



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**Departamento de Biomedicina Molecular**

**“Evaluación de la expresión diferencial de miRNAs asociados a la  
Enfermedad de Alzheimer Familiar”**

**T E S I S**

Que presenta

**Bio. Mol. Nadia Rubí García Ríos**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de

**Biomedicina Molecular**

Director de Tesis:

**Dr. Marco Antonio Meraz Ríos**

Ciudad de México

Agosto, 2024

## **ASESORES**

**Dra. Ma. del Carmen Sánchez Torres**

Investigador Cinvestav  
Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV Zacatenco

**Dra. Leticia Cedillo Barrón**

Investigador Cinvestav  
Departamento de Biomedicina Molecular  
CINVESTAV Zacatenco

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de esta maestría

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás, por ser parte de mis alegrías, mis tristezas y mis desvelos. Gracias por su apoyo incondicional y por ser parte de cada paso que doy. Les debo todo lo que soy y estoy eternamente agradecida por ello.

A Diego Gaytan, por su inmensa paciencia. Agradezco infinitamente que haya estado para mí aún en los días más grises.

A mi director de tesis, el Dr. Marco Antonio Meraz Ríos, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su tiempo, sus consejos y aportaciones. Gracias por todo.

A mis compañeros de laboratorio, por su constante apoyo y motivación cuando los experimentos no salían. A Ale y Migue, por escucharme y aconsejarme cuando ya no sabía que más hacer. A Lory, Fer, Vane, Talía, Karla, Itzel y Alicia, por todo su apoyo y las risas dentro y fuera del laboratorio. A Pilar, por todo el apoyo técnico-práctico en el trabajo de laboratorio. A Julio, por animarnos, hacernos reír y por mantener siempre listo el material.

A la Dra. Rosaura Hernández Rivas y a la Dra. Elena Aréchaga Ocampo, por ayudarme a adentrarme al mundo de los miRNAs.

A mis amigos de maestría. A Jael, por encontrar en ti una increíble amiga. A Arturo, Kevin y Obed, por todas las horas que pasamos juntos, el estrés y las risas.

*A mi hermana.*  
*A pesar de la distancia, estas en cada momento.*



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XI
RESUMEN.....	1
<i>ABSTRACT.</i> .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Enfermedad de Alzheimer.....	3
Etiología y clasificación.....	3
Fisiopatología.....	4
Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF).....	10
Mutaciones en APP.....	10
Mutaciones en PSEN. ....	11
Mutaciones en Familias con Enfermedad de Alzheimer.....	13
Mutación Jalisco.....	15
Plasticidad del bulbo olfatorio.....	16
Células troncales olfatorias ecto-mesenquimales (OE-MSCs).....	19
Obtención de los precursores neurales.....	20
miRNAs.....	21
Biogénesis de los miRNAs .....	22
La vía canónica de biogénesis de los miRNAs .....	22
Biogénesis no canónica de miRNAs .....	24
Mecanismos de regulación de los miRNAs.....	25
Silenciamiento mediado por el miRISC.....	25
Activación de la traducción mediada por miRNAs.....	26
Señalización intercelular.....	26
Transporte de miRNAs vía EV .....	26
Transporte de miRNA vía los complejos proteína-miRNA.....	27
Potenciales biomarcadores de las enfermedades.....	28
Biomarcadores en Alzheimer.....	29
La rata como modelo de estudio en la Enfermedad de Alzheimer.....	34
Modelo de rata de la Enfermedad de Alzheimer: TgF344-AD .....	36
ANTECEDENTES DIRECTOS .....	39

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	44
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVOS .....	45
General .....	45
Específicos.....	45
METODOLOGÍA .....	46
Familia de estudio. ....	46
Cultivo de las células ecto-mesenquimales del surco olfatorio humano. ....	46
Obtención de las células MSCs a partir de Bulbo Olfatorio de Rata .....	47
Extracción de RNA .....	47
Cuantificación de miRNAs por qPCR.....	48
Transcripción reversa.....	48
qPCR.....	49
Identificación de blancos moleculares y vías implicadas.....	50
Identificación de miRNAs en el modelo animal. ....	51
RESULTADOS.....	52
DISCUSIÓN .....	83
CONCLUSIONES .....	100
PERSPECTIVAS .....	101
BIBLIOGRAFÍA .....	102
ANEXOS .....	115



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP (16). .....	5
Figura 2. Complejo de la $\gamma$ -secretasa. ....	7
Figura 3. Pasos secuenciales en la formación de los NFTs (21). ....	9
Figura 4. Las mutaciones en la proteína APP. ....	10
Figura 5. Mutaciones en las proteínas PSEN y su estructura. ....	13
Figura 6. Mutaciones familiares en PSEN1. ....	14
Figura 7. Mecanismos de neurogénesis y plasticidad del bulbo olfatorio. ....	17
Figura 8. Citoarquitectura de los componentes celulares de la mucosa olfatoria humana. .....	18
Figura 9. El sistema SVZ-OB. ....	19
Figura 10. Biogénesis de miRNA y mecanismo de acción. ....	23
Figura 11. Comunicación intercelular vía miRNAs. ....	28
Figura 12. Plásmidos APP <sub>sw</sub> y PS1 $\Delta$ E9 de la rata TgF344-AD. ....	38
Figura 13. RNAs diferencialmente expresados en las OE-MSCs al compararse por estadio de la enfermedad. ....	40
Figura 14. Perfil transcriptómico de OE-MSCs derivadas de portadores de la mutación PSEN1(A431E) y sus controles. ....	42
Figura 15. Perfil de miRNAs en portadores de la mutación PSEN1(A431E). ....	43
Figura 16. Pedigrí de la familia de estudio (76). ....	46
Figura 17. Esquema de la qPCR específica de los miRNAs. ....	50
Figura 18. Gel de integridad de RNA. ....	53
Figura 19. <i>Relative Fold Change</i> de miRNA-4521, miR-32, miR-3142 y miR-147b. .....	54
Figura 20. <i>Relative Fold Change</i> de miRNA-146a, miR-130b, miR-1178 y miR-4540. .....	55
Figura 21. <i>Relative Fold Change</i> de miRNA-4668, miR-32, miR-155 y miR-125b-1. .....	56
Figura 22. <i>Relative Fold Change</i> de miR-9. ....	57
Figura 23. Genes blanco para los miRNAs encontrados en bases de datos miRTarBase, TarBase y mirWalk. ....	59
Figura 24. Análisis KEGG y GO del estadio asintomático 20s. ....	62
Figura 25. Redes de miRNAs del estadio asintomático 20s. ....	64
Figura 26. Análisis KEGG y GO del estadio asintomático 30s. ....	67

Figura 27. Redes de miRNAs del estadio asintomático 30s. ....	69
Figura 28. Análisis KEGG y GO del estadio presintomático 40s.....	72
Figura 29. Redes de miRNAs del estadio presintomático 40s.....	74
Figura 31. Redes de miRNAs DE. ....	79
Figura 32. <i>Relative Fold Change</i> de miRNAs en rata TgF344-AD.....	82

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Lista de los miRNAs reportados para la EA.....	31
Tabla II. Resumen de los modelos transgénicos de amiloides en ratas. ....	36
Tabla III. Cuantificación y pureza de la extracción de RNA.....	52
Tabla IV. miRNAs validados diferencialmente expresados por edad. ....	58
Tabla V. Análisis de vías KEGG y GO para el estadio asintomático 20s. ....	63
Tabla VI. Análisis de vías KEGG y GO para el estadio asintomático 30s. ....	68
Tabla VII. Análisis de vías KEGG y GO para el estadio presintomático 40s. ....	73
Tabla VIII. Análisis de vías KEGG y GO para los miRNAs DE. ....	78

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Secuencias de los miRNAs en humano y en rata. ....	115
Anexo II. Secuencia de los primers para la validación de los miRNAs por qPCR...	117
Anexo III. Patrón de bandeo del <i>Ladder</i> 20 bp Low Ladder Sigma-Aldrich. ....	119
Anexo IV. <i>Relative Fold Change</i> de los miRNAs .....	120
Anexo V. Curvas de disociación de qPCR de células de portadores .....	122
Anexo VI. Blancos moleculares de los miRNAs .....	129
Anexo VII. Genes involucrados en las vías KEGG y GO del estadio asintomático 20s. .....	132
Anexo VIII. Genes involucrados en las vías KEGG y GO del estadio asintomático 30s. .....	136
Anexo IX. Genes involucrados en las vías KEGG y GO del estadio presintomático 40s. .....	144
Anexo X. Genes involucrados en las vías KEGG y GO de los miRNAs DE. ....	152
Anexo XI. Vías moleculares de los miRNAs.....	164
Anexo XII. Cuantificación y pureza de la extracción de RNA de células de rata ....	168
Anexo XIII. Geles de integridad de RNA para células de rata. ....	168
Anexo XIV. <i>Relative Fold Change</i> de los miRNAs en ratas.....	169
Anexo XV. Curvas de disociación de qPCR de células de rata .....	170
Anexo XVI. KEGG Pathways- Alzheimer's Disease. ....	177

## RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA), es la causa más común de demencia y se caracteriza por el depósito de agregados de proteínas mal plegadas en el cerebro, que incluyen al amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ) y a la proteína tau hiperfosforilada (p-tau). Mutaciones en genes involucrados en el procesamiento del  $A\beta$  (*APP*: Proteína Precursora del Amiloide, *PSEN1* y *PSEN2*: Presenilina 1 y 2) son las causantes de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), llevando a la generación y agregación incrementada del  $A\beta$ . Dentro de estas, las más comunes y patogénicas son aquellas en el gen de la *PSEN1*. Una de estas mutaciones en *PSEN1*, conocida como la mutación “Jalisco”, por su lugar de origen, incluye a la variante A431E. Esta mutación es dominante y de penetrancia completa, y su característica principal es que causa paraparesis espástica. Los portadores de esta mutación tienen un inicio de síntomas alrededor de los 42 años y una esperanza de vida de 49 años.

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes, con un tamaño promedio de 22 nucleótidos y su principal función es regular a los RNAs mensajeros (mRNA). Esta regulación termina en el silenciamiento, degradando al mRNA o interfiriendo en la traducción de proteínas. Se ha visto que los miRNAs están involucrados en la patogénesis de la EA y su expresión ha permitido diferenciar las distintas etapas de la enfermedad.

En un análisis por microarreglos, previamente realizado por nuestro grupo de investigación, se identificaron 14 miRNAs que estaban diferencialmente expresados, en al menos un estadio de la enfermedad (asintomático, presintomático y/o sintomático), en células ecto-mesenchimales derivadas de portadores con la mutación *PSEN1* (A431E). En este trabajo, mediante el uso de la técnica de RT-qPCR, se logró validar la expresión de 13 de los 14 miRNAs en los estadios asintomático y presintomático. Los resultados de nuestro análisis demostraron que la mayoría de los miRNAs se encontraban subexpresados en las células con la mutación. Estos miRNAs se asociaron con la patología de la EA a través de tres ejes funcionales: 1) inflamación, 2) supervivencia/muerte celular y 3) agregación de proteínas. Estos tres ejes, no son

independientes entre sí y, así como los mecanismos de regulación de la propia enfermedad, son muy amplios y se sobreponen entre ellos.

***ABSTRACT.***

Alzheimer's disease (EA) is the most common cause of dementia. It is characterized by depositing aggregates of poorly folded proteins in the brain, including amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) and hyperphosphorylated tau protein. (p-tau). Mutations in genes involved in the processing of  $A\beta$  (APP: Amyloid Precursor Protein, PSEN1, and PSEN2: Preseniline 1 and 2) are the causes of Familial Alzheimer's Disease (EAF), leading to increased  $A\beta$  generation and aggregation. Among these, the most common and pathogenic are those in the PSEN1 gene. One of these mutations in PSEN1, known as the Jalisco mutation by its place of origin, includes the A431E variant. This mutation is dominant and fully penetrating, and its principal characteristic is that it causes spastic paraparesis. Carriers of this mutation have an onset of symptoms around 42 and a life expectancy of 49 years.

MicroRNAs are small non-coding RNAs with an average size of 22 nucleotides, and their primary function is to regulate the messenger RNA (mRNA). This regulation ends in silencing, degrading the mRNA, or interfering with the translation of proteins. It has been seen that miRNAs participate in the pathogenesis of the EA, and their expression has allowed for the differentiation of the distinct stages of the disease.

In a micro-analysis previously conducted by our research group, 14 miRNAs were identified that were differentially expressed at least one stage of the disease (asymptomatic, presymptomatic, and/or symptomatic) in ecto-mesenchymal cells derived from carriers with the PSEN1 mutation (A431E). In this work, it was possible to validate the expression of 13 of the 14 miRNAs in the asymptomatic and presymptomatic stages using the RT-qPCR technique. Our analysis showed that most of the miRNAs were downregulated in the cells with the mutation. These miRNAs were associated with EA pathology through three functional axes: 1) inflammation, 2) cell survival/death, and 3) protein aggregation. These three axes are not independent of each other, and, like the regulatory mechanisms of the disease itself, they are very broad and overlap

## INTRODUCCIÓN

La demencia es un síndrome clínico caracterizado por el deterioro cognitivo progresivo que interfiere con la capacidad de funcionar independientemente (1). Se manifiesta como la pérdida de la cognición en al menos uno de sus dominios, los cuales incluyen la función ejecutiva, la atención compleja, el lenguaje, la memoria, la cognición perceptual-motora y la social (2). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, hay más de 55 millones de individuos con demencia y 10 millones de nuevos casos cada año; generando un costo global aproximado de 1.3 billones de dólares por año (3).

Existen diferentes condiciones que pueden provocar un desorden neurocognitivo grave y se han propuesto 13 diferentes condiciones etiológicas que se asocian con el desarrollo del síndrome demencial (4). Los cuatro tipos más comunes de demencia son: la Enfermedad de Alzheimer (EA), la demencia vascular (VD), la demencia por cuerpos de Lewy (Parkinson) y la demencia frontotemporal (FTD) (1). La EA es la causa más común de demencia, causando del 70% al 80% de los casos (4).

### **Enfermedad de Alzheimer**

La Enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa con inicio insidioso y declive progresivo de las funciones asociadas al comportamiento y también cognitivas, que incluyen la memoria, la comprensión, el lenguaje, la atención, el razonamiento y el juicio (5). La EA, representa la primera causa de muerte por demencia en personas mayores a 65 años y se estima que para el 2050 habrá 152 millones de personas con este tipo de demencia (6,7).

### **Etiología y clasificación.**

La EA, puede clasificarse de acuerdo a la edad en la que se manifiestan los primeros signos o síntomas (de inicio temprano o tardío) y también se puede clasificar de acuerdo a su patrón de herencia (Familiar o Esporádica), siendo la edad y la genética los principales factores de riesgo (8,9). La Enfermedad de Alzheimer de Inicio Temprano (EOAD, *Early Onset Alzheimer Disease*), muy asociada a la Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), se presenta antes de los 65 años y aparece en el 2-5% de los individuos portadores. Por el contrario, la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío (LOAD, *Late*

*Onset Alzheimer Disease*), también conocida como esporádica, involucra alrededor del 95% de los casos, y se manifiesta después de los 65 años (10). De acuerdo con los datos epidemiológicos mundiales, a los 65 años se tiene un 3% de posibilidad de tener EA, y aumenta por encima del 30% a los 85 años. La incidencia de EA en población por debajo de los 65 años es baja, pero se estima que este grupo representa al 3% de la población (9).

La EA esporádica (LOAD), tiene una etiología heterogénea, con un componente genético asociado a genes que determinan un cierto factor de riesgo que puede llegar a ser hasta del 70 al 80%. Por el contrario, la EA de inicio temprano (EOAD), y particularmente la EAF, son variantes de la enfermedad que están determinadas por la genética, con una heredabilidad del 92 al 100%, respectivamente (10). La EAF, presenta un patrón de herencia mendeliana, autosómica dominante con penetrancia completa. Se han identificado mutaciones en 3 genes: la proteína precursora del amiloide (APP, *Amyloid Precursor Protein*, por sus siglas en inglés), la Presenilina-1 (PSEN-1) y la Presenilina-2 (PSEN-2). En este sentido, la genética de los individuos, tiene un importante papel en el desarrollo y expresión de la EAF; mientras que, en el caso de la forma esporádica, no guarda ninguna relación heredable simple y los factores ambientales llegan a ser muy importantes para el desarrollo de la enfermedad (9,11).

### **Fisiopatología**

La presencia de los agregados extracelulares del péptido  $\beta$ -Amiloide (A $\beta$ ), denominados placas neuríticas y de los ovillos neurofibrilares (NFT; *Neurofibrillary tangles*, por sus siglas en inglés) intracelulares, conformados por la proteína Tau hiperfosforilada (P-Tau), presentes en el citoplasma de las neuronas, son características neuropatológicas específicas de la EA. Ambas estructuras se encuentran en los casos esporádicos, así como en las formas familiares de la enfermedad, indicando que constituyen el producto final de una vía común que conlleva a la demencia (12). Se cree que estos depósitos del péptido  $\beta$ -Amiloide y de la proteína Tau, llevan a la atrofia y muerte neuronal como resultado de procesos de excitotoxicidad (estimulación excesiva de receptores de neurotransmisores en las membranas neuronales), además provocan colapso de la homeostasis del calcio, inflamación, depleción de energía y de otros factores neuronales. Como resultado de este proceso, se genera daño neuronal y



también en las sinapsis involucradas en los procesos de memoria, aprendizaje y otras funciones cognitivas que provocan el declive cognitivo previamente mencionado (13).

