1	Histone-lysine N-methyltransferase_H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific
0.00	-3.5	HLA-E	HLA class I histocompatibility antigen_alpha chain E

0.00	-18.8	HLA-B	HLA class I histocompatibility antigen_B-18 alpha chain
0.10	-3.3	BBX	HMG box transcription factor BBX
0.01	-2.3	NKX3-2	Homeobox protein Nkx-3.2
0.00	23.2	HTT	Huntingtin
0.00	-9.1	HIP1	Huntingtin-interacting protein 1
0.01	-4.2	HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
0.00	-1.7	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1
0.02	1.7	IPO5	Importin-5
0.02	-2.3	NAALADL2	Inactive N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like protein 2
0.00	-46.5	TEX14	Inactive serine/threonine-protein kinase TEX14
0.00	-3.4	PEAK1	Inactive tyrosine-protein kinase PEAK1
0.00	-2.6	ITPR1	Inositol 1_4_5-trisphosphate receptor type 1
0.00	1.9	IRS4	Insulin receptor substrate 4
0.02	-1.8	ITGA11	Integrin alpha-11
0.00	-26.9	ITGA2	Integrin alpha-2
0.00	-2.9	ITGA2	Integrin alpha-2
0.00	-1.5	ITGA5	Integrin alpha-5
0.22	-3.1	ITGAD	Integrin alpha-D
0.00	-1.9	ITIH5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5
0.00	-10.3	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
0.00	-37.1	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1
0.00	1878.3	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
0.00	-11.2	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
0.03	-2.1	EIF2AK2	Interferon-induced_double-stranded RNA-activated protein kinase
0.03	4.5	EXPH5	Isoform 2 of Exophilin-5
0.03	19.8	TPM3	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain
0.00	-2.6	TPM2	Isoform 2 of Tropomyosin beta chain
0.00	1173.9	RPL28	Isoform 3 of 60S ribosomal protein L28
0.00	-2.6	DLEC1	Isoform 3 of Deleted in lung and esophageal cancer protein 1
0.00	-2.0	PAK3	Isoform 3 of Serine/threonine-protein kinase PAK 3
0.74	-2.4	PDLIM2	Isoform 5 of PDZ and LIM domain protein 2
0.01	-1.5	CLTA	Isoform Non-brain of Clathrin light chain A
0.01	28.8	JPT1	Jupiter microtubule-associated homolog 1

0.00	2.8	KALRN	Kalirin
0.00	-1.9	KANSL1L	KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like protein
0.11	1.8	KLHL10	Kelch-like protein 10
0.00	-1.5	KRT10	Keratin_type I cytoskeletal 10
0.01	3.7	KRT72	Keratin_type II cytoskeletal 72
0.00	-1.5	KRT78	Keratin_type II cytoskeletal 78
0.00	9.9	TOGARAM1	KIAA0423_isoform CRA_a
0.10	5.1	KNDC1	Kinase non-catalytic C-lobe domain-containing protein 1
0.01	1.5	KIF5B	Kinesin-1 heavy chain
0.00	-1.8	KIF15	Kinesin-like protein KIF15
0.17	2.1	KIF1A	Kinesin-like protein KIF1A
0.04	1.7	KIF20B	Kinesin-like protein KIF20B
0.36	-3.3	KIF21B	Kinesin-like protein KIF21B
0.05	2.8	KIF9	Kinesin-like protein KIF9
0.00	-1.7	KNL1	Kinetochores scaffold 1
0.05	8.9	KNTC1	Kinetochores-associated protein 1
0.00	3.0	GLO1	Lactoylglutathione lyase
0.02	-2.6	LAMB2	Laminin subunit beta-2
0.16	-1.6	LAMB3	Laminin subunit beta-3
0.12	5.7	LRRN3	Leucine-rich repeat neuronal protein 3
0.03	-2.8	LRRC7	Leucine-rich repeat-containing protein 7
0.00	1.6	LARS	Leucine--tRNA ligase_cytoplasmic
0.05	-5.7	LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor
0.00	-1.5	LENG9	Leukocyte receptor cluster member 9
0.03	2.2	LCORL	Ligand-dependent nuclear receptor corepressor-like protein
0.02	2.7	LRBA	Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein
0.00	4.0	PPFIBP1	Liprin-beta-1 (Fragment)
0.00	-2.7	LRP1B	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B
0.04	18.0	LTO1	LTO1_ABCE1 maturation factor
0.01	1.7	SSB	Lupus La protein
0.01	-1.5	KDM2A	Lysine-specific demethylase 2A
0.02	-10.9	KDM6B	Lysine-specific demethylase 6B
0.00	1.6	KARS	Lysine--tRNA ligase

0.00	1.5	MBOAT7	Lysophospholipid acyltransferase 7
0.21	1.5	LYST	Lysosomal-trafficking regulator
0.01	-2.2	SCARB2	Lysosome membrane protein 2 (Fragment)
0.03	1.7	LOXL2	Lysyl oxidase homolog 2
0.00	-25.5	CAPG	Macrophage-capping protein
0.00	-3.1	MATR3	Matrin-3
0.25	2.9	MGA	MAX gene-associated protein
0.00	-1.5	MCM10	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 ( <i>S. cerevisiae</i> )_ isoform CRA_b
0.05	13.7	MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus protein
0.13	2.3	MMEL1	Membrane metallo-endopeptidase-like 1
0.00	-2.1	PGRMC1	Membrane-associated progesterone receptor component 1
0.09	-1.8	GRM4	Metabotropic glutamate receptor 4
0.00	-3.9	MTCL1	Microtubule cross-linking factor 1
0.01	5.1	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1_ isoforms 1/2/3/5 (Fragment)
0.00	-2.2	MAP4	Microtubule-associated protein 4
0.02	19.8	MAPRE1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1
0.05	14.4	MAPRE2	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2 (Fragment)
0.05	8.8	PMS2	Mismatch repair endonuclease PMS2
0.05	2.6	TOMM22	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog
0.00	1.6	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1
0.20	2.9	MGLL	Monoglyceride lipase
0.03	-4.6	MPHOSPH9	M-phase phosphoprotein 9
0.00	2.1	MROH7-TTC4	MROH7-TTC4 readthrough (NMD candidate)
0.00	-1.8	PAICS	Multifunctional protein ADE2 (Fragment)
0.00	-1.9	ABHD10	Mycophenolic acid acyl-glucuronide esterase_ mitochondrial
0.01	1.5	MYT1	Myelin transcription factor 1
0.00	2.9	MYOM1	Myomesin-1
0.55	-4.7	MYOM2	Myomesin-2
0.07	4.6	MYOM3	Myomesin-3
0.07	3.0	MYPN	Myopalladin
0.11	1.8	MPRIP	Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Fragment)
0.00	-18.4	MYH1	Myosin-1
0.31	1.6	MYH8	Myosin-8