Los péptidos de A $\beta$  se generan a partir del corte proteolítico de la proteína APP. La APP es una proteína de un solo paso en la membrana que tiene dos vías por las que puede ser procesada: 1) la vía no amiloidogénica y 2) la vía amiloidogénica. En la primera se da un corte proteolítico por una enzima denominada  $\alpha$ -secretasa, que lleva a la formación del fragmento soluble APPs $\alpha$ , que tiene funciones neuroprotectoras y también genera al fragmento intracelular  $\alpha$ CTF; que luego es cortado por la  $\gamma$ -secretasa para generar el péptido p3 y el fragmento intracelular AICD. En la vía amiloidogénica, se forma el A $\beta$  por el corte sucesivo de la APP por una enzima diferente, la  $\beta$ -secretasa, para generar los péptidos APPs $\beta$  y  $\beta$ CTF, este último es cortado por la  $\gamma$ -secretasa para producir al A $\beta$  y al fragmento AICD (Figura 1) (14).

Las  $\alpha$ -secretasas son un grupo de proteínas transmembranales que tiene característica de metaloproteínasa, a este grupo pertenecen las proteínas de la familia ADAM (ADAM9, ADAM10 y ADAM17). La  $\alpha$ -secretasa, lleva a cabo su función, haciendo un corte proteolítico de la APP, en la membrana plasmática, generando así a los fragmentos APPs $\alpha$  y  $\alpha$ CTF (C83), este último, unido a la membrana. Este corte está controlado a nivel transcripcional, traduccional, postraduccional y también por el tráfico intracelular de la proteína anclada a la membrana (15).

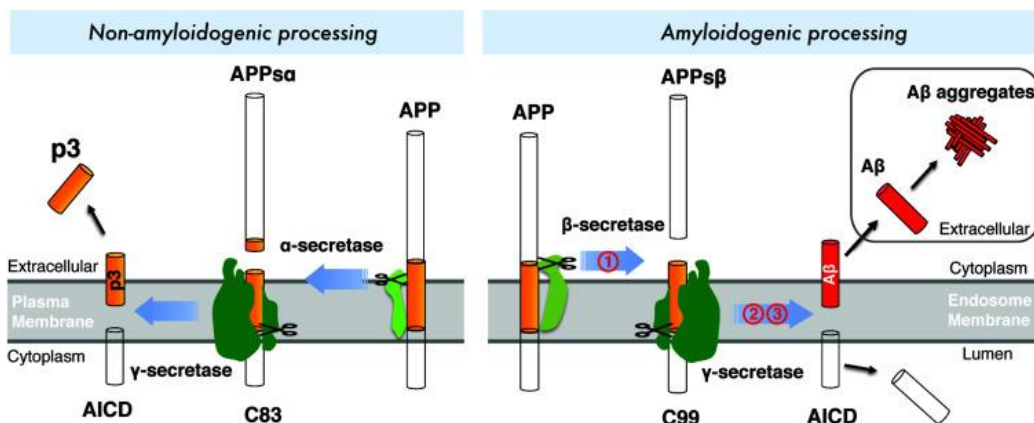


Figura 1. Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico de la APP (16).

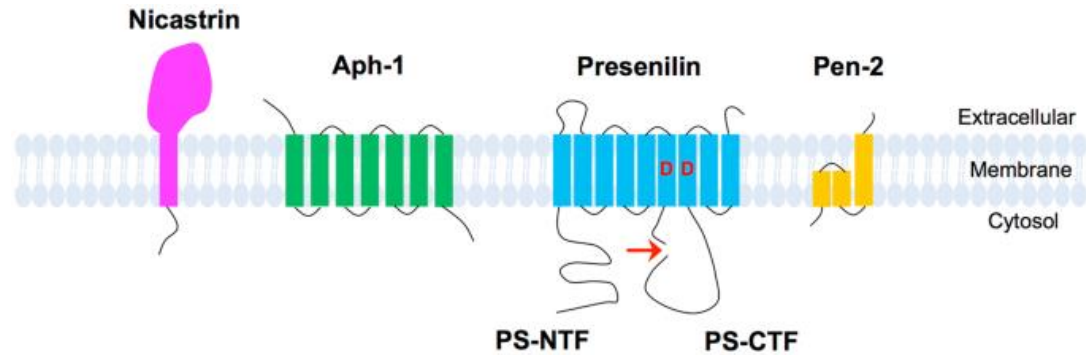
Por otro lado, la  $\beta$ -secretasa (BACE1,  $\beta$ -APP-cleaving enzyme-1), una aspartil proteasa de membrana tipo 1, constituida por 501 aminoácidos, que se localiza dentro de los

compartimentos subcelulares ácidos de la vía secretoria, principalmente en el Aparato de Golgi y los endosomas (16), lleva a cabo el corte de la región extracelular de la APP, principalmente en endosomas y en la red de trans-Golgi, generando al péptido APPs $\beta$  y al fragmento  $\beta$ CTF (C99) unido a la membrana (15).

Finalmente, la  $\gamma$ -secretasa constituida por un complejo de proteínas transmembranales que contiene a la Presenilina 1 o 2 (PSEN-1 o PSEN-2, respectivamente), es la encargada de hacer el corte intra-membranal, de los fragmentos C83 (vía no amiloidogénica) o C99 (vía amiloidogénica) de la APP y son las responsables de generar a los péptidos P3 y A $\beta$ , respectivamente. Los otros elementos de la  $\gamma$ -secretasa son Nicastrina, la proteína Faringe Anterior Defectuosa-1 (Aph-1) y el *enhancer* de Presenilina-2 (Pen-2) ([Figura 2](#)). Nicastrina y Aph-1, se cree que llevan a cabo la formación de un complejo de proteínas estable y de alto peso molecular, la Pen-2 podría estar regulando la endoproteólisis de las Presenilinas para formar un heterodímero estable que se une al complejo Nct/Aph1 (17). El ensamble del complejo  $\gamma$ -secretasa se inicia en el retículo endoplasmático (RE), donde interactúan Aph-1 y Nicastrina, seguido por la unión de la PSEN. Posteriormente, Pen-2 se une al complejo y facilita la endoproteólisis de PSEN para generar los péptidos PSEN-NTF y PSEN-CTF, resultando en el complejo activo de la  $\gamma$ -secretasa. La  $\gamma$ -secretasa activa, lleva a cabo el corte proteolítico de C99 liberando al péptido A $\beta$  (A $\beta$ 40 o A $\beta$ 42) de manera extracelular y al péptido AICD en el citoplasma (18).

La formación de las placas amiloides inicia a partir de la agregación de los péptidos A $\beta$  desordenados intrínsecamente, que se ensamblan en oligómeros y posteriormente en fibrillas altamente ordenadas en una vía dependiente de la nucleación, en la que los monómeros se auto asocian para formar un centro de nucleación. La adición de más péptidos A $\beta$  culmina en la formación de fibrillas, que pueden alargarse en los extremos, agregando más péptidos A $\beta$ . En una nucleación secundaria la superficie de las fibrillas, compuestas por los agregados del A $\beta$ , pueden catalizar la formación de nuevas fibrillas. Las formas predominantes del péptido A $\beta$  son las variantes A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (19), siendo la última la más agregativa. El A $\beta$  se acumula inicialmente en las regiones

neocorticales, posteriormente en el sistema límbico, el diencefalo, el prosencéfalo basal y, finalmente, en el cerebelo (20).



**Figura 2. Complejo de la  $\gamma$ -secretasa.**

El complejo de  $\gamma$ -secretasa requiere de al menos cuatro componentes esenciales: Presenilina 1 o 2 (PSEN-1 o 2), Nicastrina (NCT), Aph-1 y Pen-2. Los dos dominios catalíticos aspartil en PSEN están indicados por una "D". PSEN sufre endoproteólisis (indicado por la flecha) y se convierte en un heterodímero PSEN-NTF/PS-CTF (18).

Las fibrillas de amiloide- $\beta$  son altamente ordenadas, con una estructura planar de hojas  $\beta$ , en las que las hebras  $\beta$  están orientadas perpendicularmente al eje de las fibras. Estas fibras forman subunidades que son protofilamentos que se asocian con una fibra de A $\beta$  madura. Estas fibras de A $\beta$  activan a las células de la microglía, induciendo la producción de citocinas proinflamatorias e incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual contribuye a la neurodegeneración asociada con la EA. La microglía también afecta la generación y la degradación de las fibrillas de A $\beta$ , y este balance representa un factor determinante para que las placas amiloides se acumulen en el cerebro (19).

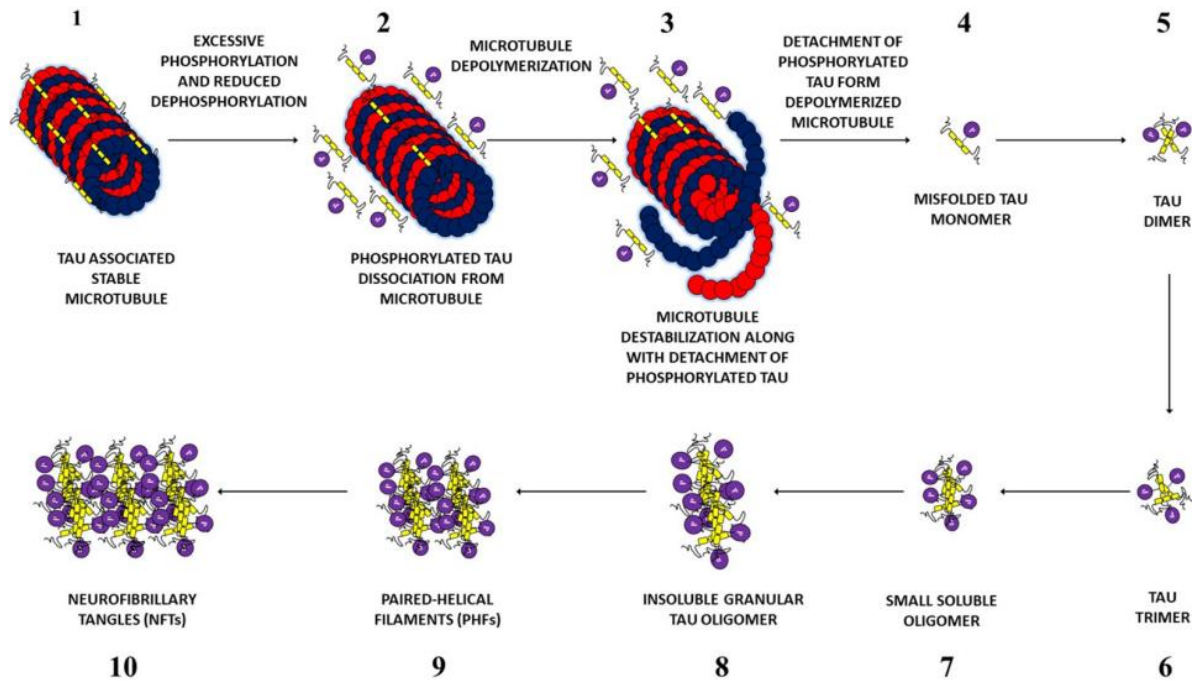
De acuerdo con la teoría más difundida de la patogénesis de la EA, la degradación del A $\beta$  derivado del corte proteolítico de APP por la  $\beta$  y la  $\gamma$ -secretasa se disminuye con la edad o en condiciones patológicas y esto lleva a la acumulación del péptido A $\beta$  (A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42). El incremento de la relación A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 induce la formación de fibrillas amiloides, resultando en la neurotoxicidad y la inducción de la hiperfosforilación de Tau, alterando las funciones de esta proteína y esto, consecuentemente, lleva a la neurodegeneración y a la muerte neuronal (8).

La segunda característica de la EA, es la agregación intracelular de los ovillos neurofibrilares, los cuales están compuestos por la proteína Tau hiperfosforilada. La proteína Tau ( $\tau$ ) es una proteína asociada a los microtúbulos (MAP; *Microtubule-Associated Protein*, por sus siglas en inglés) que tiene la capacidad de estabilizar los microtúbulos neurales y se encuentra altamente expresada en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en las neuronas oculares (21).

La proteína Tau contiene cuatro dominios funcionales denominados: 1) dominio de proyección N-terminal, 2) regiones ricas en prolina (PRR, *proline-rich regions*), 3) dominio de unión a microtúbulos (MTBR, *microtubule-binding of Tau*) y 4) el dominio C-terminal. El gen humano de Tau está en el brazo largo del cromosoma 17 y está compuesto de 16 exones. El primer (exón -1) funciona como parte del promotor, y los exones constitutivos incluyen a los exones E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12 y E13, y los exones E2, E3 y E10 pueden ser procesados por splicing alternativo. El *splicing* alternativo de estos últimos exones dan lugar a la presencia de seis isoformas de Tau 3R0N, 3R1N, 3R2N, 4R0N, 4R1N y 4R2N. El splicing alternativo de E2 y E3 produce variantes que contienen cero (0N), uno (1N) o dos (2N) insertos en el N-terminal. Además de esto, los exones E4A y E6, son procesados por el splicing, de forma constitutiva en el CNS. Finalmente, el exón 14 codifica para la región 3' UTR del mRNA de Tau. Los exones E4A, E6 y E8 solo se encuentran expresados en tejido periférico y no en el cerebro humano. El adulto humano posee las seis isoformas de Tau, cada una de estas es de naturaleza diversa entre sí y esto se debe a la fluctuación en las regiones repetidas de unión a tubulina. Las isoformas 3R y 4R deben estar en relación uno a uno de manera normal en el cerebro. En estas isoformas el número hace referencia a la cantidad de repeticiones de unión a tubulina (21).

La función fisiológica más importante de Tau es la estabilización de los microtúbulos. Estos, deben ser estabilizados en direcciones definidas que permitan la formación de extensiones citoplasmáticas como son los axones y las dendritas. Tau provee estabilización de estos microtúbulos en porciones distales de los axones y las dendritas. Las redes de microtúbulos son responsables del transporte axonal, que aseguran que el transporte de componentes celulares vitales como organelos y moléculas de

señalización se lleve a cabo correctamente. De esa forma, los sistemas de transporte axonal mediados por la red de microtúbulos dependen completamente de Tau. Además, Tau es importante para la conservación de la arquitectura neuronal, una de las más asimétricas en comparación con otros tipos celulares (21).



**Figura 3. Pasos secuenciales en la formación de los NFTs (21).**

La estabilización de los microtúbulos por Tau se da a través de los dominios de unión a los microtúbulos. Estos dominios están compuestos de varias repeticiones de motivos conservados de unión a tubulina. Las repeticiones de unión a tubulina se unen a *pockets* en la tubulina que están localizados en la superficie interna del microtúbulo, y las superficies negativamente cargadas de los microtúbulos se unen fuertemente a las regiones ricas en prolina de Tau (21).

En la EA existe una hiperfosforilación de Tau, alterando la conformación y carga de la proteína afectando los dominios de unión a los microtúbulos, generando la separación de la proteína de los microtúbulos y promoviendo su autoagregación y oligomerización de la proteína. La hiperfosforilación de Tau en el C-terminal induce el autoensamblaje de la proteína llevando a la formación de filamentos helicoidales apareados (PHFs; *paired helical filaments*, por sus siglas en inglés). Estas proteínas Tau agregadas, eventualmente se convertirán en los ovillos neurofibrilares. La Tau agregada lleva a la

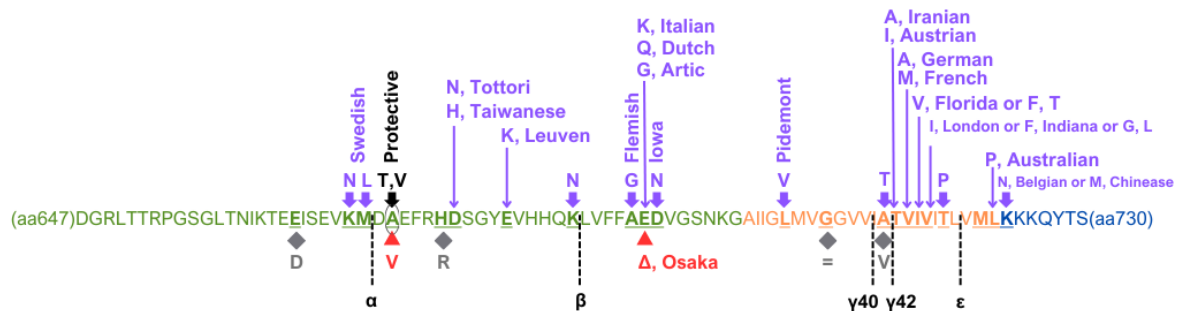
pérdida del transporte vesicular y también induce la desestabilización del microtúbulo. La hiperfosforilación de Tau es un evento que provoca la propagación de la disfunción de Tau. Estos efectos patológicos están asociados con el desarrollo y progresión de la EA (21). Los pasos secuenciales de la formación de los NFTs están representados en la [Figura 3](#).

### Enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF)

La EAF, representa al 85% de casos de EOAD y es causada por mutaciones en los genes de APP, PSEN1 o PSEN2. Hay alrededor de 330 mutaciones (duplicaciones y sin sentido) en estos genes, representando el 15-20% (APP), 70-80% (PSEN1) y <5% (PSEN2) de los casos. Las mutaciones en estos genes afectan la vía amiloidogénica, llevando a la generación y agregación incrementada del A $\beta$  (20).