0.21	-1.7	NAT14	N-acetyltransferase 14 (Fragment)
0.15	1.5	NLRP1	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 1
0.02	-1.7	NLRP14	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 14
0.01	42.9	NLRP2	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 2
0.00	-1.8	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
0.38	-1.6	NAXE	NAD(P)H-hydrate epimerase
0.14	1.5	SIRT6	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-6
0.18	2.3	NAA16	N-alpha-acetyltransferase 16_ NatA auxiliary subunit
0.16	1.8	NRDC	Nardilysin (N-arginine dibasic convertase)_ isoform CRA_d
0.01	2.5	NCKAP1	Nck-associated protein 1
0.00	2.2	NEB	Nebulin (Fragment)
0.00	-1.5	NES	Nestin
0.00	-14.2	NBPF3	Neuroblastoma breakpoint family member 3
0.00	-3.5	NAV1	Neuron navigator 1
0.01	-3.7	SLC1A5	Neutral amino acid transporter B(0)
0.00	-1.7	FAM129B	Niban-like protein 1
0.05	2.8	NBN	Nibrin
0.03	1.6	NCLN	Nicalin
0.04	-1.5	NIN	Ninein
0.00	-1.8	NOS2	Nitric oxide synthase_ inducible
0.00	-2.1	NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4
0.00	-1.5	NPC2	NPC intracellular cholesterol transporter 2
0.25	2.2	SGSH	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase (Fragment)
0.01	3.3	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1
0.01	1.9	NUP214	Nuclear pore complex protein Nup214
0.01	86.0	NUP93	Nuclear pore complex protein Nup93
0.10	1.6	NCOA7	Nuclear receptor coactivator 7
0.08	-3.7	NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1
0.01	2.9	NCOR2	Nuclear receptor corepressor 2
0.19	4.2	NUTF2	Nuclear transport factor 2
0.00	-1.6	YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1
0.11	-2.8	NUCB1	Nucleobindin-1
0.00	-2.8	NOP56	Nucleolar protein 56

0.02	5.3	NOL8	Nucleolar protein 8 (Fragment)
0.00	1.7	NME1	Nucleoside diphosphate kinase A
0.00	-1.8	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4
0.08	4.1	BPTF	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF
0.00	1.7	OLA1	Obg-like ATPase 1
0.00	1.6	OAT	Ornithine aminotransferase _ mitochondrial
0.05	-1.7	OTOA	Otoancorin
0.00	-2.1	OTUD7A	OTU domain-containing protein 7A
0.17	4.0	OTUD7B	OTU domain-containing protein 7B
0.19	3.6	OVCH2	Ovochymase-2
0.00	-2.1	OXR1	Oxidation resistance protein 1
0.00	1.9	OXTR	Oxytocin receptor
0.06	5.6	PAX3	Paired box protein Pax-3
0.00	2.2	PALLD	Palladin
0.00	-2.0	PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1
0.00	-1.8	FKBP10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10
0.24	1.6	PPWD1	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein 1
0.19	1.8	PER1	Period circadian protein homolog 1
0.01	4.2	PXDNL	Peroxidasin-like protein
0.00	-1.8	PRDX6	Peroxiredoxin-6
0.08	4.9	HSD17B4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
0.01	-2.8	PSD3	PH and SEC7 domain-containing protein 3
0.00	-2.3	PHLPP1	PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1
0.00	-1.8	SACM1L	Phosphatidylinositol phosphatase SAC1
0.01	-2.5	PI4KA	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
0.00	-2.5	PIK3C2A	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha
0.00	5.2	PIK3C2B	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit beta
0.14	1.7	PDE4D	Phosphodiesterase
0.06	12.1	PDE1C	Phosphodiesterase
0.00	-3.5	PGM2	Phosphoglucomutase-2
0.00	-1.9	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
0.00	-1.7	PGAM1	Phosphoglycerate mutase 1
0.00	-10.5	PIK3R6	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6

0.03	8.9	PLCG2	Phosphoinositide phospholipase C
0.09	1.5	PSAT1	Phosphoserine aminotransferase
0.00	32.8	ATP2B3	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3
0.01	-1.5	SERBP1	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein
0.00	-58.9	SERPINB2	Plasminogen activator inhibitor 2
0.00	-1.5	PLS1	Plastin-1
0.00	1.6	PLEC	Plectin
0.31	-2.2	PARP14	Poly [ADP-ribose] polymerase 14
0.00	-1.9	PABPC3	Polyadenylate-binding protein 3
0.05	1.8	PABPC4	Polyadenylate-binding protein 4
0.01	-1.5	PCGF5	Polycomb group RING finger protein 5
0.22	1.7	POTE1	POTE ankyrin domain family member 1
0.00	-1.5	LMNA	Prelamin-A/C
0.02	-2.6	DDX53	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX53
0.03	-4.1	DDX58	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX58
0.10	1.5	DDX6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6
0.00	-2.3	DDX60	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60
0.01	-1.6	HERC1	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1
0.00	-2.3	SETX	Probable helicase senataxin
0.00	-1.8	PGAM4	Probable phosphoglycerate mutase 4
0.13	2.7	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4
0.00	-2.0	P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1
0.00	-1.6	P4HA2	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2
0.12	1.9	FAP	Prolyl endopeptidase FAP
0.00	-1.6	PCSK5	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
0.00	-1.7	PSME1	Proteasome activator complex subunit 1
0.00	-2.7	PSME2	Proteasome activator complex subunit 2
0.00	-1.5	PSMA6	Proteasome subunit alpha type
0.00	-1.7	PSMA4	Proteasome subunit beta type (Fragment)
0.21	2.6	PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1
0.00	-1.6	CIC	Protein capicua homolog
0.00	-1.7	COBL	Protein cordon-bleu
0.00	1.6	CUTA	Protein CutA