### Mutaciones en APP

Hasta 2016, se habían reportado 52 mutaciones en APP en 119 probandos de familias autosómicas dominantes. La mayoría de las mutaciones en APP son no sinónimas y caen dentro o flanqueando la secuencia del A $\beta$ . Se han identificado duplicaciones genómicas que contienen al APP, deleciones de aminoácidos, así como mutaciones sin sentido recesivas. Las mutaciones sin sentido se reportan 4 veces más frecuentemente que las duplicaciones genómicas de APP en pacientes con EA. En contraste con las mutaciones sin sentido, que tiene una penetrancia casi completa de la enfermedad, las duplicaciones genómicas de APP muestran penetrancia reducida y mayor variabilidad de inicio de la enfermedad ([Figura 4](#)) (10). La mayoría de las mutaciones en APP resultan en niveles incrementados de agregación y producción del A $\beta$  (20).



**Figura 4. Las mutaciones en la proteína APP.**

Se presenta la secuencia de proteínas de APP del aminoácido 647 al 730. La secuencia verde representa el dominio extracelular, en naranja el dominio transmembrana y en azul el dominio intracelular. Las mutaciones patogénicas conocidas y su alias están reportadas en morado, las duplicaciones genéticas no

se representan. En rojo están las dos mutaciones patogénicas recesivas, en gris las mutaciones no patogénicas. Un círculo marca el residuo p.A673 porque el cambio de T se describe como protector para la EA, así como el cambio a V en el estado heterocigoto. El signo igual (=) marca una mutación silenciosa no patogénica en el residuo p.G708. El delta ( $\Delta$ ) indica una delección. Los sitios de corte para la  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -secretasa están marcados en líneas punteadas negras (10).

### **Mutaciones en PSEN.**

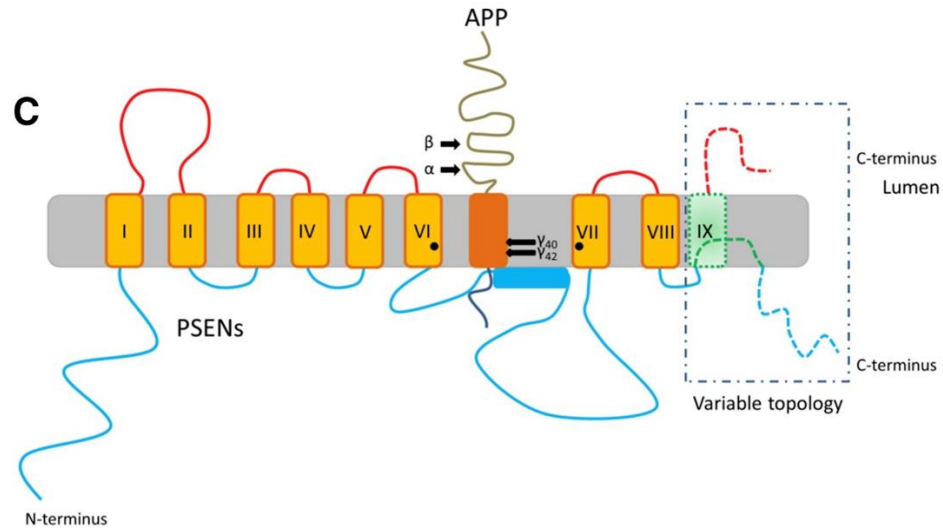
Las mutaciones en PSEN1 y PSEN2 ([Figura 5](#)) se encuentran ampliamente distribuidas en estos genes. PSEN1 es el gen más mutado dentro de la EAF, con 215 mutaciones reportadas, mientras que en PSEN2 solo se han identificado 31 mutaciones, 15 patogénicas y 16 con una naturaleza patogénica que no es clara. La mayoría de ellas son variantes sin sentido y las demás son delecciones/inserciones dentro del marco de lectura, así como una delección genómica específica de PSEN1, que genera un salto dentro del marco de lectura en el exón 9 (10,20).

Aunque PSEN1 y PSEN2 son altamente similares en términos de su secuencia genómica, estructura y funciones, las mutaciones en PSEN1 parecen ser más patogénicas que PSEN2. Las enfermedades relacionadas con PSEN1 parecen tener un inicio de la enfermedad en la tercera década, y tiene una penetrancia completa, con excepción de algunas mutaciones. Por otra parte, el inicio de síntomas asociados con mutaciones en PSEN2, muestran alta variabilidad y pueden ocurrir después de los 65 años (20). Las mutaciones en PSEN son comúnmente heredadas de manera autosómica dominante, pero las mutaciones *de novo* en PSEN1 han sido descritas en pacientes con EAF, con inicio de la enfermedad de hasta 28 años (10).









**Figura 5. Mutaciones en las proteínas PSEN y su estructura.**

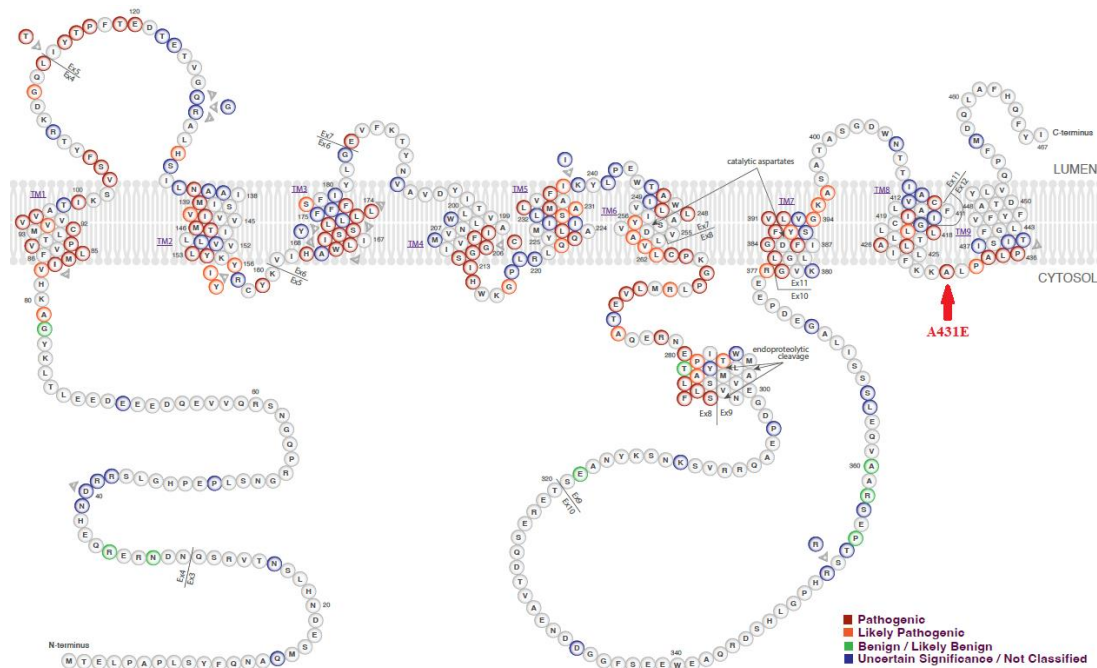
Secuencias de las proteínas (A) PSEN1 y (B) PSEN2. En azul están marcados los dominios citoplasmáticos, en amarillo los dominios transmembranales, en rojo los dominios extracelulares, y en verde el dominio intermembrana/transmembrana. Las mutaciones patogénicas o patogénicas predichas están en morado. En naranja están las mutaciones con patogenicidad no clara y en gris las mutaciones no patogénicas reportadas. Diferentes variantes de nucleótidos llevan a un mismo cambio de aminoácido, solo están reportadas una vez. El delta ( $\Delta$ ) indica deleciones. Un asterisco (\*) marca dos aspartatos (D), que son los aminoácidos catalíticos localizados en el dominio transmembrana VI (PSEN1 es D385 y PSEN2 es D366). Los números arábigos indican el último aminoácido de cada dominio topológico basado en la base Uniprot (PSEN1 P49768 y PSEN2 P49810). Representación esquemática del complejo APP y PSEN. Para PSEN se muestran las conformaciones alternativas predichas de la proteína. La región con topología variable está enmarcada en una línea punteada e incluye el dominio intermembrana con el C-terminal intracelular o un noveno dominio transmembrana con el C-terminal extracelular. Los puntos negros en los dominios transmembrana indican la localización catalítica del aspartato. APP se inserta entre los dominios transmembranales VI y VII de PSEN. Los dominios de corte para la  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -secretasas están indicados en el esquema (10).

### Mutaciones en Familias con Enfermedad de Alzheimer

En los años 30's se observó que los casos de EOAD podrían estarse agrupando dentro de familias, y dos décadas después se demostró que la enfermedad misma podría estar causada por una mutación autosómica dominante. Inicialmente se identificaron mutaciones en la APP, y posteriormente en los genes de las proteínas PSEN1 y PSEN2. Actualmente, más de 200 mutaciones se han descrito en estos genes, algunas representen polimorfismos no patogénicos, y en otros casos, la naturaleza patogénica de este cambio aun no es clara. Las mutaciones en PSEN1 representan la mayoría de los casos de EAF y, también tiene el mayor número de mutaciones reportadas, representando hasta el 0.5% de los casos de EA en general (Figura 6) (12).

Las características patológicas de la EA en los casos hereditarios y esporádicos son las placas de amiloide- $\beta$  extracelulares y los ovillos neurofibrilares de Tau

hiperfosforilada. Es ahora bien conocido que las mutaciones en los tres genes causantes de EAF resultan en la producción aumentada y/o deposición del A $\beta$  y los mecanismos por los que se logra esto son complejos y variables (12).



**Figura 6. Mutaciones familiares en PSEN1.**

Las mutaciones relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer Familiar se indican en rojo, mientras que las mutaciones no patogénicas se marcan en naranja, las que se reportan como benignas o posible benignas se encuentran en verde y de las que no se sabe su significancia se indican en azul. Se indican con flechas los residuos conservados D257 y D385 que forman el sitio catalítico putativo, y el sitio de corte endoproteolítico que separa PSEN1-NTF y -CTF en la séptima región hidrofóbica. El lugar de la mutación Jalisco se muestra señalada con una flecha roja (12).

La proteína APP es transmembranal y su función fisiológica no está totalmente descifrada, aunque parece jugar un papel importante en la plasticidad neural y en la regulación de la formación de sinapsis. APP puede ser escindida proteolíticamente por  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas y durante su metabolismo normal, puede sufrir escisión a través de vías alternativas. La escisión no amiloidogénica generada por la  $\alpha$ -secretasa impide la formación del A $\beta$ , ya que se escinde dentro del segmento de APP que, de otro modo, daría lugar a A $\beta$ . Tras la escisión por la  $\alpha$ -secretasa, la APP libera su dominio extracelular, un fragmento denominado APPs $\alpha$ , que tiene propiedades neurotróficas. Por otra parte, la APP puede sufrir un corte secuencial por la  $\beta$ - y la  $\gamma$ -secretasas. La escisión extracelular por la  $\beta$ -secretasa (también conocida como sitio  $\beta$  de la enzima de

escisión de APP) genera un fragmento extracelular soluble y es seguida por la escisión de APP dentro de su dominio transmembrana por la  $\gamma$ -secretasa (12).

La  $\gamma$ -secretasa puede escindir a la APP en distintos sitios, generando péptidos  $A\beta$  de 39-43 aminoácidos de longitud. La PSEN1 forma parte del complejo  $\gamma$ -secretasa, y la mayoría de las mutaciones patógenas de PSEN1 se localizan en las proximidades de los dominios transmembrana de esta proteína. En condiciones normales, la mayor parte del  $A\beta$  está constituida por el péptido de 40 aminoácidos,  $A\beta_{40}$ . Hay una cierta producción adicional de la fracción más larga,  $A\beta_{42}$ , que representa el 5-15% de la reserva total de  $A\beta$  y pueden observarse también cantidades menores de otras longitudes de  $A\beta$ . Los péptidos  $A\beta$ , en particular el  $A\beta_{42}$ , pueden causar efectos tóxicos en la función neuronal y sináptica, por sus propiedades de agregación y generación de oligómeros e iniciar la formación de precipitados extracelulares en forma de placas amiloides. El  $A\beta_{42}$  es la forma más amiloidogénica del péptido; su naturaleza hidrofóbica lo hace más susceptible al cambio conformacional que conduce a la fibrillogénesis amiloide. La mayoría de las mutaciones causantes de EAF parecen aumentar la biodisponibilidad del  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ , o alterar la proporción entre ambos. Sin embargo, el descubrimiento de la mutación "ártica" de APP (E693G) en una familia sueca, que se localiza lejos de los sitios de corte de la  $\beta$ -secretasa, llevó a sugerir un mecanismo patogénico alternativo. En realidad,  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  se encuentran en niveles disminuidos con esta mutación; sin embargo, tienen una mayor propensión a formar protofibrillas, lo que puede acelerar su deposición en localizaciones intracelulares o extracelulares, o en ambas (12).

### **Mutación Jalisco**

En 2006 se identificó una mutación (Ala431Glu) en el exón 12 de PSEN1, en pacientes con EA de inicio temprano (34-46 años). Los portadores de la enfermedad compartían el mismo microsatélite altamente polimórfico sugiriendo un posible ancestro común y por lo tanto un efecto fundador (22).

Esta mutación se encuentra en la región transmembranal 9 de la PSEN1, en la que el cambio de una alanina por un ácido glutámico altera las interacciones físicas y químicas de la proteína con otras moléculas celulares. Esta mutación es de penetrancia completa

y es una de las tres variantes con mayor número de individuos afectados en América Latina (23). La edad promedio en la que los síntomas comienzan a aparecer es a los 42.5 años, teniendo un desarrollo de la enfermedad de alrededor de 7.5 años, y edad de muerte media de 48.9 años (24).

Los síntomas para esta mutación son muy heterogéneos; sin embargo, el fenotipo característico de los pacientes es la paraparesis espástica. PSEN1(A341E) está asociada con anomalías generalizadas de la materia blanca que preceden a la paraparesis espástica. Además, se han identificado presentaciones motoras exclusivas, así como signos piramidales, mioclonías y convulsiones en casos en los que el inicio de los síntomas se presenta antes de la edad promedio de inicio de la enfermedad, siendo esto no muy común entre otras variantes de PSEN1 (23).

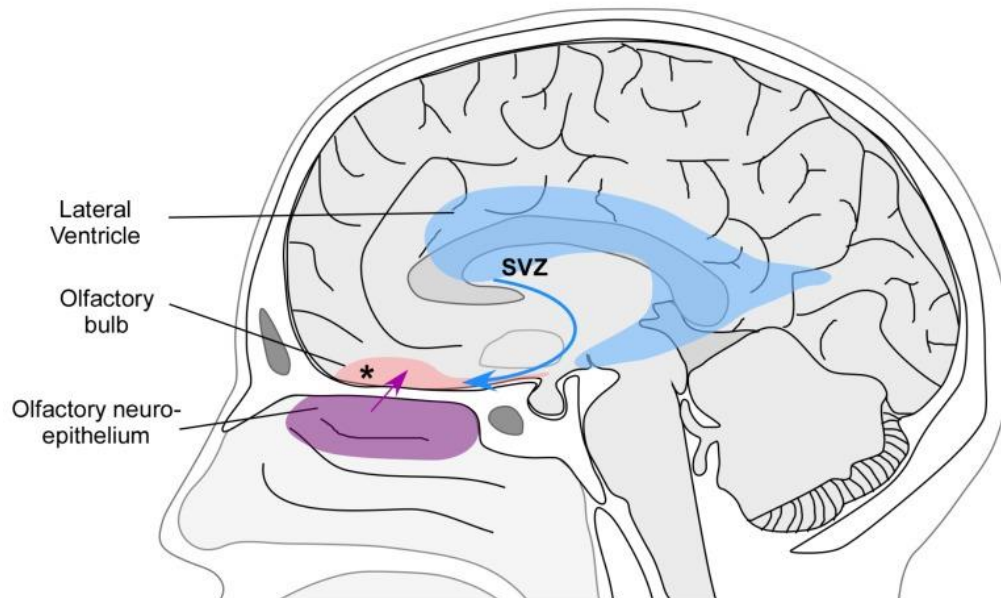
La caracterización neuropatológica del cerebro de un portador de la mutación Jalisco, PSEN1(A341E), mostró atrofia frontal severa, pérdida neuronal y gliosis de moderada a severa, y una predominancia de ovillos neurofibrilares seguidos de placas *cotton-wool*, con mayor acumulación de A $\beta$ 40 (23).

### **Plasticidad del bulbo olfatorio**

El bulbo olfatorio (OB) juega un papel muy importante en el procesamiento de la información olfatoria, y es la única conexión entre la periferia y el SNC. Su volumen varía con base a su función de sensibilidad olfatoria; se reduce en pacientes con enfermedades olfatorias, pero también puede incrementar durante la recuperación de la enfermedad olfatoria, denotando su plasticidad. Esta plasticidad podría estar dada por la particularidad de que el sistema olfatorio está en constante neurogénesis a lo largo de la vida. Los mecanismos principales por los que podría ocurrir esta neurogénesis son dos ([Figura 7](#)). El primero es la renovación continua de los receptores olfatorios neuronales (ORNs) de las células basales, a nivel del neuroepitelio olfatorio y la sinaptogénesis que ocurre entre los axones de los ORNs y las células mitrales a nivel glomerular (25).

El neuroepitelio olfatorio es una estructura clave para el censado del olor. Está compuesta de epitelio columnar pseudoestratificado localizado en el dominio externo de la mucosa olfatoria, localizada en la membrana basal (BM, *basement layer*) y la

lámina propia (LP). La [Figura 8](#), muestra el esquema de la localización de los componentes celulares y los marcadores moleculares de la mucosa olfatoria humana (26).