0.00	-1.6	P4HB	Protein disulfide-isomerase
0.00	-1.7	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3
0.00	-2.0	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment)
0.00	-1.5	PDIA4	Protein disulfide-isomerase A4
0.00	-1.9	PDIA6	Protein disulfide-isomerase A6
0.00	3.5	ENAH	Protein enabled homolog
0.02	27.7	EYS	Protein eyes shut homolog
0.21	-1.5	FAM214A	Protein FAM214A (Fragment)
0.21	1.5	FAM83C	Protein FAM83C
0.00	-1.9	FAM83G	Protein FAM83G
0.06	4.3	WWC1	Protein KIBRA
0.02	3.3	PRKCE	Protein kinase C epsilon type
0.00	-10.0	MGARP	Protein MGARP
0.03	2.0	NIPSNAP3A	Protein NipSnap homolog 3A
0.28	1.6	PPP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 (Fragment)
0.02	-1.5	PCLO	Protein piccolo
0.00	-1.7	PML	Protein PML
0.00	3.1	S100A10	Protein S100-A10
0.00	9.3	S100A16	Protein S100-A16
0.00	-7.0	S100A4	Protein S100-A4
0.00	-1.8	SDK1	Protein sidekick-1
0.01	55.9	SAMD4A	Protein Smaug homolog 1
0.03	2.2	SMG9	Protein SMG9 (Fragment)
0.00	2.0	SOGA3	Protein SOGA3
0.07	5.4	SBNO1	Protein strawberry notch homolog 1
0.05	1.8	SEC31A	Protein transport protein Sec31A
0.40	-1.7	UNC13B	Protein unc-13 homolog B
0.08	3.1	WWC2	Protein WWC2
0.01	-29.7	ZGRF1	Protein ZGRF1
0.00	-2.1	TGM2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
0.01	-30.9	FAT2	Protocadherin Fat 2
0.00	-2.5	FAT4	Protocadherin Fat 4
0.12	6.3	PCDHGA9	Protocadherin gamma-A9

0.02	-5.6	PCDH15	Protocadherin-15
0.01	23.6	ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
0.00	2.0	RPL13AP3	Putative 60S ribosomal protein L13a protein RPL13AP3
0.01	1.8	DDX11L8	Putative ATP-dependent RNA helicase DDX11-like protein 8
0.00	-140.2	CROCC2	Putative ciliary rootlet coiled-coil protein 2
0.00	2.4	HIST2H2BD	Putative histone H2B type 2-D
0.21	1.5	ST13P4	Putative protein FAM10A4
0.01	3.0	TUBA4B	Putative tubulin-like protein alpha-4B
0.00	-1.6	PKM	Pyruvate kinase PKM
0.00	-21.8	RAD51AP2	RAD51-associated protein 2
0.00	2.8	RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2
0.02	-9.5	RANBP17	Ran-binding protein 17
0.02	1.7	RANBP6	Ran-binding protein 6
0.00	-1.5	RANBP1	Ran-specific GTPase-activating protein (Fragment)
0.00	1.9	RAP1GDS1	Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1
0.00	-14.3	RASA2	Ras GTPase-activating protein 2
0.00	-10.1	IQGAP3	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3
0.00	1.6	RAB14	Ras-related protein Rab-14
0.12	-2.7	RAB18	Ras-related protein Rab-18
0.00	4.0	RAB21	Ras-related protein Rab-21
0.00	2.2	RAB3B	Ras-related protein Rab-3B
0.00	-1.6	RRAS	Ras-related protein R-Ras
0.77	-6.4	REST	RE1-silencing transcription factor isoform CRA a
0.00	3.4	REEP5	Receptor expression-enhancing protein 5
0.05	-9.6	EGFR	Receptor protein-tyrosine kinase
0.07	1.9	PTPRF	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F
0.10	1.8	RGSL1	Regulator of G-protein signaling protein-like
0.01	-129.8	RTEL1	Regulator of telomere elongation helicase 1
0.00	1.5	RCN1	Reticulocalbin-1
0.00	-2.0	RCN3	Reticulocalbin-3
0.02	2.8	ARHGAP21	Rho GTPase-activating protein 21
0.18	4.2	ARHGAP29	Rho GTPase-activating protein 29
0.00	-1.7	ARHGAP33	Rho GTPase-activating protein 33



0.01	-1.8	ARHGEF16	Rho guanine nucleotide exchange factor 16
0.00	1.8	ARHGEF3	Rho guanine nucleotide exchange factor 3
0.01	1.7	ARHGEF40	Rho guanine nucleotide exchange factor 40
0.03	1.7	ROCK1	Rho-associated protein kinase 1
0.22	-2.3	RHOB	Rho-related GTP-binding protein RhoB
0.00	-2.8	RRM1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
0.00	2.6	PRPS1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1
0.00	5.9	PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
0.01	-4.4	RBMX	RNA-binding motif protein_ X chromosome (Fragment)
0.00	-3.0	EWSR1	RNA-binding protein EWS
0.00	-1.6	FUS	RNA-binding protein FUS
0.00	-2.3	RC3H1	Roquin-1
0.01	2.0	RUVBL2	RuvB-like helicase
0.00	1.9	RYR1	Ryanodine receptor 1
0.03	-1.5	MAT2A	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2
0.00	-1.5	ATP2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
0.02	-1.7	SLFN5	Schlafen family member 5
0.00	3.1	CHGB	Secretogranin-1
0.00	4.1	SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2
0.05	-2.3	SRSF10	Serine/arginine-rich splicing factor 10
0.00	-2.2	SRSF1	Serine/arginine-rich-splicing factor 1
0.20	1.5	SRSF3	Serine/arginine-rich-splicing factor 3
0.06	4.4	BRAF	Serine/threonine-protein kinase B-raf (Fragment)
0.18	-1.5	CDC42BPB	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta
0.25	-2.3	NEK7	Serine/threonine-protein kinase Nek7
0.02	1.8	PAK2	Serine/threonine-protein kinase PAK 2
0.00	25.9	PRPF4B	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
0.04	-2.0	SMG1	Serine/threonine-protein kinase SMG1
0.14	1.6	VRK2	Serine/threonine-protein kinase VRK2
0.00	-187.6	PPP2R3C	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B" subunit gamma
0.01	-3.8	ATM	Serine-protein kinase ATM
0.00	-1.5	SERPINH1	Serpin H1
0.00	-3.9	ALB	Serum albumin

0.00	-4.2	SH3PXD2A	SH3 and PX domain-containing protein 2A
0.07	-2.4	SH3BGR1	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein
0.01	-1.9	NANS	Sialic acid synthase
0.00	-1.6	KIAA1217	Sickle tail protein homolog
0.01	1.5	SFXN1	Sideroflexin-1
0.01	5.2	SRPRB	Signal recognition particle receptor subunit beta
0.08	7.7	SRP72	Signal recognition particle subunit SRP72
0.00	-3.2	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
0.01	1.5	STAM	Signal transducing adapter molecule 1
0.00	4.2	STAM2	Signal transducing adapter molecule 2
0.38	-8.1	PDS5B	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B
0.00	2.9	SLITRK4	SLIT and NTRK-like protein 4
0.00	-2.5	SGTA	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha
0.00	-1.8	ATP1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
0.99	-4.1	SORT1	Sortilin
0.00	-2.4	SNX6	Sorting nexin-6
0.00	-1.7	SPTB	Spectrin beta chain_ erythrocytic
0.09	5.0	SPTBN5	Spectrin beta chain_ non-erythrocytic 5
0.00	1.9	SPATA5L1	Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1
0.03	-2.0	SFPQ	Splicing factor_ proline- and glutamine-rich
0.00	-1.6	CTTN	Src substrate cortactin
0.01	-89.3	STARD9	StAR-related lipid transfer protein 9
0.01	1.5	STMN2	Stathmin-2
0.00	-1.5	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1
0.01	-7.5	STRIP1	Striatin-interacting protein 1
0.16	-1.9	SMC1A	Structural maintenance of chromosomes protein 1A
0.57	-1.7	SMC6	Structural maintenance of chromosomes protein 6 (Fragment)
0.00	3.4	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_ mitochondrial
0.00	-4.3	SUN1	SUN domain-containing protein 1
0.00	-1.5	SOD1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
0.00	-27.2	SOD2	Superoxide dismutase [Mn]_ mitochondrial
0.00	9.4	SVEP1	Sushi_ von Willebrand factor type A_ EGF and pentraxin domain-containing protein 1
0.01	1.6	SYCP1	Synaptonemal complex protein 1