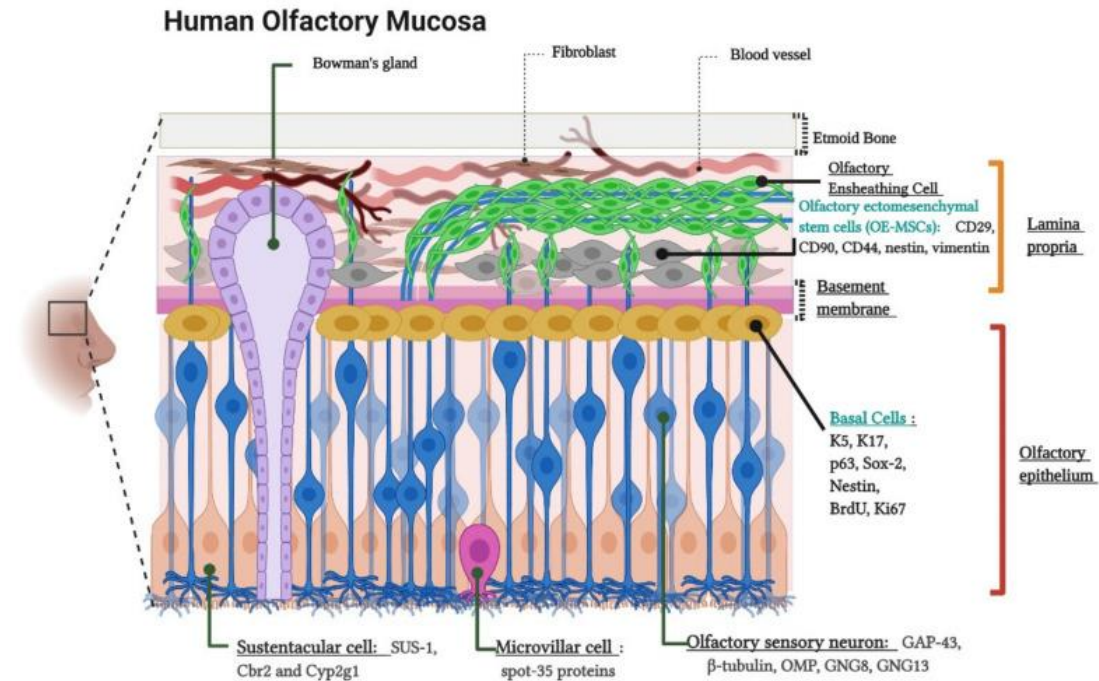
**Figura 7. Mecanismos de neurogénesis y plasticidad del bulbo olfatorio.**

Los mecanismos que han sido propuestos para explicar la plasticidad del sistema olfatorio son dos. El primero es la neurogénesis continua que ocurre a nivel del neuroepitelio olfatorio (morado). El segundo es la neurogénesis continua de la zona SVZ del ventrículo lateral. Un mecanismo adicional se refiere a la plasticidad intrínseca bulbar (\*).

El neuroepitelio olfatorio es una fuente de células troncales, que son capaces de autorrenovarse y generar precursores neurales a lo largo de toda la vida en los humanos. Estas células troncales incluyen a las células troncales neurales como células basales. Estas células son multipotentes y permiten el reemplazo continuo de células neurales y no neurales como Receptores de Neuronas Olfatorias (ORNs) y de células sustentaculares (de linaje astrocítico), respectivamente. Además, la LP contiene otra población menor de células troncales, que tiene la mayoría de las mínimas características de la mesénquima, y son denominadas células troncales ectomesenquimales (OE-MSCs) (26). Estas células troncales le permiten al neuroepitelio olfatorio ser reconstituido continuamente (25).

El segundo mecanismo por el que se podría explicar la plasticidad del OB es la neurogénesis continua de la zona subventricular (SVZ) en el ventrículo lateral (LV).

Las células que residen en las paredes del LV dan lugar a neuroblastos, que forman una red de vías interconectada a lo largo de SVZ que continúa en la vía rostral migratoria (RMS, *rostral migratory system*) y migran hacia el OB. Dentro del bulbo olfatorio las células se dispersan radialmente como células individuales diferenciándose a interneuronas (Figura 9) (25,27).



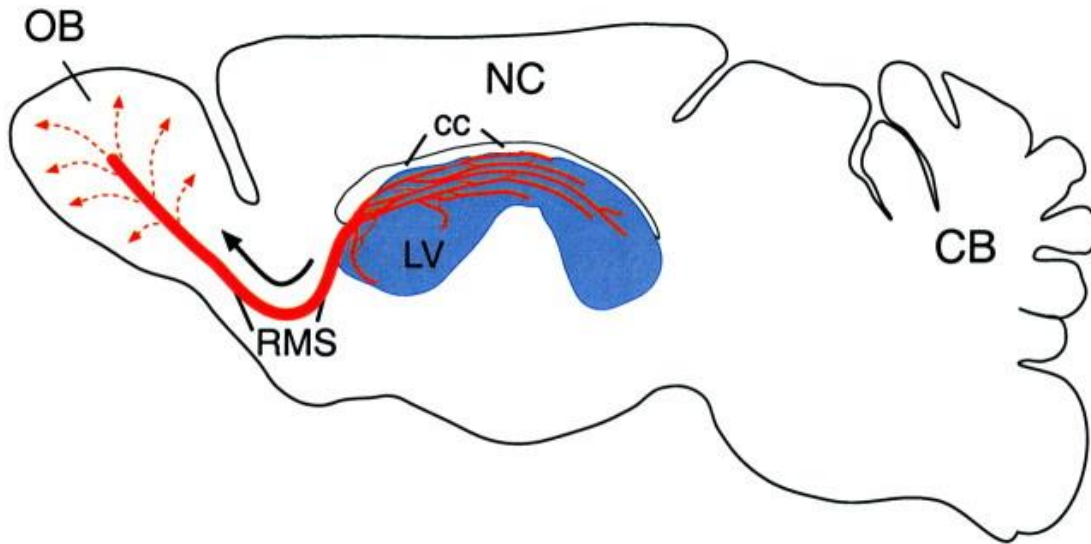
**Figura 8. Citoarquitectura de los componentes celulares de la mucosa olfatoria humana.**

Componentes de la lámina propia: Células olfativas envainadas (*Olfactory Ensheathing Cells*), Glándula de Bowman y Células Troncales Ecto-mesenquimales Olfatorias (OE-MSCs). Los componentes del epitelio olfatorio son: Células basales, Neuronas Olfatorias Sensoriales (OSNs) o Receptores de Neuronas Olfatorias (ORNs), Células sustentaculares y células microvillares. La figura enlista los marcadores para los diferentes tipos celulares. K5 (queratina 5), K17 (queratina 17), Sox-2 (Factor de Transcripción SRY-Box 2), GAP-43 (Proteína Asociada al Crecimiento 43), OMP (Proteína Marcadora Olfativa), GNG8 (Proteína de unión a Nucleótido de Guanina subunidad Gamma), GNG13 (Proteína G/I)/G(S)/G(O) subunidad Gamma-13 de unión a Nucleótido de Guanina), Cbr2 (Reductasa de carbonil 2), Cyp2g1 (Citocromo P450, familia 2, subfamilia G, polipéptido 1) (26).

Las células progenitoras neurales (NPC, *neural progenitor cells*) son células troncales multipotentes capaces de autorrenovarse y generar células neurales y de la glía. En el cerebro adulto, los NPCs están localizados principalmente en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales para luego migrar al bulbo olfatorio (BO) donde maduran a neuronas interlocales y en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (DG) del hipocampo, que constituyen las zona neurogénicas tradicionales (26, 27). Se



reportó que un quinto de los genes expresados en los bulbos olfatorios humanos tienen funciones del sistema nervioso o del desarrollo neuronal, apoyando la existencia de neurogénesis (25).



**Figura 9. El sistema SVZ-OB.**

Vista sagital del cerebro de un roedor con el OB a la izquierda y el cerebelo (CB) a la derecha. La SVZ está a lo largo de la pared lateral del ventrículo lateral (LV, azul). Las neuronas nuevas son constantemente producidas en la SVZ formando vías interconectadas que conectan con la vía rostral migratoria (RMS, *rostral migratory stream*) que las lleva al bulbo olfatorio. Dentro del bulbo olfatorio, las células se dispersan radialmente (líneas punteadas) como células individuales. NC, neocórtex; cc, cuerpo calloso (27).

### **Células troncales olfatorias ecto-mesenquimales (OE-MSCs)**

Las células mesenquimales (MSCs; *mesenchymal stem cells*) son células troncales multipotentes que se pueden diferenciar *in vitro* o *in vivo* a diferentes linajes celulares que incluyen adipocitos, osteoblastos y condrocitos. Las MSC han sido encontradas en múltiples tejidos, que incluyen el tejido adiposo, tendones, esqueleto, tejido muscular, hígado, placenta, saco amniótico, sangre menstrual entre muchos otros (29,30).

Las células troncales ecto-mesenquimales (OE-MSCs; *olfactory ecto-mesenchymal stem cells*, por sus siglas en inglés) son consideradas un subtipo de células mesenquimales con rasgos específicos asociados a su localización a tejido ectodérmico. Este tipo celular es residente de la lámina propia olfatoria, que es una capa gruesa de tejido conectivo que se origina de la mesénquima fronto-nasal, naciendo de la interacción entre la cresta neural craneal y las placodas olfatorias, por lo que este tejido

de células mesenquimales tiene también características ectodermales. Estas células han demostrado la capacidad de diferenciarse hacia tipos celulares del ectodermo y mesodermo. Además estas células que pertenecen al tejido nervioso, están involucradas en la neurogénesis permanente en la mucosa olfatoria durante toda la vida (29,31).

Se demostró con ensayos de formación de neuroesferas y la expresión de nestina en superficie que las OE-MSCs mantienen su troncalidad (*stemness*), y que además tienen la habilidad para diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y neuronas (29,32).

La señalización molecular entre el neuroepitelio y la lámina propia influencia el desarrollo de la vía olfatoria. En la adultez, se observa una migración de células de un compartimento a otro, especialmente durante una lesión inducida. Las OE-MSCs son capaces de cruzar la membrana basal para diferenciarse a neuronas, repoblando el epitelio olfatorio tras un extenso daño periférico. La sobreexpresión de transcritos que normalmente se expresan en células neurales confirman una inclinación de estas células hacia vías neurales. Además, tras el trasplante de estas células en ratones lesionados de hipocampo, estas pueden diferenciarse a neuronas, restaurar la potenciación a largo plazo e inducir la recuperación de la memoria (29).

Su localización y fácil acceso permite que haya una obtención no invasiva de estas células troncales, a partir del surco nasal de los pacientes, evitando así los problemas éticos del uso de células troncales embrionarias (29).

### **Obtención de los precursores neurales.**

El aislamiento de células neurales se ve restringido por razones éticas, por lo que el aislamiento y cultivo de especímenes de epitelio olfatorio representa una gran alternativa. El epitelio olfatorio mantiene la capacidad proliferativa y de diferenciación a neuronas sensoriales olfatorias especializadas durante la adultez; este epitelio pseudoestratificado prolifera continuamente para amplificar la población de precursores neurales induciendo la generación de neuronas inmaduras y de neuronas sensoriales olfativas (33).

A pesar de que se han desarrollado distintos métodos para aislar células del epitelio olfatorio, estos presentan problemas relacionadas con el deterioro, por la toma de muestra postmortem, el tamaño de la muestra y la toma de la biopsia bajo anestesia.



Benitez King y colaboradores desarrollaron un método no invasivo para la obtención de precursores neurales mediante la exfoliación de la cavidad nasal de pacientes de manera ambulatoria (33).

El epitelio está localizado en la cavidad nasal en el plato cribiforme, en las región media y superior de los cornetes, de tal manera que las células son exfoliadas de la región anterior de la corneta media lateral usando un cepillo especial (2.4 cm en longitud y 1-3 mm en diámetro) a través de movimientos circulares para exfoliar células de la pared lateral de la cavidad nasal y el septum. Estas células son disociadas mecánicamente del cepillo y posteriormente cultivadas en medio DMEM/F-12 suplementado con suero fetal bovino 10%, 4 mM de l-glutamina y antibiótico (100 µg/mL de estreptomicina, 100 IU/mL de penicilina) (33). El uso de este medio aumenta el crecimiento de células del linaje ecto-mesenquimal y restringe la proliferación celular de células epiteliales (34).

El cultivo de estas células del surco nasal permite la proliferación de células mesenquimales con linaje neural expresando tubulina-III, un marcador que ayuda a identificar neuronas madura e inmaduras. También expresan vimentina que es una proteína de los filamentos intermedios, que solo la expresan neuronas olfatorias maduras, además expresan nestina un marcador de precursores neurales (33).

### **miRNAs**

Desde su descubrimiento en 1993, los microRNAs (miRNAs) han revolucionado el campo de la biología molecular. Se encuentran presentes en todos los organismos y algunos han mostrado estar altamente conservados entre especies. Cada vez más miRNAs se descubren y su papel en la regulación de genes está bien caracterizada (35).

Los miRNAs son RNAs no codificantes pequeños, con un tamaño promedio de 22 nucleótidos. La mayoría son transcritos a partir de secuencias de DNA como miRNAs primarios (pri-miRNAs), que luego son procesados a precursores de miRNAs (pre-miRNAs) y finalmente a miRNAs maduros. En la mayoría de los casos, los miRNAs interactúan con la región 3' UTR del mRNA blanco para suprimir su expresión. Sin embargo, se ha reportado la interacción de los miRNAs con otras regiones, incluyendo la región 5' UTR, la secuencia codificante y la región promotora. También se ha

sugerido que los miRNAs están localizados en diferentes compartimentos celulares para controlar la tasa de traducción y transcripción de los genes (35).

Los miRNAs son una pieza clave en el desarrollo normal de un organismo y están involucrados en una variedad de procesos biológicos, por lo que su expresión aberrante se ha asociado con diferentes patologías. Los miRNAs son secretados en fluidos extracelulares, y estos han sido reportados extensamente como posibles biomarcadores para una variedad de enfermedades y también sirven como moléculas de señalización que median la comunicación célula-célula (35).

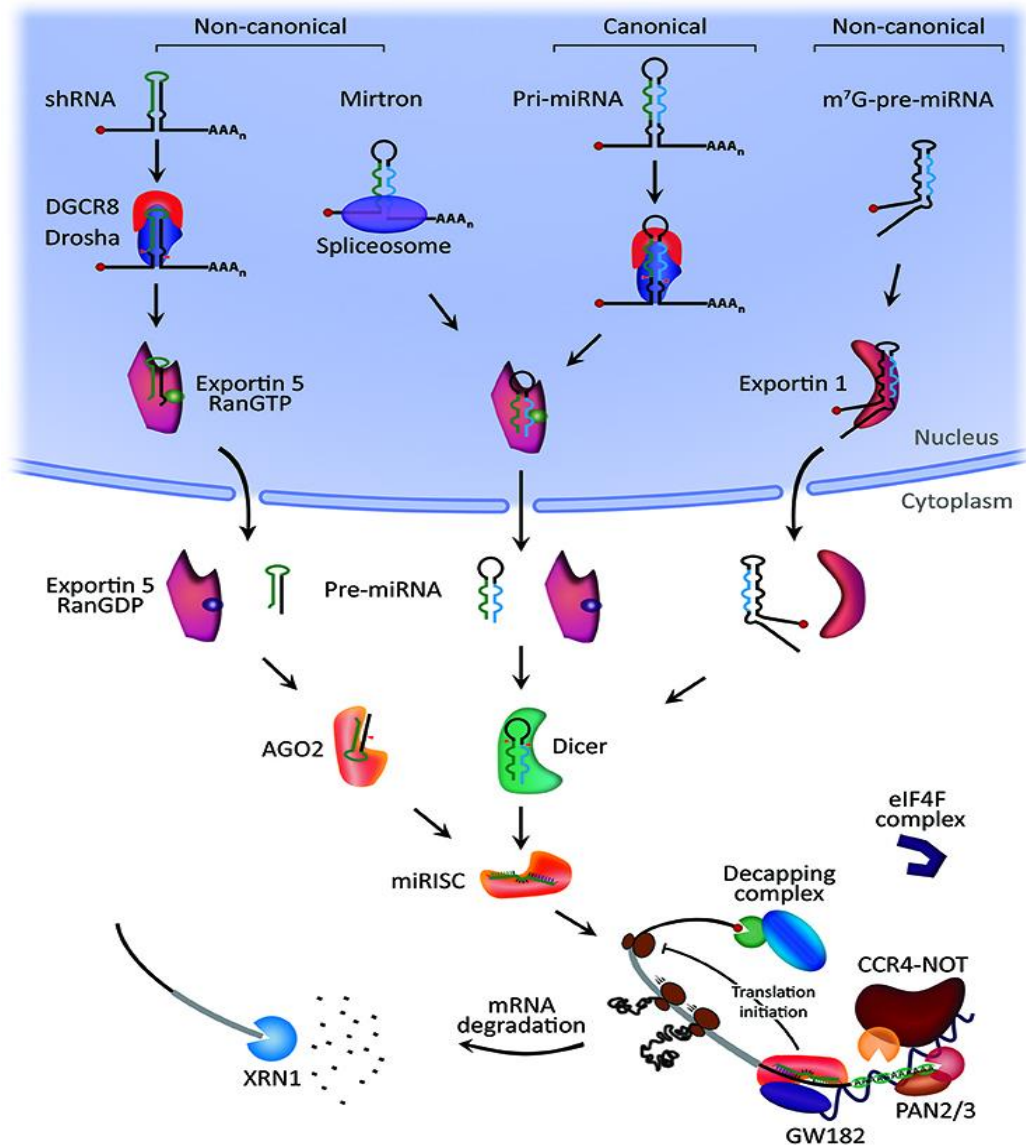
### **Biogénesis de los miRNAs**

La biogénesis de los miRNAs, empieza con el procesamiento de los transcritos de la RNA polimerasa II/III post o co-transcripcionalmente. Cerca de la mitad de los miRNAs que han sido identificados son intragénicos y se procesan en su mayoría a partir de intrones, y son pocos los que provienen de los exones de genes codificantes para proteínas. Los demás son intergénicos, los cuales se transcriben independiente de algún gen y son regulados por sus propios promotores. Algunas veces los miRNAs son transcritos como un solo transcrito largo llamado *cluster*, que podría tener regiones semilla similares. Las vías de biogénesis de los miRNAs se clasifican en canónicas y no canónicas ([Figura 10](#)) (35).

### **La vía canónica de biogénesis de los miRNAs**

La vía canónica de la biogénesis de los miRNAs, es la vía dominante. En ésta, los pri-miRNAs son transcritos de sus genes y luego procesados en pre-miRNAs por el complejo microprocesador, que consiste en una proteína de unión a RNA Región Crítica 8 del Síndrome DiGeorge (DGCR; *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*), y una enzima ribonucleasa II, Drosha. DGCR8 reconoce una secuencia GGAC N6-metiladenilada y otros motivos dentro del pri-miRNA, mientras que Drosha corta el dúplex del pri-miRNA en la base de la horquilla del pri-miRNA. Esto resulta en la formación de una región de 2 nt que sobresale en el 3' del pre-miRNA. Cuando los pre-miRNA son generados, estos son exportados al citoplasma por el complejo de Exportina 5 (XPO5)/RanGTP y después son procesados por la RNasa III endonucleasa Dicer. Este proceso involucra la remoción del bucle terminal, resultando en la maduración del dúplex de miRNA. La direccionalidad de la cadena del miRNA

determina el nombre de la forma madura del miRNA. La cadena 5p surge del extremo 5' de la horquilla pre-miRNA, mientras que la cadena 3p se origina del extremo 3'.



**Figura 10. Biogénesis de miRNA y mecanismo de acción.**

La biogénesis canónica de los miRNAs comienza con la generación del transcrito pri-miRNA. El complejo microprocesador, compuesto por Drosha y la Región Crítica 8 del Síndrome de DiGeorge (DGCR8), escinde el pri-miRNA para producir el precursor-miRNA (pre-miRNA). El pre-miRNA se exporta al citoplasma de forma dependiente de Exportina5/RanGTP y se procesa para producir el dúplex de miRNA maduro. Finalmente, las hebras 5p o 3p del dúplex del miRNA maduro se cargan en la familia de proteínas Argonauta (AGO) para formar un complejo de silenciamiento inducido por el miRNA (miRISC). En las vías no canónicas, los RNA *short hairpin* (shRNA) son inicialmente escindidos por el complejo microprocesador y exportados al citoplasma a través de Exportina5/RanGTP. A continuación, se procesan mediante un corte dependiente de AGO2, pero independiente de Dicer. Los mirtrons y los pre-miRNA de 7-metilguanina (m7G) dependen de Dicer para completar su maduración citoplasmática, pero difieren en su transporte nucleocitoplasmático. Los mirtrons se exportan a través de Exportin5/RanGTP, mientras que los m7G-pre-miRNA se exportan a través de Exportin1. Todas las vías conducen en última instancia a un complejo miRISC funcional. En la mayoría de los casos, miRISC se

une a los mRNA blanco para inducir la inhibición de la traducción, muy probablemente interfiriendo con el complejo eIF4F. A continuación, las proteínas de la familia GW182 unidas a Argonata reclutan a las poli(A)-desadenilasas PAN2/3 y CCR4-NOT. PAN2/3 inicia la desadenilación, mientras que el complejo CCR4-NOT completa el proceso, lo que conduce a la eliminación de la tapa m7G en el mRNA diana por el complejo de descifrado. A continuación, el mRNA descapuchado puede sufrir una degradación 5'-3' a través de la exo-ribonucleasa XRN1 (35).

Ambas cadenas se derivan del dúplex maduro del miRNA y pueden ser cargadas en la familia de proteínas Argonata (AGO) de manera dependiente de ATP. La selección de la cadena 5p o 3p está basada, en parte, por la estabilidad termodinámica en los extremos 5' del dúplex del miRNA o en el extremo 5' posición 1 de un Uracilo (U). Generalmente la cadena con la menor estabilidad en el 5' o con un uracilo en el 5' es preferencialmente cargada en AGO, y se considera la cadena guía. La cadena no cargada se llama cadena pasajera, y esta será desenrollada de la cadena guía a través de varios mecanismos basados en el grado de complementariedad. Las cadenas pasajeras del miRNA que no contienen errores (*mismatches*), son cortadas por AGO2 y degradadas por la maquinaria celular. Por otro lado, los dúplex de miRNAs con errores centrales, no son cargados por AGO2 y son pasivamente desenrollados y degradados (35).

### **Biogénesis no canónica de miRNAs**

Hasta la fecha se han elucidado distintas vías no canónicas de procesamiento de los miRNAs. Estas vías, usan diferentes combinaciones de proteínas involucradas en la vía canónica, principalmente Drosha, Dicer, Exportina 5 y AGO2. En general, las vías no canónicas pueden ser divididas en vías independientes de Drosha/DGCR8 e independientes de Dicer. Los pre-miRNAs producidos por la vía independiente de Drosha/DGCR8, se parecen a los sustratos de Dicer. Un ejemplo de esto, son los mirtrons, que son producidos de los intrones de los mRNAs durante el *splicing*, o los pre-miRNAs con capucha de 7-metilguanósina. Por otra parte, los miRNAs procesados independientemente de Dicer, se obtienen de transcritos de RNA *short hairpin* endógenos. Estos pre-miRNAs requieren de AGO2 para completar su maduración dentro del citoplasma, ya que no tienen la longitud suficiente para ser sustratos de Dicer. Esto promueve que se cargue el pre-miRNA completo en AGO2 y entonces se realice el corte dependiente de AGO2 de la cadena 3p. El corte 3'-5' de la cadena 5p, completa su maduración (35).

### **Mecanismos de regulación de los miRNAs**

Los miRNAs se unen específicamente a una secuencia en el 3' UTR de su mRNA blanco para inducir la represión traduccional, y la desadenilación y descapuchamiento del mRNA. Se ha reportado que los sitios de unión también incluyen al extremo 5' UTR, la secuencia codificante, y también a la región promotora. La unión del miRNA en las regiones 5' UTR y la secuencia codificante silencia la expresión de los genes, mientras que la interacción en la región promotora induce la transcripción (35).

### **Silenciamiento mediado por el miRISC**

El complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC) mínimo, consiste en la guía líder y AGO. La especificidad del miRISC, está dada por la interacción con las secuencias complementarias del mRNA blanco, llamados elementos de respuesta a miRNA (MREs, miRNA Responds Element). El grado de complementariedad del MRE determina si el silenciamiento del mRNA será dependiente de AGO2 o por inhibición traduccional mediada por miRISC y el decaimiento del mRNA blanco. Una complementariedad completa del miRNA:MRE, induce la actividad endonucleasa de AGO2 y rompe el mRNA blanco. Sin embargo, esta interacción desestabiliza la asociación entre AGO y el extremo 3' del miRNA promoviendo su degradación. Si la interacción de miRNA:MRE no es completamente complementaria y hay *mismatches* centrales entre el miRNA guía y el mRNA, se previene la actividad endonucleasa de AGO2. En este caso, AGO2 actúa como un mediador de interferencia de RNA, parecido a los miembros endonucleolíticos de la familia AGO (AGO1, 3 y 4 en humanos). En muchos casos ocurren interacciones miRNA:MRE vía la región semilla en el 5' (nucleótidos 2-8). El emparejamiento del extremo 3' ayuda en la estabilidad y especificidades de la interacción miRNA-blanco (35).

La formación del complejo de silenciamiento RISC empieza con el reclutamiento de la familia de proteínas GW182 por el miRISC. GW182 provee el andamiaje necesario para reclutar otras proteínas efectoras, como los complejos de poli(A)-desadenilasas PAN2-PAN3 y CCR4-NOT, siguiendo la interacción del miRNA:mRNA blanco. La poli(a)-desadenilación del mRNA blanco es iniciada por PAN2/3 y completada por el complejo CCR4-NOT. El descapuchamiento es facilitado por la proteína de

descapuchamiento 2 (DCP2) y proteínas asociadas, seguido de la degradación 5'-3' por la exoribonucleasa 1 (XNR1) (35).

### **Activación de la traducción mediada por miRNAs**

Aunque la mayoría de los estudios están enfocados en estudiar como los miRNAs inhiben la expresión de sus genes, también existen reportes de sobre expresión de la traducción por los miRNAs. Esta activación de la traducción involucra a AGO2 y FXR1 (Fragile-x-mental Retardation Related Protein 1) en lugar de GW182 unidos al 3' UTR. También la activación de la traducción involucra la unión al 5' UTR de los mRNAs de las proteínas ribosomales; sin embargo, se ha visto que la sobrerregulación de la expresión de los genes mediada por miRNAs ocurre bajo condiciones específicas (35).

### **Señalización intercelular**

A pesar de que los miRNA se encuentran dentro de la célula, hay una gran cantidad de estos que migran hacia afuera y pueden ser encontrados en los fluidos corporales. Estos se conocen como miRNAs circulantes, y se encuentran en sangre, orina, saliva, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, leche materna y en otros fluidos tras daño de tejido, apoptosis y necrosis (36).

Estos miRNAs circulantes juegan un papel en la comunicación entre células, y se apoya por el hecho de que estos miRNAs pueden ser exportados e importados en las células a través de mecanismos que involucran el tráfico vesicular y proteínas acarreadoras; además de estar presente en fluidos del cuerpo anteriormente mencionados. El transporte extracelular de miRNAs ocurre a través de dos vías: a) transporte activo por Vesículas Extracelulares (EV; *extracelullar vesicles*) y b) como parte de complejos de proteínas (37).

### **Transporte de miRNAs vía EV**

Las EV son vesículas unidas por lípidos secretadas por las células en el espacio extracelular. Los tres tipos principales de EV son microvesículas (MVs), exosomas y cuerpos apoptóticos, que se diferencian de acuerdo con su biogénesis, vías de liberación, tamaño, contenido y función. Las EVs pueden llevar dentro de ellos lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, específicamente asociadas con la membrana plasmática, citosol y aquellas involucradas en el metabolismo de lípidos ([Figura 11](#)) (38).

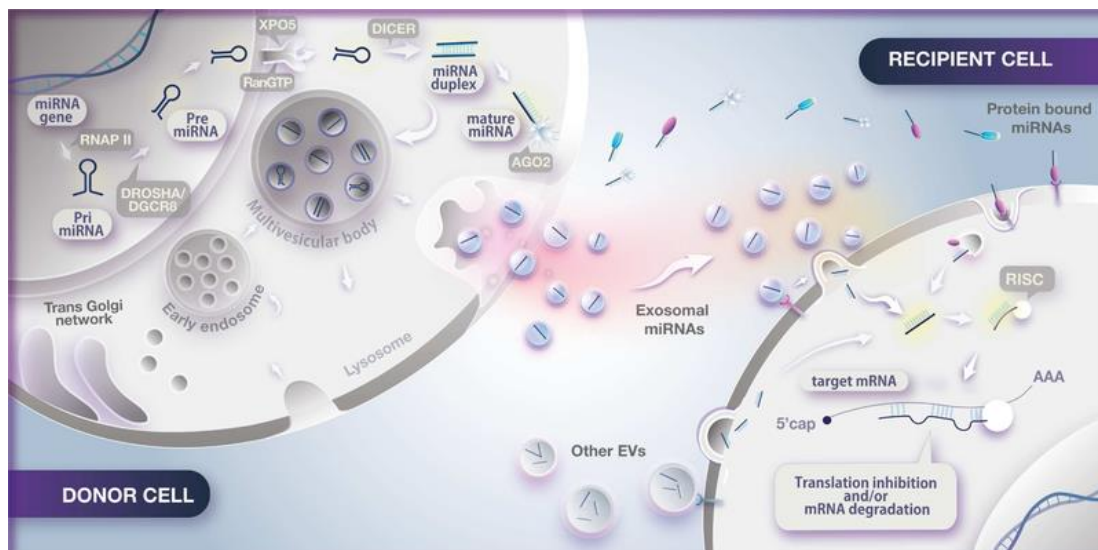
En general, las EVs más pequeñas (40-200 nm), denominados exosomas, se generan por la invaginación de la membrana de la vía endosomal. Primero, la gemación hacia el interior de la membrana plasmática lleva a la generación de una endosoma. Se pueden generar pequeñas vesículas por posteriores gemaciones hacia el interior de la membrana del endosoma, generando un Cuerpo Multivesicular (MVB, *multivesicular body*). Durante este proceso los contenidos citosólicos, así como proteínas transmembrana y periféricas son incorporada a la membrana que se invaginó. Posteriormente los MVBs podrían fusionarse con el lisosoma, llevando a la degradación de los contenidos vesiculares. Alternativamente, los MVBs podrían fusionarse con la membrana plasmática de la célula, liberando vesículas en el espacio extracelular de manera exocítica. Por otra parte están las EVs más grandes (200-2000 nm) se forman por evaginaciones (gemación externa) de la membrana plasmática (39). La composición de los exosomas es variada, y puede diferir considerablemente de tejido a tejido y variar de acuerdo con el estado metabólico de la célula (37).

Una vez que las EVs son incorporadas por la célula blanco, estas EVs pueden activar vías de señalamiento intracelular, liberar su contenido en la célula blanco, por fusión de membranas o entrar a la célula por la vía de fagocitosis, macropinocitosis, o endocitosis mediada por receptor. Una vez internalizada la EV, esta libera sus moléculas en el citoplasma, donde podrían ser llevadas a lisosomas y destruidas o llevada a locaciones específicas en la células donde podrían llevar a cabo una función específica (37).

### **Transporte de miRNA vía los complejos proteína-miRNA**

Los complejos que permiten el transporte de los miRNAs en la sangre también pueden entrar a las células y entregar miRNAs que promueven la inhibición de los mRNAs blancos. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL) pueden transportar miRNAs en la circulación sanguínea. Cuando los miRNAs se asocian con lipoproteínas, los cambios en el estado nutricional y el estado metabólico, como la hipercolesterolemia, podrían alterar la abundancia relativa de los complejos de miRNAs específicos (37). Algunos estudios han demostrado que cerca del 10% de los miRNAs circulantes son secretados por exosomas, mientras que el otro 90% forma complejos con proteínas como AGO2, NPM 1 y HDL, lo que les permite empaquetarse

para prevenir su degradación por RNasas que se encuentran en los fluidos corporales (36).



**Figura 11. Comunicación intercelular vía miRNAs.**

RNAP II, RNA polymerase II. RISC, RNA-induced silencing complex. EVs, extracellular vesicles (37).

Los perfiles de miRNAs unidos a HDL difieren de aquellos encontrados en las EVs, lo que indica que las dos vías son complementarias y son mecanismos independientes en el transporte de los miRNAs (37).

### **Potenciales biomarcadores de las enfermedades.**

Los biomarcadores se definen como moléculas indicadoras de estado de salud o de enfermedad de un individuo. Un biomarcador ideal debe cumplir con ciertas características: 1) debe ser accesible, lo que significa que necesita ser descubierto y medido a través de procedimiento mínimamente invasivos; 2) debe ser específico para la patología investigada; 3) debe tener sensibilidad (su presencia debería ser detectada preferentemente antes de que los síntomas clínicos aparezcan y deben variar de acuerdo a la progresión de la enfermedad o en respuesta a un tratamiento), y 4) debe ser transferido de la investigación científica a la práctica clínica (36).

Los miRNAs fueron descritos como posibles biomarcadores desde 2008 cuando Lawrie et al., los utilizaron para la evaluar el linfoma de linfocitos B difuso y grande, en el suero de pacientes, y desde ese momento su potencial uso como biomarcadores ha sido extensamente descrito. Se han reportado como posibles biomarcadores en distintas enfermedades, como el cáncer, a través de los exosomas en la comunicación



extracelular, en neurología para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, en pacientes con lesión de la médula espinal, epilepsia, dolencias neurodegenerativas, también en otros campos como la cardiología para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares agudas o insuficiencia cardiaca, y en el caso de enfermedades infecciosas para el diagnóstico de sepsis (36).

Los miRNAs cumplen las características de un biomarcador ideal, ya que pueden ser fácilmente extraídos a través de biopsias líquidas de sangre, orina y otros fluidos corporales. También tienen una alta especificidad para el tejido o tipo celular del que provenga; y es sensible en el sentido de que varía de acuerdo con el estadio y la progresión de la enfermedad, y ha permitido incluso diferenciar diferentes etapas del cáncer y la respuesta a una terapia (36).

Las tecnologías para la detección de ácidos nucleicos ya existen y el desarrollo de nuevos ensayos requiere menor tiempo y menores costos en comparación a la producción de otras moléculas como nuevos anticuerpos específicos para identificar a los otras moléculas asociadas con la enfermedad (36).

### **Biomarcadores en Alzheimer**

Actualmente, no existe ningún fármaco que pueda detener el desarrollo y progresión de la EA, lo más avanzado, son anticuerpos que deben aplicarse en etapas muy tempranas y sólo retrasan un poco el deterioro cognitivo, por lo que el tratamiento se enfoca únicamente en los síntomas. Una posible razón para la falta de efectividad en las pruebas clínicas es el avance de la enfermedad al momento de la intervención farmacológica. Se hipotetiza que, a cierto umbral de la neuropatología, los tratamientos ya no pueden afectar el desarrollo de la enfermedad, y debido a que los procesos patológicos inician mucho antes que el inicio de los síntomas y las opciones de tratamiento disponibles son limitadas, el uso y desarrollo de nuevos biomarcadores que puedan identificar pacientes con declive cognitivo leve y en etapas tempranas de la EA es indispensable para lograr un efecto robusto en las terapias modificadoras de la enfermedad (40,41).