0.61	-1.8	SYBU	Syntabulin
0.00	-1.5	TAF15	TATA-binding protein-associated factor 2N
0.00	4405.6	TBC1D9B	TBC1 domain family member 9B
0.30	-1.5	TAGAP	T-cell activation Rho GTPase-activating protein
0.03	-2.1	WRAP53	Telomerase Cajal body protein 1
0.00	-1.5	RIF1	Telomere-associated protein RIF1
0.05	-1.7	TNXB	Tenascin-X
0.14	-1.7	TNS1	Tensin-1
0.12	2.4	TES	Testin
0.01	3.7	TTC12	Tetratricopeptide repeat protein 12
0.10	-2.1	TTC28	Tetratricopeptide repeat protein 28
0.00	-2.0	TXN	Thioredoxin
0.00	-67.7	TXNL1	Thioredoxin-like protein 1 (Fragment)
0.00	-2.0	THBS1	Thrombospondin-1
0.37	-3.4	THBS2	Thrombospondin-2
0.01	79.4	TRIP11	Thyroid receptor-interacting protein 11 (Fragment)
0.14	-4.2	SUPT20H	Transcription factor SPT20 homolog
0.00	-2.2	TAF1	Transcription initiation factor TFIID subunit 1
0.04	-2.6	ATRX	Transcriptional regulator ATRX
0.01	-3.4	TBL3	Transducin beta-like protein 3
0.08	8.0	TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
0.00	-3.0	TACC2	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2
0.01	-3.8	TRPM3	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3
0.00	-1.6	TKT	Transketolase
0.00	-1.5	SSR4	Translocon-associated protein subunit delta
0.00	-1.5	TM9SF3	Transmembrane 9 superfamily member 3
0.05	5.5	TMTC4	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 4
0.00	-20.5	TMIGD3	Transmembrane domain-containing protein TMIGD3
0.18	2.9	TMEM43	Transmembrane protein 43
0.02	2.1	KIAA1109	Transmembrane protein KIAA1109
0.27	-1.6	TICRR	Treslin
0.00	19.5	TNRC18	Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein
0.00	-1.6	TPI1	Triosephosphate isomerase

0.08	2.1	TRIM16	Tripartite motif-containing protein 16
0.00	-1.8	TRIM2	Tripartite motif-containing protein 2
0.00	1.8	TRIM66	Tripartite motif-containing protein 66
0.00	-1.6	TPM3	Tropomyosin alpha-3 chain
0.00	-1.9	WARS	Tryptophan--tRNA ligase_cytoplasmic
0.00	5.0	TSC2	Tuberin
0.00	3.1	TUBAL3	Tubulin alpha chain-like 3
0.00	1.7	TUBB3	Tubulin beta-3 chain
0.12	-1.5	TBCB	Tubulin-folding cofactor B
0.03	3.7	TWF1	Twinfilin-1 (Fragment)
0.26	2.3	JAK3	Tyrosine-protein kinase JAK3
0.28	1.6	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
0.12	2.2	USP24	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24
0.00	-2.4	USP31	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31
0.06	1.6	CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD
0.00	-45.8	ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15
0.21	-1.5	UBE3C	Ubiquitin-protein ligase E3C
0.00	3.0	UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase
0.29	1.7	ADCK2	Uncharacterized aarF domain-containing protein kinase 2
0.00	-1.8		Uncharacterized protein
0.13	1.7		Uncharacterized protein
0.00	9.0	C12orf71	Uncharacterized protein C12orf71
0.00	1.8	KIAA1211L	Uncharacterized protein KIAA1211-like
0.00	-52.0	KIAA1551	Uncharacterized protein KIAA1551
0.01	3.6	KIAA2012	Uncharacterized protein KIAA2012
0.00	2.3	MYO1B	Unconventional myosin-Ib
0.00	-2.4	MYO1E	Unconventional myosin-Ie
0.02	-2.0	MYO5A	Unconventional myosin-Va
0.27	2.4	MYO7A	Unconventional myosin-VIIa
0.00	3.0	MYO15B	Unconventional myosin-XVB
0.00	4.1	MYO18A	Unconventional myosin-XVIIIa
0.00	-1.7	UGP2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
0.08	-4.8	VPS13A	Vacuolar protein sorting-associated protein 13A

0.04	-1.8	VPS13D	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D
0.00	-9.7	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2
0.71	-14.5	HSD17B12	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase
0.02	-1.5	LMAN2	Vesicular integral-membrane protein VIP36
0.00	-1.5	VIM	Vimentin
0.00	-2.0	CBARP	Voltage-dependent calcium channel beta subunit-associated regulatory protein
0.49	-1.7	VWF	von Willebrand factor
0.04	3.1	WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1
0.02	1.6	WDR19	WD repeat-containing protein 19
0.00	-4.5	WDR38	WD repeat-containing protein 38
0.05	1.8	WDR70	WD repeat-containing protein 70
0.03	2.9	WASF1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1
0.01	1.9	ZC2HC1C	Zinc finger C2HC domain-containing protein 1C
0.21	3.1	ZMIZ1	Zinc finger MIZ domain-containing protein 1
0.20	3.2	ZMYM4	Zinc finger MYM-type protein 4
0.02	-7.7	ZNF217	Zinc finger protein 217
0.00	-3.3	ZNF225	Zinc finger protein 225
0.00	63.0	ZNF227	Zinc finger protein 227
0.09	1.9	ZNF407	Zinc finger protein 407
0.01	2.3	ZNF445	Zinc finger protein 445
0.00	1.9	ZNF841	Zinc finger protein 841 (Fragment)

0.06	7.0	GLI1	Zinc finger protein GLI1
0.00	-1.9	ZHX1	Zinc fingers and homeoboxes protein 1