Uno de los aspectos más importantes para detectar el desarrollo de la EA, es cuán accesible e invasiva es la prueba diagnóstica. Los métodos actuales están basados en la

tomografía por emisión de positrones (PET) y el análisis de proteínas en líquido cefalorraquídeo (CSF) que son altamente invasivos y relativamente caros. Así que se están haciendo esfuerzos por buscar biomarcadores favorables y mínimamente invasivos, asociados con la EA, basados en distintas fuentes como sangre, saliva, fluidos oculares y fluidos olfatorios (40).

La identificación de biomarcadores para la EA es un área de investigación de gran relevancia y se están explorando distintas aproximaciones. Una de ellas es rastrear el desarrollo de la EA antes del inicio de los síntomas, usando marcadores basados en plasma, como la detección del A $\beta$ , de la proteína Tau o los neurofilamentos (NFL). Hay mucha investigación centrándose en el desarrollo de métodos que permitan identificar niveles de amiloide- $\beta$  (A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42) y fosfo-Tau (p-Tau) en líquido cefalorraquídeo (CSF) y en suero, pero la investigación no se limita a estas proteínas. Por otro lado, se está estudiando a otro potencial biomarcador, la neurogranina, una proteína postsináptica de unión a la calmodulina que influencia la potenciación sináptica a largo plazo (LTP). En un estudio reciente, se compararon los niveles de neurogranina en pacientes sin deterioro cognitivo contra pacientes con deterioro cognitivo leve a lo largo de ocho años, observándose un incremento en la expresión de neurogranina en regiones afectadas del cerebro por la EA. El estudio demostró un aumento específico y significativo de neurogranina en el CSF de pacientes con EA, ya que esto no sucedía en otras enfermedades neurodegenerativas (41).

Otro biomarcador asociado a la EA es la proteína de citoesqueleto, la proteína ligera del neurofilamento (NFL, *neurofilament light protein*). Los niveles de NFL han permitido correlacionar el declive cognitivo y puede ser medido tanto en el suero de los pacientes, como en el CSF. Además, la NFL puede distinguir entre las formas familiares y esporádicas de la EA. Sin embargo, su mayor limitación es que los niveles de esta proteína, también incrementan con otras enfermedades neurodegenerativas (41).

Otra gran parte de la investigación en la EA ha sido estudiar el potencial papel de los miRNAs asociados con el desarrollo de la enfermedad y su uso como marcadores en el diagnóstico, ya que se ha demostrado que los miRNAs juegan un papel importante en

los procesos patológicos asociados con la EA, incluyendo la fosforilación de la proteína Tau, el procesamiento de la APP, la formación del A $\beta$ , la regulación de los astrocitos, la microglía, el sistema cerebrovascular y las anomalías sinápticas asociadas con las proteínas Tau y A $\beta$ . Además, se ha visto que los niveles de algunos miRNAs específicos pueden diferenciar entre las distintas etapas de la enfermedad y por lo tanto podrían ser usados como biomarcadores en el diagnóstico de la EA (41).

Se han identificado distintos marcadores basados en miRNAs, mostrando precisión, sensibilidad, especificidad y costo-efectividad favorable. La [Tabla I](#) muestra un resumen de los distintos miRNAs que han sido propuestos como biomarcadores de la EA. Además, se ha propuesto que estos miRNAs podrían estar involucrados en la patogénesis de la EA y podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico temprano de la EA (42).

**Tabla I. Lista de los miRNAs reportados para la EA.**

Fuente	miRNA	Expresión	Método	Referencia
Suero	miR-135a, miR-384	↑	RT-qPCR	(43)
	miR-9, miR-137, miR-181c, miR-29a, miR-29b	↓	RT-qPCR	(44)
	miR-193b	↓	RT-qPCR	(43)
	miR-223-3p	↓	RT-qPCR	(45)
Plasma	miR-486-5p, miR-483-5p	↑	RT-qPCR	(46)
	miR-15b-5p, miR-191-5p, miR-545-3p, miR-142-3p, let-7g-5p, miR-301a-3p, let-7d-5p	↓	RT-qPCR, Nanostring	(47)
	miR-146a, miR-34a	↓	RT-qPCR	(48)
Sangre	miR-181b, miR-34a	↑	RT-qPCR	(49)
Sangre periférica	let-7d-3p, miR-112, miR-26a-5p, miR-5010-3p, miR-151a-3p, miR-1285-5p, miR-161	↑	Microarreglo, RT-qPCR	(50)
	miR-128	↑	NGS, RT-qPCR	(51)

	miR-532-5p, let-7f-5p, miR-26b-5p, miR-107, miR-103a-3p	↓	RT-qPCR	(50)
CSF	let-7b	↑	NGS, RT- qPCR	(52)
	miR-9, miR-155, miR- 146a, miR-125b	↑	TaqMan assay, RT-qPCR	(53)
	miR-29b, miR-29a	↑	Microarreglo, Análisis de Northern dot blot, RT-qPCR	(48)
	miR-21-5p	↑	RT-qPCR	(54)
	miR-448, let-7f, miR- 526a, miR-105, miR- 520a, miR-518f, miR- 374, miR-380-3p, miR- 125a, miR-518b, miR- 371, miR-135a, miR- 517b, miR-138, miR- 141, miR-151, miR- 30c, miR-517, miR- 186, miR-362, miR- 501, miR-191, miR- 197, miR-494, miR- 204, miR-205, miR- 449, miR-216, miR- 375, miR-429, miR- 302b, miR-30a-5p, miR-30a-3p, miR-30b, miR-32, miR-345, miR- 30	↑	RT-qPCR	(55)
	miR-34a, miR-125b, miR-146a	↓	RT-qPCR	(48)
	miR-154, miR-15b, miR-214, miR-10a, miR-99a, miR-10b, miR-181a, miR-497, miR-195, miR-125, miR-455, miR-221, miR-126, miR-328b,	↓	RT-qPCR	(55)

	miR-146b, miR-199a, miR-451, miR-127, miR-194, miR-422, miR-195, miR-142-5p, miR-181c, miR-14			
	miR-9, miR-101	↓	Secuenciación Illumina TruSeq Small RNA	(56)
Exomas de CSF	miR-125b-5p	↑	Microarreglos, RT-qPCR	(57)
	miR-331-5p, miR-29c, miR-485-5p, miR-136- 3p, miR-132-5p, miR- 16-2	↓	TaqMan assay, RT-qPCR	(58)
	miR-16-5p, miR-451a, miR-605-5p	↓	Microarreglo, RT-qPCR	(57)
Cerebro	miR-9, miR-125, miR- 132, miR-128	↑	Microarreglo, Northern Analysis	(59)
	miR-146a	↑	Microarreglo, Northern Analysis	(60)
	miR-146a	↑	DNA Array	(61)
	miR-9, miR-146a, miR- 125b	↑	Microarreglo, Northern Analysis	(62)
	miR-125, miR-26 <sup>a</sup> , miR-423, miR-27b, miR-422a, miR-30e-5p, miR-381, miR-34 <sup>a</sup> , miR-92, miR-145, miR- 200c	↑	RT-qPCR	(63)
	miR-146a	↑	Microarreglo, Northern blot	(62)
	miR-107	↓	Microarreglo, Northern Blotting	(64)
	miR-212, miR-9, miR- 146b, miR-132	↓	RT-qPCR	(63)

	miR-298, miR-328	↓	Northern Blotting	(65)
	miR-29a	↓	Microarreglo, RT-qPCR	(66)
	miR-29a-1, miR-29b-1, miR-363, miR-181c, miR-106b, miR-15a, miR-101, miR-93, miR-9, miR-19b, miR-22, miR-26b, miR-210, let-7i	↓	Microarreglo, Northern blot, RT-qPCR	(67)
	miR-9, miR-132, miR-98, miR-212, miR-146b, miR-425, miR-30c	↓	RT-qPCR	(63)
	miR-106b	↓	Northern Blotting, qPCR	(64)
	miR-15a	↓	qPCR	(67)
	miR-485-5p	↓	qPCR	(68)
	miR-124	↓	qPCR	(69)
Cortex	miR-424	↑	LNA-microarrays, Northern blot analysis	(70)
	miR-137, miR-9, miR-39b, miR-29a, miR-181c	↓	RT-qPCR	(71)
	miR-212	↓	LNA-microarrays, Northern blot analysis	(70)

Recuperada de (42). Upregulated: ↑; Downregulated: ↓; NGS: *Next Generation Sequencing*

### **La rata como modelo de estudio en la Enfermedad de Alzheimer.**

Desde hace más de 180 años, la rata se convirtió en la primera especie mamífera en ser domesticada para la investigación científica, desde entonces ha sido uno de los organismos modelo más estudiado. La rata ha sido el organismo de elección para la mayoría de la investigación fisiológica y conductual de las últimas décadas. Los científicos que estudian el comportamiento la prefieren, porque es un aprendiz muy

inteligente y rápido, y los fisiólogos toman ventaja del hecho de que los procesos fisiológicos son similares entre la rata y los humanos. Además, las ratas son suficientemente grandes para realizar una gran variedad de determinaciones fisiológicas (72).

Una de las características críticas en los modelos animales de la EA es la habilidad para analizar la memoria y la cognición en pruebas de comportamiento. Las diferencias entre el comportamiento de ratas y ratones son muy grandes, en este sentido. Comparado a la rata, el ratón exhibe un comportamiento más simple y con menos flexibilidad en manejar situaciones nuevas y complejas. Además, al funcionar a un nivel menor de complejidad, representa un problema para la investigación neurocientífica. Por su parte la rata en la investigación neurocientífica ofrece buenas posibilidades técnicas para las manipulaciones de neurocirugía o estereotáxicas, neuroimagen, histopatología, grabaciones electrofisiológicas, o muestreo en serie del CSF. Los modelos de rata han mostrado representar, de una manera más precisa, la patología humana, comparado con los ratones, tal como la hipertensión, arterosclerosis, patología del VIH, Enfermedad de Huntington, entre otras (72).

La “hipótesis amiloide” o la “hipótesis de la cascada amiloide” fue propuesta en 1991 después de descubrirse una mutación en la APP en cerebros de pacientes con la EA. Esta teoría propone que, la acumulación de una forma tóxica del A $\beta$ , a través del corte proteolítico anormal de la proteína APP y/o su eliminación (*clearance*) reducido, lleva a la agregación y abajamiento de la proteína tau y posteriormente, la muerte neuronal, precipitando la neurodegeneración en la EA. Esta hipótesis fue apoyada por estudios genéticos que identificaron distintas mutaciones causantes de la EA familiar en la vía de producción del péptido amiloide, que incluyen la APP, PSEN1 y PSEN2. La presencia de concentraciones elevadas de A $\beta$  en plasma correlacionaba con el incremento en el riesgo de sufrir EA, años antes del inicio de la enfermedad (73).

El método más común para reproducir la desregulación amiloide en la EA, es la generación de modelos transgénicos. Los primeros modelos de este tipo que incluían a la APP humana con mutaciones causantes de EA familiar aparecieron en los 2000s.

Estos modelos se generaron en ratón y simultáneamente se buscaban también en rata, pero fallaron los intentos para desarrollarlos. Actualmente hay distintas cepas de ratones transgénicos que muestran la presencia de depósitos amiloides que progresan con la edad. Las pérdidas neuronales y sinápticas difieren entre cada línea y las pruebas de comportamiento han mostrado distintos grados de deficiencias en referencia a los trabajos y tareas de memoria. Una característica de estos modelos es la ausencia de los ovillos neurofibrilares, solo aquellos ratones que expresan la proteína tau mutada desarrollan la patología de tau. Los datos de estos modelos han permitido un mejor conocimiento de las propiedades biofísicas y patológicas de los polímeros de tau en la demencia. En conjunto, los modelos de ratones transgénicos han contribuido extensamente al conocimiento de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer y las investigaciones de posibles estrategias terapéuticas. Por otra parte, los modelos de ratas ofrecen una nueva era para la investigación en EA. La [Tabla II](#) muestra algunos ejemplos de los diferentes transgénicos amiloides y sus fenotipos en ratas (72,73).

### **Modelo de rata de la Enfermedad de Alzheimer: TgF344-AD**

En 2013 Cohen y colaboradores generaron un nuevo modelo para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, basándose en la hipótesis de que por mayor cercanía evolutiva entre el humano y la rata esta funcionaría como un mejor animal modelo para la EA (74).

**Tabla II. Resumen de los modelos transgénicos de amiloides en ratas.**

<b>Modelo</b>	<b>Modificación</b>	<b>Patología</b>	<b>Comportamiento</b>
Mutaciones dobles en APP (e.g., APP21, McGill-R-Thy1-App)	Vectores virales introdujeron mutaciones humanas a cigotos conteniendo dos diferentes mutaciones en APP (e.g., McGill-R-Thy-APP tiene mutación sueca e Indiana)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patología A<math>\beta</math> desde 7 días de edad</li> <li>• Se forman placas a los 6 meses de edad y a lo largo de todo el cerebro a los 18 meses</li> <li>• Gliosis edad dependiente, pérdida de sinapsis y déficits de la transmisión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pobre adquisición de memoria espacial en el laberinto de Morris, memoria de reconocimiento de objetos similar a los controles</li> <li>• Déficits en condicionamiento del miedo</li> </ul>
APP/PS1 bigénico (e.g., APP+PS1, Tg478,	Vectores virales introdujeron mutaciones humanas a cigotos conteniendo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niveles de A<math>\beta</math>42 mayores y las placas aparecen antes que solo en mutantes APP, son edad dependiente e</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déficits en la memoria espacial desde los 6 a 10 meses de edad.</li> </ul>



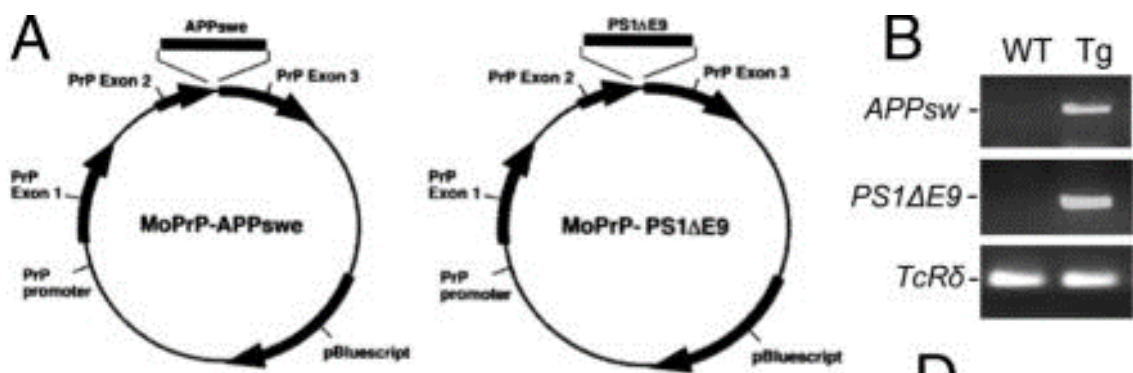
Tg1116, Tg344-AD (APP Sueca, PS1ΔE9).	mutaciones en APP y PSEN1	<p>incrementan su expresión y distribución.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión de tau incrementada, incluyendo las estructuras parecidas a ovillos</li> <li>• Pérdida neuronal en el hipocampo y Locus Coeruleus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déficits en el reconocimiento de memoria desde los 24 meses (Reconocimiento de objeto novedoso)</li> <li>• Alguna evidencia del incremento en la ansiedad en animales viejos</li> </ul>
Cepas de APP knock-in	Crispr/Cas9 se usó para humanizar la secuencia del gen endógeno de APP; otros incluyen la introducción de mutaciones humanas en el gen de APP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humanización de APP (gen humano wild type) incremento los niveles de Aβ40, pero no los de Aβ42 o su acumulación, no se detectaron placas ni ovillos hasta los 2 años.</li> <li>• Genes humanizados con mutaciones, e.g., KM670/671NL doble mutación sueca tiene niveles de Aβ42 incrementados y transmisión sináptica alterada, fosforilación de tau, gliosis y pérdida neuronal (en ratas jóvenes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En su mayoría el comportamiento no se distingue de los controles wild type.</li> <li>• Ratas con APP<sup>NL-G-F</sup> tienen déficits en el Laberinto de Morris desde los 5-7 meses, alguna evidencia de mayor ansiedad.</li> </ul>

Recuperado de (73).

Los animales se generaron en una rata con fondo Fischer 344 coinyectando el pronúcleo de la rata con dos genes humanos bajo el promotor de la proteína priónica de ratón, el primero es el gen humano APP con la mutación “sueca” (APP<sup>sw</sup>) y el otro es el gen de la PSEN1 con una delección en el exón 9 (PS1ΔE9) ([Figura 12](#)). La integración del gen se confirmó al genotipificar la progenie, y su expresión se evaluó mediante Western Blot (WB) a partir de homogenados de cerebro. Al comparar los niveles de proteínas endógenas de la rata, las ratas TgF344-AD expresan 2.6 veces más la APP humana y 6.2 veces más la PSEN1 humana en el cerebro (74).

Las ratas Tg344-AD muestran incrementos dependientes de la edad en los niveles de Aβ40 y Aβ42 entre los meses 6 y 26. El radio Aβ40/ Aβ42, también incrementa con la edad en la fracción soluble, pero se reduce en la fracción insoluble. Se presenta también la acumulación de Tau con la presencia de estructuras parecidas a los ovillos, hay

astrogliosis a partir de los 6 meses y hay pérdida neuronal de 40% en el hipocampo y córtex al alcanzar los 16 meses de edad (74).



**Figura 12. Plásmidos APP<sub>sw</sub> y PS1ΔE9 de la rata TgF344-AD.**

**A**, Esquema de los plásmidos co-inyectados en el pronúcleo de la rata Fischer para generar ratas TgF344-AD. **B**, Resultados de las reacciones de PCR para APP<sub>sw</sub>, PS1ΔE9 y TcRδ.

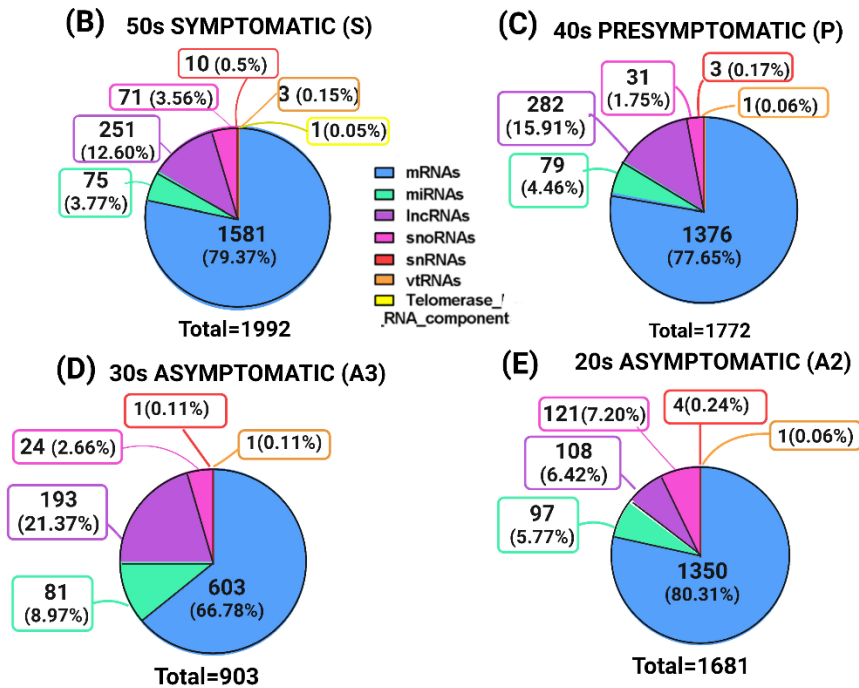
Las ratas fueron probadas a los 6, 15 y 24 meses, y las ratas transgénicas no mostraron anomalías neurológicas en una pantalla incluyendo la respuesta de enderezamiento, parpadeo, contracción de la oreja, retirada de extremidades en respuesta a estímulos táctiles, respuesta de orientación a estímulos olfativos y visuales, respuesta de sobresalto y colocación visual y táctil. Por otra parte, las ratas transgénicas de 15 meses eran hiperactivas en la prueba de campo abierto. En el laberinto elevado las ratas transgénicas de 1 a 6 meses pasaron menos tiempo en los brazos abiertos que las ratas no transgénicas, indicando ansiedad incrementada. El aprendizaje inverso en el laberinto acuático de Morris se vio afectado en animales de 6 meses de edad y se encontraron déficits de aprendizaje en el laberinto de Barnes en las ratas transgénicas (TgF344-AD) de 15 meses. Se observaron déficits en el reconocimiento de objetos novedosos a los 24 meses (74,75).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación, se realizó un análisis transcriptómico de transcritos codificantes y no codificantes usando microarreglos (GeneChip Human Gene 2.0 ST) que se expresaban diferencialmente en OE-MSCs derivadas de dos portadores asintomáticos (PM18 y PM36), un presintomático (PF44) y un sintomático (PM54) de la mutación PSEN1(A431E), y comparadas con OE-MSCs derivadas de sujetos control sin la mutación (CcF18, CcM35, CF42 y CM55). Se empleó un análisis de varianza (ANOVA) para generar una lista de genes que mostraran diferencias significativas entre las OE-MSCs de los portadores y los controles. El criterio de inclusión de la lista fue un *fold change* (FC, razón de cambio) mayor o menor a 2 y un valor-p menor a 0.05, ajustado a un *false discovery rate* (FDR) menor a 0.05 (76).

En el estadio sintomático (S) se encontraron 1992 transcritos diferencialmente expresados (DE), de los cuales 1581 correspondían a transcritos codificantes (mRNAs), 75 miRNAs, 251 (largos no codificantes) lncRNA, 71 (pequeños nucleolares) snoRNAs, 10 (pequeños nucleares) snRNAs, 3 (bóveda) vtRNAs y 1 componente de la RNA telomerasa ([Figura 13b](#)). En el estadio presintomático (P) se encontró un total de 1772 transcritos DE, de los cuales 1376 correspondían a mRNAs, 79 miRNAs, 282 lncRNAs, 31 snoRNAs, 3 snRNAs y un vtRNA ([Figura 13c](#)). En la etapa asintomática con individuos en los 30s (A3) se encontraron 903 transcritos DE, dentro de los cuales 603 correspondían a mRNAs, 81 a miRNAs, 193 lncRNAs, 24 snoRNAs, 1 snRNA y 1 vtRNA ([Figura 13d](#)). Finalmente, en el estadio asintomático de individuos en sus 20s, se obtuvieron 1681 transcritos DE, de los que 1350 eran mRNAs, 97 miRNAs, 108 lncRNAs, 121 snoRNAs, 4 snRNAs y un vtRNA ([Figura 13e](#)). Los transcritos que estaban DE variaron a lo largo de cada estadio con base a la edad y los síntomas. Sin embargo, se observó que el estadio más temprano tenía un número importante de transcritos DE y era el estadio que tenía la mayor cantidad de miRNAs DE, indicando alteraciones en las etapas tempranas debido a la mutación ([Figura 13](#)) (76).

La expresión de los miRNAs varió en cada estadio. En el estadio S 48% [39] estaban subexpresados y 52% [36] estaban sobreexpresados. En el estadio P 62% [49] se encontraban subexpresados y 38% [30] sobreexpresados. En el estadio A3 45.7% [37] de los miRNAs estaban subexpresados y 54.3% [44] sobreexpresados. Finalmente, en el estadio A2 40.2% [39] estaban regulados a la baja y 59.8% [58] se encontraban sobreexpresados (76).



**Figura 13. RNAs diferencialmente expresados en las OE-MSCs al compararse por estadio de la enfermedad.**

Se muestra la categorización de los transcritos y los porcentajes correspondientes a su distribución correspondiente de acuerdo con los grupos. (S) representa el estadio sintomático, (P) representa el estadio presintomático, (A3) hace referencia al estadio asintomático con sujetos en sus 30s y (A2) es el estadio sintomático con sujetos en sus 20s. lncRNA: RNAs largos no codificantes, snoRNA: RNAs pequeños nucleolares, snRNA: RNAs pequeños nucleares, vtRNA: RNAs de bóveda (76).

Los estadios asintomáticos presentaron un número mayor de miRNAs sobreexpresados, en comparación con los estadios presintomáticos y sintomáticos en los que hay un mayor número de miRNAs subexpresados. La cantidad de miRNAs sub y sobreexpresados son muy similares entre ellos, lo que sugiere que los mecanismos compensatorios están en marcha desde etapas tempranas de la enfermedad (76).

Se encontró que existe un perfil transcriptómico distintivo en las OE-MSCs de los individuos portadores de la mutación PSEN1(A431E), al compararlas con las células

sin la mutación, siendo la mutación la causa principal de variación con la edad. En el grupo control, el perfil de expresión se mantuvo constante, a pesar de la edad de los individuos de los que provenían las células ([Figura 14a](#)). Al comparar los perfiles de expresión de cada uno de los portadores y controles, se encontró un claro patrón de expresión diferencial que permitió distinguir a las células ecto-mesenquimales de los individuos sanos, de aquellos afectados por la mutación PSEN1(A431E) ([Figura 14b](#)) (77).

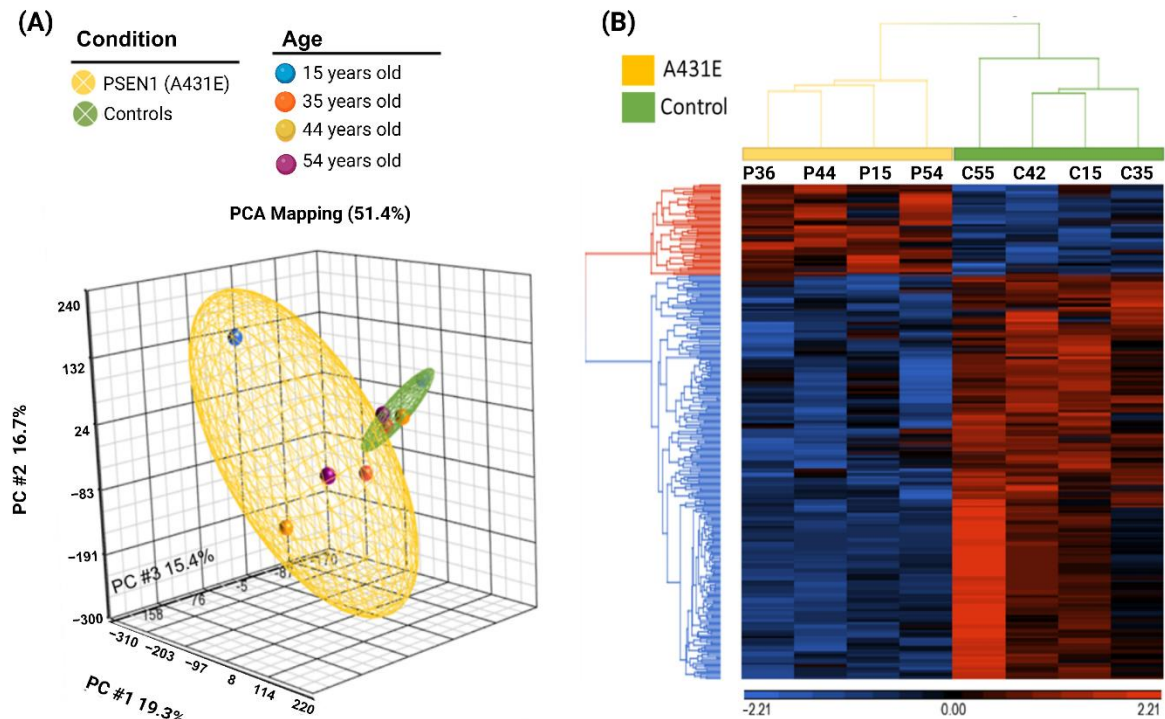
Para abrir aún más el estudio, se consideró ahora un FC de  $1.5 \geq FC \geq -1.5$ . Con lo cual, se identificaron 1241 mRNAs y 81 miRNAs, de los que 36 estaban subexpresados y 45 sobreexpresados (76).

Para determinar si las OE-MSCs con la mutación PSEN1(A431E) tienen un patrón distintivo de miRNAs. Se hizo un análisis con diagramas de Venn en el que se incluyeron todos los miRNAs que estaban alterados en los diferentes estadios ([Figura 15a](#)) y se seleccionaron aquellos que se compartieran en al menos en dos de los estadios (54 miRNAs). Después se compararon estos miRNAs con los 81 miRNAs seleccionados por el FC de 1.5, dando como resultado 29 miRNAs compartidos entre sí ([Figura 15b](#)). Dentro de estos, 12 estaban subexpresados y 17 estaban sobreexpresados. Dentro de estos, 8 mostraron el mayor FC y se encontraron alterados en al menos dos individuos con la mutación ([Figura 15c](#)). El miR-130b fue el único que se compartió entre todos los estadios con el FC mayor de 4.1 ([Figura 15c](#)) (76).

Al considerar un FC de 1.5 se observó que 5 miRNAs (miR-130b, miR-3142, miR-147b, miR-146a y miR-4540) estaban sobreexpresados en al menos 3 estadios, estando el miR-130b sobreexpresado en todos los estadios ([Figura 15c](#)). De manera similar, se encontraron 4 miRNAs (miR-4668, miR-32, miR-4521 y miR-1178) subexpresados en al menos 3 estadios de la enfermedad ([Figura 15c](#)) (76).

Algunos de los miRNAs que presentan algunos patrones de expresión muy interesantes son el miR-4540 y el miR-548f5 ([Figura 15b](#)). El miR-4540 al inicio se encuentra sobreexpresado y gradualmente disminuye su expresión conforme progresa la enfermedad. El miR-548f5 se comporta de manera totalmente al revés, al inicio se encuentra sobreexpresado reportando un FC por arriba de 30, y conforme progresa la

enfermedad disminuye su expresión, estando subexpresado en el estadio sintomático (76).



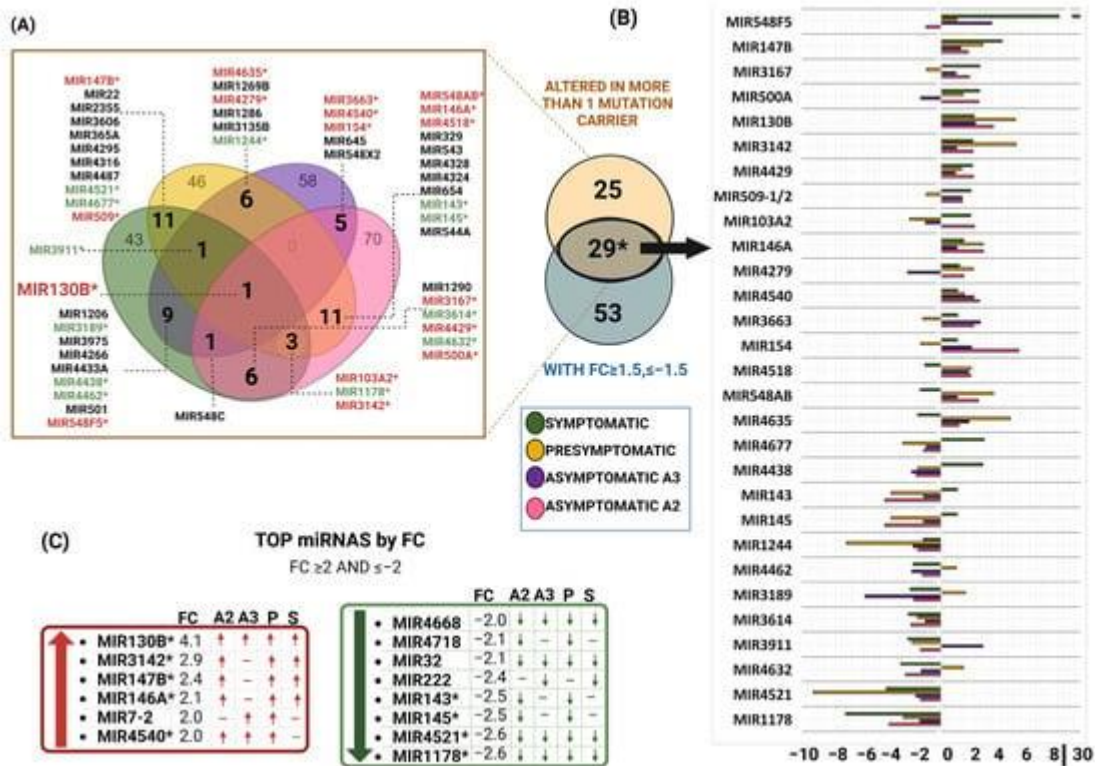
**Figura 14. Perfil transcriptómico de OE-MSCs derivadas de portadores de la mutación PSEN1(A431E) y sus controles.**

**A**, Análisis de componente principal (PCA) de los perfiles de expresión de los mRNA en las OE-MSCs de los portadores de la mutación PSEN1(A431E). Cada punto representa una muestra y los colores corresponden a los grupos de edad. La elipsoide amarilla representan las células de los individuos con la mutación en PSEN1(A431E) y la verde representa las células de los individuos control. **B**, Mapa de calor del perfil de expresión de RNAs codificantes y no codificantes expresados diferencialmente en OE-MSCs de individuos sanos e individuos afectados por la mutación PSEN1(A341E). El conjunto de datos representado pertenece a aquellos transcritos expresados diferencialmente. Cada gen está representado en una fila y cada muestra en una columna. La distancia entre dos grupos fue calculada por Average Linkage, donde la distancia promedio entre todos los pares de objetos en los dos grupos diferentes se utiliza como la medida de la distancia entre los dos grupos. Los genes sin diferencias en la expresión tienen un valor de cero y están representados por el color negro. Los genes con la expresión incrementada tienen valores positivos y están de color rojo, mientras que aquellos con la expresión reducida tienen valores negativos y son de color azul. El color del dendrograma superior hace alusión a la expresión diferencial que tienen las células portadoras PSEN1(A341E) vs las células controles. Las muestras con la mutación PSEN1(A341E) son de color amarillo y las muestras controles son de color verde. Los datos fueron estandarizados de manera que el promedio de cada transcrito fuera cero y la desviación estándar sea 1, provocando que todos los transcritos tengan el mismo peso. Gráfica realizada con Partek v6.6beta Software (77).

Existen distintos miRNAs que han sido ampliamente reportados en la literatura y estos se encuentran de manera distinta representados en los resultados de nuestro microarreglo. El miR-155 se encuentra subexpresado en el estadio S, el miR-125b-1 se encuentra en el estadio P subexpresado y por otra parte el miR-132 se encuentra



sobreexpresado en el estadio A3, y finalmente el miR-9-1 se encuentra sobreexpresado en el estadio A2. Por lo tanto, es de gran importancia analizar la presencia de estos miRNAs que han sido reportados con anterioridad como potenciales biomarcadores de la EA (42,76).