<b>ANEXO 2 PROTEÍNAS ALTERADAS EN EL PORTADOR PRESINTOMÁTICO</b>			
<b>(p)</b>	<b>mfc</b>	<b>Description</b>	<b>Description</b>
0.02	2.2	ADPRHL1	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1
0.01	-1.8	GBE1	1_4-alpha-glucan-branching enzyme
0.01	65.4	HSPE1	10 kDa heat shock protein_mitochondrial
0.15	-1.5	PLCE1	1-phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1
0.02	-3.9	PSMC5	26S proteasome regulatory subunit 8
0.24	1.6	HSD17B10	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2
0.00	2.2	RPS12	40S ribosomal protein S12
0.00	-1.6	FAU	40S ribosomal protein S30
0.11	3.8	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain
0.03	2.8	ALDH9A1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase
0.03	-3.7	TROVE2	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein
0.05	19.8	RPLP1	60S acidic ribosomal protein P1
0.00	-2.0	PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase_decarboxylating
0.02	-24.3	PGLS	6-phosphogluconolactonase
0.23	1.6	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase_mitochondrial
0.31	-1.6	APRT	Adenine phosphoribosyltransferase
0.07	-6.8	APC	Adenomatous polyposis coli protein
0.00	-14.9	SCIN	Adseverin
0.00	-1.9	A2M	Alpha-2-macroglobulin
0.05	-2.0	ACTR1A	Alpha-centractin
0.04	1.6	AIMP1	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1 (Fragment)
0.04	-1.7	ANAPC7	Anaphase-promoting complex subunit 7
0.08	1.8	ANKAR	Ankyrin and armadillo repeat-containing protein
0.12	5.7	ANKZF1	Ankyrin repeat and zinc finger domain-containing protein 1
0.04	-1.7	ANKRD30B	Ankyrin repeat domain-containing protein 30B
0.01	-2.1	AP2B1	AP-2 complex subunit beta
0.22	1.6	APOL2	Apolipoprotein L2
0.09	4.9	ASNS	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]
0.03	-1.6	ATP5PO	ATP synthase subunit O_mitochondrial

0.01	-1.5	ABCA13	ATP-binding cassette sub-family A member 13
0.01	1.5	ABCA2	ATP-binding cassette sub-family A member 2
0.44	1.9	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1
0.27	1.9	ATG2B	Autophagy-related protein 2 homolog B
0.00	-1.7	BSG	Basigin
0.00	-7.6	NTRK2	BDNF/NT-3 growth factors receptor
0.02	-33.5	BEND3	BEN domain-containing protein 3
0.10	9.5	B2M	Beta-2-microglobulin
0.59	-1.7	PAPSS2	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
0.01	-2.4	BOD1L1	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1
0.04	-2.7	BCAT1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase_cytosolic
0.00	2.5	KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12
0.02	-3.3	CAPN1	Calpain-1 catalytic subunit
0.00	1.7	CAST	Calpastatin
0.23	-1.6	PRKAR2A	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit
0.15	-1.7	CLIP1	CAP-Gly domain-containing linker protein 1
0.00	4.0	CPT1A	Carnitine O-palmitoyltransferase 1_liver isoform
0.37	-1.5	CRTAP	Cartilage-associated protein
0.00	-1.8	COMT	Catechol O-methyltransferase
0.00	-2.8	CTNND1	Catenin delta-1
0.00	1.9	CTSB	Cathepsin B
0.01	1.9	CTSZ	Cathepsin Z
0.00	1.7	IGF2R	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
0.01	-1.6	CAV1	Caveolin-1
0.00	-1.5	CD63	CD63 antigen
0.62	23.8	CCAR2	Cell cycle and apoptosis regulator protein 2
0.01	1.6	CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
0.00	-44.2	CHD1L	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like
0.06	1.7	CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4
0.56	-1.9	CFAP54	Cilia- and flagella-associated protein 54
0.01	26.7	CFAP57	Cilia- and flagella-associated protein 57

0.08	-7.5	CPSF6	Cleavage and polyadenylation-specificity factor subunit 6
0.00	1.9	COPG1	Coatomer subunit gamma-1
0.01	1.5	CFL1	Cofilin-1
0.00	2.7	CFL2	Cofilin-2
0.26	-2.9	CCDC141	Coiled-coil domain-containing protein 141
0.02	28.0	CCDC171	Coiled-coil domain-containing protein 171
0.01	-1.8	CCDC27	Coiled-coil domain-containing protein 27
0.00	-1.7	CSDE1	Cold shock domain-containing protein E1
0.00	2.0	COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain
0.00	2.5	COL1A2	Collagen alpha-2(I) chain
0.16	-2.3	COL6A5	Collagen alpha-5(VI) chain
0.00	-16.0	COLEC12	Collectin-12
0.13	2.0	NCAPD3	Condensin-2 complex subunit D3
0.00	-1.5	CNTNAP1	Contactin-associated protein 1
0.00	35.0	COPS8	COP9 signalosome complex subunit 8
0.00	-5.2	CPNE3	Copine-3
0.03	2.4	MUS81	Crossover junction endonuclease MUS81
0.39	1.6	CELF2	CUGBP Elav-like family member 2
0.00	5.2	CSTB	Cystatin-B
0.00	2.8	CSRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1
0.00	1.5	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit 5A_ mitochondrial
0.45	13.4	DYNC2H1	Cytoplasmic dynein 2 heavy chain 1
0.00	3.3	CYFIP1	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
0.00	-1.5	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4
0.00	-2.3	PHGDH	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
0.12	-3.4	DPF1	D4 zinc and double PHD fingers family 1 variant 4
0.03	-2.2	DOCK2	Dedicator of cytokinesis protein 2
0.39	11.5	DOCK5	Dedicator of cytokinesis protein 5
0.05	-1.5	DHRS7	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7
0.04	-1.7	ALDH18A1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
0.00	3.1	SAMHD1	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1
0.27	-2.7	DSC3	Desmocollin-3

0.00	5.0	DSP	Desmoplakin
0.00	-13.9	CRMP1	Dihydropyrimidinase-related protein 1
0.00	2.0	DDB1	DNA damage-binding protein 1
0.08	5.5	POLQ	DNA polymerase theta
0.01	-1.5	APEX1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (Fragment)
0.18	-1.8	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
0.00	-2.9	RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2
0.11	-3.1	STT3A	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A
0.10	3.7	ADAR	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase
0.02	-1.5	DBN1	Drebrin
0.02	1.5	DYRK3	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3
0.04	-10.8	DCTN1	Dynactin subunit 1
0.00	94.5	DNM1L	Dynamamin-1-like protein
0.07	2.1	DNAH3	Dynein heavy chain 3_ axonemal
0.00	-1.6	DNAH6	Dynein heavy chain 6_ axonemal
0.30	7.4	DNHD1	Dynein heavy chain domain-containing protein 1
0.01	-1.9	DMD	Dystrophin
0.29	2.0	TRIM25	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25
0.00	-1.8	ITCH	E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog
0.00	-2.9	RNF6	E3 ubiquitin-protein ligase RNF6
0.00	-9.7	EEF1E1-BLOC1S5	EEF1E1-BLOC1S5 readthrough (NMD candidate)
0.07	-10.0	EFCAB7	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 7
0.17	192.1	EHBP1L1	EH domain-binding protein 1-like protein 1
0.00	-1.9	EHD3	EH domain-containing protein 3
0.13	-1.9	EHD4	EH domain-containing protein 4
0.67	-3.3	EVC	Ellis-van Creveld syndrome protein
0.01	-1.5	TUFM	Elongation factor Tu_ mitochondrial
0.00	-1.5	ENG	Endoglin
0.00	1.8	ERP44	Endoplasmic reticulum resident protein 44
0.30	1.5	ECHS1	Enoyl-CoA hydratase_ mitochondrial
0.00	5.3	EVPL	Envoplakin

0.29	1.6	EPHA6	Ephrin type-A receptor 6
0.00	-3.2	EPPK1	Epiplakin
0.12	-1.5	ERO1A	ERO1-like protein alpha
0.00	-2.3	GSPT1	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A (Fragment)
0.09	-1.7	EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
0.00	-1.9	EIF3B	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
0.16	-1.5	EIF3D	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D
0.01	2.2	EIF3F	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F
0.00	1.6	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
0.00	-1.9	EIF5AL1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like
0.06	-1.9	ESYT1	Extended synaptotagmin-1
0.10	1.7	SUPT16H	FACT complex subunit SPT16
0.00	-1.9	FASN	Fatty acid synthase
0.00	-1.6	FTL	Ferritin light chain
0.05	-2.0	FIGNL1	Fidgetin-like protein 1
0.00	1.5	FLNA	Filamin-A
0.00	1.5	FLNB	Filamin-B
0.13	2.6	FBLIM1	Filamin-binding LIM protein 1
0.02	-1.8	FHL1	Four and a half LIM domains protein 1
0.01	1.6	FH	Fumarate hydratase_ mitochondrial
0.39	-2.4	FYCO1	FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1
0.00	-60.5	GPRIN3	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3
0.00	-1.7	LGALS3	Galectin
0.02	4.5	IFI16	Gamma-interferon-inducible protein 16
0.00	-1.9	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
0.32	-8.0	GLUD1	Glutamate dehydrogenase 1_ mitochondrial
0.01	-2.2	ERICH3	Glutamate-rich protein 3
0.04	16.5	GLRX	Glutaredoxin-1
0.00	1.5	GSTP1	Glutathione S-transferase P
0.23	3.4	GCSH	Glycine cleavage system H protein_ mitochondrial (Fragment)
0.02	1.7	GYG1	Glycogenin-1
0.00	-8.0	GLOD4	Glyoxalase domain-containing protein 4

0.00	-2.7	GOLGA4	Golgin subfamily A member 4 (Fragment)
0.09	10.5	GOLGB1	Golgin subfamily B member 1
0.19	1.8	GBF1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1
0.03	1.9	GON4L	GON-4-like protein
0.01	11.5	GRN	Granulins (Fragment)
0.69	-2.0	GAREM1	GRB2-associated and regulator of MAPK protein 1
0.17	1.9	GRIPAP1	GRIP1-associated protein 1
0.53	-1.8	GARNL3	GTPase-activating Rap/Ran-GAP domain-like protein 3
0.00	-5.6	GBP1	Guanylate-binding protein 1
0.00	-1.8	HSPA2	Heat shock-related 70 kDa protein 2
0.00	-3.1	SRCAP	Helicase SRCAP
0.03	-1.5	HLTF	Helicase-like transcription factor
0.00	1.5	HMOX1	Heme oxygenase 1
0.00	14.1	HBA2	Hemoglobin subunit alpha (Fragment)
0.00	1.5	HNRNPA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
0.07	-2.9	HNRNPDL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like_ isoform CRA_b
0.03	-2.2	HK1	Hexokinase-1
0.00	3.2	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1
0.00	-4.1	UTY	Histone demethylase UTY
0.14	-2.0	ASH1L	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
0.00	1.7	HLA-A	HLA class I histocompatibility antigen_ A-68 alpha chain
0.00	3.4	HYDIN	Hydrocephalus-inducing protein homolog
0.25	1.7	HYOU1	Hypoxia up-regulated protein 1
0.05	2.9	IGSF10	Immunoglobulin superfamily member 10
0.20	2.3	IPO7	Importin-7
0.19	2.6	IPO9	Importin-9
0.01	-70.4	TEX14	Inactive serine/threonine-protein kinase TEX14
0.13	1.5	PPA1	Inorganic pyrophosphatase
0.00	-2.7	ITPR3	Inositol 1_4_5-trisphosphate receptor type 3
0.00	-3.8	ITGA2	Integrin alpha-2
0.00	-1.6	ITGB1	Integrin beta-1
0.00	11.9	MX1	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1

0.00	-2.1	MMP1	Interstitial collagenase
0.01	-2.2	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
0.00	-2.7	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP]_ mitochondrial
0.05	-1.9	FSIP2	Isoform 2 of Fibrous sheath-interacting protein 2
0.05	-1.6	NIN	Isoform 3 of Ninein
0.03	-7.9	IGFN1	Isoform 5 of Immunoglobulin-like and fibronectin type III domain-containing protein 1
0.00	-2.8	DPYSL3	Isoform LCRMP-4 of Dihydropyrimidinase-related protein 3
0.00	-1.6	PKM	Isoform M1 of Pyruvate kinase PKM
0.00	-1.5	CLTA	Isoform Non-brain of Clathrin light chain A
0.25	3.5	IARS	Isoleucine--tRNA ligase _ cytoplasmic
0.05	-2.1	KLHL11	Kelch-like protein 11
0.04	-15.7	KIF5C	Kinesin heavy chain isoform 5C
0.93	-8.9	KIF22	Kinesin-like protein
0.01	1.7	KIF13A	Kinesin-like protein KIF13A
0.28	-2.9	KIF1B	Kinesin-like protein KIF1B
0.00	-1.6	KIF27	Kinesin-like protein KIF27
0.18	-1.5	KIF7	Kinesin-like protein KIF7
0.36	-95.7	LMNB1	Lamin-B1
0.16	2.7	LMNB2	Lamin-B2
0.01	-3.8	BAG6	Large proline-rich protein BAG6
0.31	2.1	LARGE1	LARGE xylosyl- and glucuronyltransferase 1
0.11	-2.3	L3MBTL4	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 4
0.01	-2.1	ACSL3	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3
0.00	-5.5	LRP1B	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B
0.05	-1.6	KDM5C	Lysine-specific demethylase 5C
0.03	14.1	MAN2B1	Lysosomal alpha-mannosidase
0.00	34.3	CSF1R	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor
0.00	-1.7	CAPG	Macrophage-capping protein
0.04	-17.0	MFSD10	Major facilitator superfamily domain-containing protein 10
0.00	-1.8	PRNP	Major prion protein (Fragment)
0.00	2.6	MDH2	Malate dehydrogenase_ mitochondrial
0.04	-2.2	MOGS	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase

0.00	2.1	MATR3	Matrin-3
0.00	-4.0	MGA	MAX gene-associated protein
0.07	-1.6	TLL1	Metalloendopeptidase
0.03	4.4	TET2	Methylcytosine dioxygenase TET2
0.34	1.6	MTCL1	Microtubule cross-linking factor 1
0.02	-1.5	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1_ isoforms 1/2/3/5 (Fragment)
0.13	1.7	ALDH1L2	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase
0.01	1.5	MGLL	Monoglyceride lipase
0.06	1.5	ABCC6	Multidrug resistance-associated protein 6
0.04	1.5	PDE4DIP	Myomegalin
0.00	-7.8	MYH10	Myosin-10
0.08	-1.9	MYH13	Myosin-13
0.04	-1.5	MYH4	Myosin-4
0.00	-1.8	MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
0.00	1.8	NLRP9	NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 9
0.00	-2.8	NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1
0.01	-1.5	NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha_ muscle-specific form
0.00	2.2	MME	Neprilysin
0.05	-1.5	NES	Nestin
0.10	12.7	SNU13	NHP2-like protein 1
0.04	-2.2	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1
0.00	3.5	NOP58	Nucleolar protein 58
0.00	-1.7	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2
0.00	3.1	NCL	Nucleolin
0.33	-1.9	NAP1L4	Nucleosome assembly protein 1-like 4
0.00	7.3	OLA1	Obg-like ATPase 1
0.08	1.8	OBSL1	Obscurin-like protein 1
0.14	-2.3	OXTR	Oxytocin receptor
0.02	-1.7	PALLD	Palladin
0.04	24.1	GP2	Pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein GP2
0.00	-2.8	PXN	Paxillin

0.00	1.7	PDLIM1	PDZ and LIM domain protein 1
0.05	2.8	PDLIM5	PDZ and LIM domain protein 5
0.06	-8.9	PDZD2	PDZ domain-containing protein 2
0.00	-	PCNX4	Pecanex-like protein 4
0.00	10.3	FKBP1A	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A
0.09	5.8	FKBP4	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4
0.00	-1.5	PRDX4	Peroxiredoxin-4
0.01	2.6	PRDX5	Peroxiredoxin-5_mitochondrial
0.02	-29.8	ETHE1	Persulfide dioxygenase ETHE1_mitochondrial
0.06	-8.2	SACM1L	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1
0.01	-	INPPL1	Phosphatidylinositol 3_4_5-trisphosphate 5-phosphatase 2
0.08	7.4	PIK3CA	Phosphatidylinositol 4_5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit
0.00	-2.0	PGM1	Phosphoglucomutase-1
0.00	-5.9	PGK2	Phosphoglycerate kinase 2
0.16	1.8	PLXNA2	Plexin-A2
0.08	8.3	PLXNB2	Plexin-B2
0.02	7.6	PLXND1	Plexin-D1
0.00	-1.5	UBB	Polyubiquitin-B
0.03	2.2	PRPF6	Pre-mRNA-processing factor 6
0.10	-1.5	PITRM1	Presequence protease_mitochondrial
0.64	-7.6	DDX4	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4
0.15	1.6	DDX41	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 (Fragment)
0.08	16.2	HERC1	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1
0.01	-2.2	TARBP1	Probable methyltransferase TARBP1
0.00	1.5	PFN2	Profilin
0.00	3.2	PFN1	Profilin-1
0.06	1.9	PDCD5	Programmed cell death protein 5
0.27	1.8	IL16	Pro-interleukin-16
0.00	-2.1	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4
0.00	-2.2	P4HA1	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1
0.00	-1.9	PSAP	Prosaposin

0.03	2.1	PSMA4	Proteasome subunit alpha type (Fragment)
0.00	-3.6	PSMB2	Proteasome subunit beta type-2
0.00	-1.8	PSMB3	Proteasome subunit beta type-3 (Fragment)
0.01	5.0	PSMB8	Proteasome subunit beta type-8
0.02	18.7	EPB41	Protein 4.1 (Fragment)
0.01	-5.3	PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1
0.01	-1.5	CNPY2	Protein canopy homolog 2 (Fragment)
0.32	1.6	FRYL	Protein furry homolog-like (Fragment)
0.01	-3.5	MON2	Protein MON2 homolog
0.22	1.7	NDRG1	Protein NDRG1
0.00	23.1	FAM129A	Protein Niban
0.00	2.5	NPAT	Protein NPAT
0.00	-5.0	PPP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7 (Fragment)
0.08	5.0	PCLO	Protein piccolo
0.00	-3.3	PRRC2C	Protein PRRC2C
0.08	-2.1	S100A16	Protein S100-A16
0.01	3.8	SET	Protein SET
0.26	-16.5	SOGA1	Protein SOGA1
0.01	6.4	SBNO1	Protein strawberry notch homolog 1
0.00	-1.9	SEC23A	Protein transport protein SEC23
0.10	23.6	SEC24C	Protein transport protein Sec24C
0.01	1.5	SEC31A	Protein transport protein Sec31A
0.02	-5.5	UNC80	Protein unc-80 homolog
0.13	-6.6	YIPF5	Protein YIPF5
0.00	1.7	PCMT1	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
0.00	1.5	FAT4	Protocadherin Fat 4
0.01	-1.8	PCDH10	Protocadherin-10
0.09	2.8	CROCC2	Putative ciliary rootlet coiled-coil protein 2
0.00	-13.7	TUBA4B	Putative tubulin-like protein alpha-4B
0.00	4.5	PDXDC1	Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1
0.00	-3.0	RAB11FIP4	Rab11 family-interacting protein 4
0.02	5.7	G3BP2	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2



0.00	2.0	IQGAP2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2
0.46	-1.5	RAB34	Ras-related protein Rab-34_ isoform NARR (Fragment)
0.00	-1.7	RAB5A	Ras-related protein Rab-5A
0.00	-2.8	RAB7A	Ras-related protein Rab-7a (Fragment)
0.11	-2.3	RAB8A	Ras-related protein Rab-8A
0.50	-5.7	FAM213A	Redox-regulatory protein FAM213A
0.00	1.8	ARHGAP35	Rho GTPase-activating protein 35
0.09	8.6	DLC1	Rho GTPase-activating protein 7
0.28	1.5	ARHGEF10	Rho guanine nucleotide exchange factor 10
0.01	3.1	RRM1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
0.16	-1.9	RBOX1	RNA binding protein fox-1 homolog
0.02	2.8	RBM14	RNA-binding protein 14
0.10	5.2	RBM15	RNA-binding protein 15
0.00	-1.5	FUS	RNA-binding protein FUS
0.02	-58.0	CROCC	Rootletin
0.15	2.0	RUVBL1	RuvB-like helicase (Fragment)
0.03	1.8	RYR1	Ryanodine receptor 1
0.01	-2.5	RYR2	Ryanodine receptor 2
0.02	1.6	SACS	Sacsin
0.00	-1.6	MAT2A	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2
0.00	2.5	SRSF3	Serine/arginine-rich splicing factor 3
0.15	-1.5	SRSF1	Serine/arginine-rich-splicing factor 1 (Fragment)
0.00	1.8	SRSF2	Serine/arginine-rich-splicing factor 2 (Fragment)
0.05	6.2	DCLK1	Serine/threonine-protein kinase DCLK1
0.09	1.8	MTOR	Serine/threonine-protein kinase mTOR
0.00	2.5	PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform
0.10	1.6	PPP1CA	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
0.00	8.2	ALB	Serum albumin
0.00	-1.7	SH3BGRL3	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3
0.00	1.6	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
0.19	1.7	SIPA1L3	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3

0.02	-2.0	PDS5A	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A
0.49	13.5	SRGAP3	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3
0.00	1.8	SNRPF	Small nuclear ribonucleoprotein F
0.01	-5.7	MTAP	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase
0.02	-1.8	SCN10A	Sodium channel protein
0.00	-1.7	SPATC1L	Speriolin-like protein
0.31	1.7	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1 (Fragment)
0.00	-1.5	CTTN	Src substrate cortactin
0.00	-1.7	STARD9	StAR-related lipid transfer protein 9
0.02	-1.9	STMN1	Stathmin
0.32	-2.0	SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit_mitochondrial
0.00	-1.7	SOD2	Superoxide dismutase [Mn]_mitochondrial
0.29	-2.4	SURF4	Surfeit locus protein 4
0.06	-7.3	SYTL2	Synaptotagmin-like protein 2
0.14	-4.9	TBC1D2	TBC1 domain family member 2A
0.14	-1.8	CCT2	T-complex protein 1 subunit beta
0.05	-2.9	SMG6	Telomerase-binding protein EST1A
0.00	-1.6	CD81	Tetraspanin
0.00	1.5	TXNDC17	Thioredoxin domain-containing protein 17
0.00	-1.5	THBS1	Thrombospondin-1
0.02	-2.6	THBS2	Thrombospondin-2
0.00	1.5	THADA	Thyroid adenoma-associated protein
0.00	12.6	TLDC1	TLD domain-containing protein 1
0.00	2.3	TOR1AIP1	Torsin-1A-interacting protein 1
0.27	-1.7	TP53BP1	TP53-binding protein 1
0.11	2.9	SUPT5H	Transcription elongation factor SPT5
0.19	-64.3	SUPT6H	Transcription elongation factor SPT6
0.00	3.8	TRPM3	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3
0.00	-1.5	TPT1	Translationally-controlled tumor protein
0.05	1.7	SSR1	Translocon-associated protein subunit alpha
0.02	17.4	KIAA1109	Transmembrane protein KIAA1109
0.00	-8.7	TICRR	Treslin

0.08	-5.2	TRIOBP	TRIO and F-actin-binding protein
0.02	1.7	TRIO	Triple functional domain protein
0.01	-1.6	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain
0.00	-1.6	TUBB3	Tubulin beta-3 chain
0.06	11.1	PTPN13	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13
0.01	-1.5	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
0.00	-8.8	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
0.19	-2.4	USP34	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34
0.01	-1.5	UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
0.02	1.9	UBE4B	Ubiquitin conjugation factor E4 B
0.23	1.6	UBFD1	Ubiquitin domain-containing protein UBFD1
0.05	2.0	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
0.00	810.5	UFM1	Ubiquitin-fold modifier 1 (Fragment)
0.00	-1.7	UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
0.01	-3.6	UAP1	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase
0.32	1.9	KIAA1551	Uncharacterized protein KIAA1551
0.16	1.6	MYO1A	Unconventional myosin-Ia
0.00	-1.5	MYO1B	Unconventional myosin-Ib
0.34	1.8	MYO9A	Unconventional myosin-IXa
0.01	-23.5	MYO9B	Unconventional myosin-IXb
0.14	-2.6	MYO5C	Unconventional myosin-Vc
0.57	1.7	VPS13C	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
0.01	-2.4	VPS35	Vacuolar protein sorting-associated protein 35
0.07	-1.5	VPS8	Vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog

0.22	-3.1	FLT1	Vascular endothelial growth factor receptor 1
0.00	-49.7	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2
0.20	1.7	VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
0.02	-33.4	VCAN	Versican core protein
0.03	22.6	CRYBG3	Very large A-kinase anchor protein
0.31	1.5	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase_mitochondrial
0.00	1.5	VAMP3	Vesicle-associated membrane protein 3
0.01	-1.5	LMAN2	Vesicular integral-membrane protein VIP36
0.00	2.5	VTN	Vitronectin
0.00	1.5	VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
0.01	-2.1	CACNA1C	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha
0.33	-1.6	VWA5B1	von Willebrand factor A domain-containing protein 5B1
0.02	26.2	ATP6V1H	V-type proton ATPase subunit H
0.00	2.4	WASHC5	WASH complex subunit 5
0.13	1.7	XRCC5	X-ray repair cross-complementing protein 5
0.00	2.1	ZBTB26	Zinc finger and BTB domain-containing protein 26
0.25	1.9	ZC3HAV1	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1
0.01	-30.2	ZFYVE9	Zinc finger FYVE domain-containing protein 9
0.00	109.1	ZNF469	Zinc finger protein 469
0.02	-3.5	ZNF490	Zinc finger protein 490
0.11	1.5	ZNF536	Zinc finger protein 536 (Fragment)
0.00	93.6	ZNF570	Zinc finger protein 570
0.10	1.6	ZZEF1	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1

### ANEXO 3 54 PROTEÍNAS COMPARTIDAS EN AMBOS GRUPOS

PROTEÍNAS			
ALDH18A1	ENG	MYO1B	RYR1
AP2B1	EVPL	NES	SAMHD1
CAPG	FAT4	NIN	SCIN
CD81	FAU	NQO1	SEC31A
CLTA	FUS	NUMA1	SOD2
COL1A1	HBA2	OLA1	STAT1
COL1A2	ITGA2	P4HA1	THBS1
CRMP1	KDR	PALLD	TRPM3
CSDE1	LMAN2	PDLIM1	TUBA4B
CTNND1	LRP1B	PGD	TUBB3
CTTN	MACF1	PHGDH	UAP1
DNAH6	MAT2A	PKM	
DOCK2	MATR3	PSMA4	
DSP	MX1	RRM1	