**Figura 15. Perfil de miRNAs en portadores de la mutación PSEN1(A431E).**

**A**, Diagrama de Venn de miRNAs alterados por estadio sintomatológico. En verde el estados sintomatológico (S), en amarillo el estado presintomático (P) y en morado y rosa los estados sintomáticos (A3 y A2), respectivamente. Los miRNAs compartidos en más de un portador de la mutación están en negritas y corresponden a los 54 miRNAs en el círculo naranja del diagrama de Venn en la figura B. **B**, El círculo azul muestra los miRNAs con un  $1.5 \geq FC \geq -1.5$ . Este FC se obtuvo con la expresión promedio de los portadores de la mutación PSEN1(A431E) *versus* el promedio de las OE-MSCs sin la mutación. Los 29 miRNAs resultantes se muestran en la gráfica, donde verde corresponde a la etapa sintomática, amarillo a la presintomática, y morado y rosa a los estadios asintomáticos A3 y A2, respectivamente. **C**, El top de miRNAs por FC ( $2 \geq FC \geq -2$ ). \*Corresponde a los 29 miRNAs compartidos, y los miRNAs con letras rojas están sobreexpresados y los de letras verdes subregulados (76).

Los resultados obtenidos en los microarreglos son muy prometedores; sin embargo, deben ser validados por métodos más sensibles para comprobar que los patrones de expresión se mantienen, y corroborar si aquellos que han sido reportados con anterioridad como biomarcadores están presentes en el modelo celular desarrollado por nuestro grupo.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Los miRNAs son moléculas que tienen un papel muy importante en la regulación de la expresión de los genes, regulando la estabilidad del mRNA y afectando la expresión de las proteínas. La identificación de los miRNAs alterados en las células ectomesenquimales derivadas de individuos con la mutación Jalisco, y sus blancos moleculares, es fundamental para indicarnos que procesos biológicos o vías moleculares están alterados en esta forma específica de la Enfermedad de Alzheimer Familiar, que afecta preferencialmente a los portadores de la mutación PSEN1(A431E). Por lo tanto, la validación de la expresión diferencial de estos miRNAs, por sus características prácticas de fácil obtención, especificidad y sensibilidad podrían ser útiles y convertirse en biomarcadores de pronóstico de esta enfermedad.



## **HIPÓTESIS**

La mutación PSEN1 (A431E) causante de una variante de la Enfermedad de Alzheimer Familiar, altera el perfil de expresión de miRNAs específicos en las distintas etapas de evolución de la enfermedad.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Analizar la expresión diferencial de 14 miRNAs asociados a la mutación Jalisco, correlacionarlos con las vías metabólicas y celulares en las que participan y evaluar su papel como biomarcadores pronósticos durante el desarrollo y evolución de la enfermedad.

### **Específicos**

1. Validar mediante RT-qPCR la expresión diferencial de 14 miRNAs, expresados diferencialmente en un análisis de microarreglos en células derivadas de pacientes con la mutación Jalisco en distintas etapas de la enfermedad.
2. Realizar un análisis bioinformático para los miRNAs diferencialmente expresados incluyendo sus genes blancos, y evaluar su potencial como biomarcadores de pronóstico de la enfermedad durante el desarrollo de la enfermedad.
3. Analizar la expresión de los 14 miRNAs diferencialmente expresados en un modelo celular de rata de la Enfermedad de Alzheimer.

## METODOLOGÍA

### Familia de estudio.

Se incluyeron a los miembros de una familia con diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer Familiar que poseen la mutación A431E en PSEN1 (Figura 16), así como controles consanguíneos y controles externos (sin parentesco) que no poseen la mutación. Dentro del grupo de individuos portadores de la mutación A431E (PSEN1) se incluyeron a dos individuos que aún no presentaban signos de la enfermedad (asintomáticos) (P18 y P36), uno que mostraba ligeros signos de la presencia de la enfermedad (presintomático) (P44) y uno con claros signos de la enfermedad (sintomático) (P54).

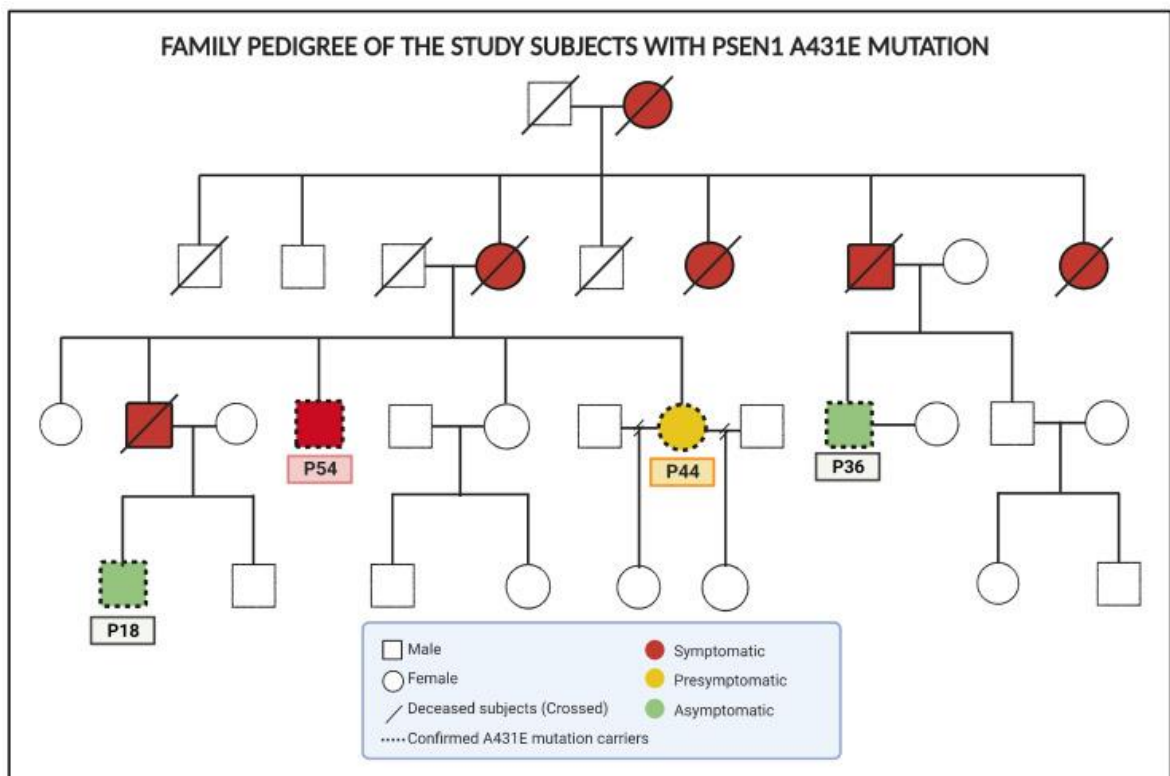


Figura 16. Pedigrí de la familia de estudio (76).

### Cultivo de las células ecto-mesenquimales del surco olfatorio humano.

Las células fueron obtenidas y cultivadas de acuerdo con el protocolo descrito por Benítez-King y colaboradores. Las células fueron exfoliadas de la región anterior del cornete lateral medial usando un cepillo interdental especial (2.4 cm de ancho y 3 mm de diámetro) con movimientos circulares para exfoliar las células de la pared lateral de la cavidad nasal y el septo. Las células se cultivaron en medio DMEM/F-12

(*Dulbecco's Modified Eagle* y F-12), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 4 mM de L-glutamina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomina y 100 IU/mL de penicilina (33).

### **Obtención de las células MSCs a partir de Bulbo Olfatorio de Rata**

Los cultivos de células mesenquimales de rata se obtuvieron de ratas transgénicas Tg344-AD de 6 meses de edad y de ratas sanas de la misma edad. Para su obtención se anestesió y decapitó a la rata. Se disecó el BO metiendo la tijera en la base del cráneo de forma horizontal por ambos lados, se rompió el hueso nasal con alicatas y con tijeras pequeñas se cortó por la línea media. Se abrió el cráneo y se retiró el cerebro por gravedad para evitar dañar el tejido y se cortó el BO.

El tejido obtenido se cortó en fragmentos finos con una hoja de bisturí sobre una caja de cultivo, se disoció en una solución de digestión de Tripsina 0.25%/EDTA 0.02% durante 20 min a 37 °C en la incubadora de CO<sub>2</sub>. Se detuvo la digestión añadiendo medio DMEM/F-12 con SFB al 10%. Se centrifugó la suspensión celular a 350 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se trituró el sedimento celular al pasarlo por la aguja de una jeringa. La suspensión celular se resuspendió en DMEM/F-12, suplementado con un 10% de FBS y 1% de antibióticos (solución de penicilina y estreptomina), y se colocó en las de cajas de cultivo a 37 °C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> (78).

### **Extracción de RNA**

Las células fueron sembradas en cajas de cultivo p100, y una vez que alcanzaron la confluencia celular del ~80%, el medio de cultivo fue retirado y las células lavadas 3 veces con PBS 1x. Las células fueron tratadas con Tripsina 0.25%/EDTA 0.02% e incubadas a 37°C durante 3 minutos, y se observó la disociación celular bajo el microscopio. Una vez pasado el tiempo, se añadió medio de cultivo completo para inactivar la tripsina, y las células en suspensión se transfirieron a un tubo cónico para ser centrifugadas a 3,000 rpm durante 3 min.

Para la extracción de RNA se utilizó una metodología tradicional de Trizol (79). En esta se empezó homogenizando el botón celular con 1 mL de Trizol y se congeló inmediatamente a -80 °C. Para iniciar la extracción de RNA descongelaron las muestras y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregaron 200

$\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitaron en vortex por algunos segundos y se incubaron durante 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. Posterior a esto se recuperó la fase acuosa en un nuevo microtubo, que corresponde a la fase superior, en la que está el RNA.

Una vez recuperada la fase acuosa, esta se precipitó toda la noche en 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se hicieron 2 lavados con etanol al 75% en agua libre de nucleasas (NFW, *nuclease free water*) centrifugando entre cada uno a 7,500 x g durante 5 min a 4 °C. Una vez seco el botón, se resuspendió en NFW y se dejó incubar a 57 °C durante 12 min. Posteriormente se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific NanoDrop), evaluando también la relación 260/280 y 260/230, utilizando únicamente aquellas muestras que tuvieran valores por arriba de 1.8.

Finalmente se evaluó la integridad del RNA mediante un gel de agarosa desnaturalizante. Aranda *et al.*, propusieron la introducción del cloro comercial (hipoclorito de sodio 6%) como agente desnaturalizante en un gel de agarosa TAE estándar para visualizar rápidamente la condición de una muestra de RNA. El uso de estos reactivos que son de fácil obtención y baratos minimizan el tiempo de preparación, es simple de ejecutar y reduce la cantidad de agentes tóxicos. Este método es efectivo, seguro, asequible y rápido para evaluar la calidad del RNA (80).

### **Cuantificación de miRNAs por qPCR**

La cuantificación se realizó por el método descrito por Cirera y Busk (81), este método por PCR para la cuantificación de miRNAs emplea una retrotranscripción reversa simple para todos los miRNAs, combinando una PCR cuantitativa con dos *primers* para el cDNA de un miRNA en específico ([Figura 17](#)). Este método promete cuantificar los templados sintéticos sobre ocho órdenes de magnitud y discrimina miRNAs que difieren en un solo nucleótido. También permite mayor amplificación y eficiencia que otros métodos similares debido al uso de *primers* de DNA (81).

### **Transcripción reversa**

Todos los materiales y muestras fueron manipulados con guantes para evitar contaminación con RNA y ácidos nucleicos que den falsos positivos.

Todos los materiales fueron conservados en hielo a menos que se indique lo contrario.

1. Polimerasa poli(A): polimerasa pol(A) de *E. coli* 5,000 U/mL
2. *Buffer* de reacción: 10x *buffer* de polimerasa poli(A) de *E. coli*
3. Transcriptasa reversa: Transcriptasa reversa M-MuLV 200,000 U/mL
4. 1mM de adenosina 5' trifosfato (ATP) libre de RNAsas:
5. 1mM de mezcla de dNTP libres de RNAsas
6. *Primer*-RT: 10  $\mu$ M 5'-CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTVN-3' donde A es A, C, y G, y N es A, C, G y T disuelto en agua libre de RNAsas.
7. Agua libre de RNAsas
8. Controles positivos: Secuencias de RNA con la misma secuencia que los miRNAs.

Se mezcló en hielo: 1  $\mu$ L de 10x *buffer* de reacción de la poli(A) polimerasa, 1  $\mu$ L de 1mM ATP, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ M de *primer* de RT 5'-CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTVN, 1  $\mu$ l 1 mM dNTPs, 0.5  $\mu$ L (200 U/  $\mu$ L) de transcriptasa reversa M-MuLV, 0.2  $\mu$ L polimerasa poli(A) 5,000 U/mL. Posteriormente se agregó la muestra de RNA (1000 ng) y se completaron a 10  $\mu$ L con agua libre de RNAsas. Se incubó a 42 °C por 1 h, y para inactivar la reacción de calentó a 95 °C por 5 min.

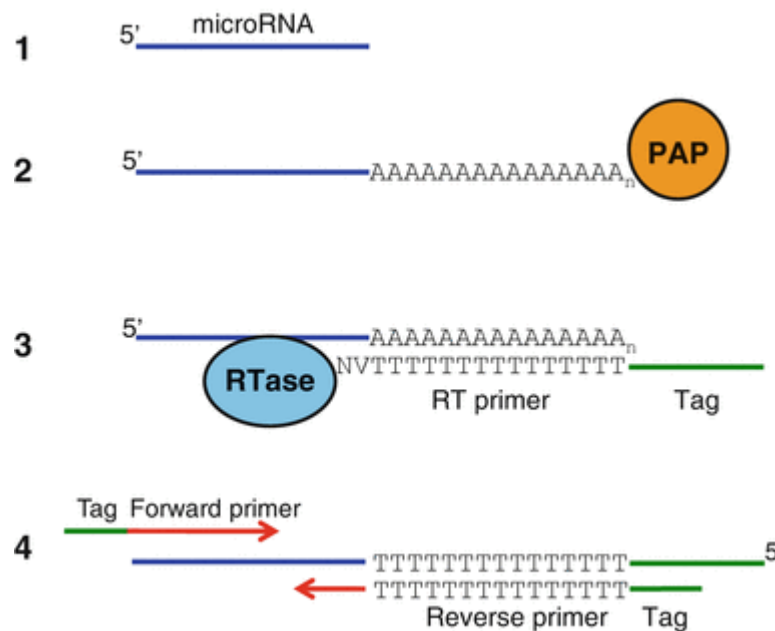
### qPCR

Todos los materiales fueron conservados en hielo a menos que se indique lo contrario.

1. *Primers* de PCR: Los *primers* fueron diseñados de acuerdo con Busk P (82) y se disolvió el par (*Forward* y *Reverse*) a una concentración 8  $\mu$ M con agua libre de nucleasas. Los *primers* empleados están en [Anexos II](#).
2. Mix de PCR: Master Mix PowerTrack™ SYBR Green (Applied Biosystems™)
3. Agua libre de RNAsas

Se mezcló conservando en hielo para cada muestra: 2  $\mu$ L de 0.8  $\mu$ M de la mezcla de los *primer forward* y *reverse*, 5  $\mu$ L 2x máster mix para PCR y se completó a 8  $\mu$ L con NFW. Se alicuotaron 8  $\mu$ L en tubos de PCR a 4 °C, y se le agregaron 2  $\mu$ L del total de la reacción del cDNA. Inmediatamente se corrió la qPCR: 95 °C por 2 min seguidos,

luego 40 ciclos de 95 °C de 15 s y 60 °C por 60 s. Finalmente se corrió el análisis de *melting curve*.



**Figura 17. Esquema de la qPCR específica de los miRNAs.**

1. Iniciar con RNA total o miRNAs purificados. 2. Usar la poli(A) polimerasa para incorporar una cola de adenosinas. 3. Hacer el cDNA con la transcriptasa reversa, el *primer* RT y dNTPs. Los pasos 2 y 3 se hacen simultáneamente en una reacción. 4. Hacer la PCR tiempo real con dos *primers* específicos. *PAP*: Poli(A) polimerasa; *RTase*: MuLV transcriptasa reversa. Recuperado de (81).

### Identificación de blancos moleculares y vías implicadas

Una vez identificados los miRNAs diferencialmente expresados en las células ectomesenquimales de pacientes con la mutación PSEN1(341E), se realizó un análisis bioinformático en las bases de datos mirTarBase, miRWalk, TarBase, para identificar los blancos moleculares con los que interactúan. Estas bases de datos incluyen blancos validados y están especializadas en catalogar específicamente interacciones miRNA-mRNA, además de ser de las más citadas (83).

Finalmente se buscaron las vías moleculares en las que estos miRNAs están implicados en bases de datos como miRPath, KEGG y DAVID y se correlacionaron con las vías implicadas en la EA (83,84).

Con base en los blancos y vías celulares y moleculares, se propusieron aquellos miRNAs que pudieran ser utilizados como biomarcadores pronósticos de la enfermedad.

**Identificación de miRNAs en el modelo animal.**

Se obtendrá el RNA total de los cultivos celulares de células ecto-mesenquimales de rata Tg344-AD de 14 meses y rata Fischer 344 *wild type* de 6 meses como su control, por la metodología convencional de Trizol antes descrita (79). Se cuantificarán los 14 miRNAs mediante RT-qPCR según la metodología anteriormente mencionada (81).

## RESULTADOS

Una vez extraído el RNA, se cuantificó y se evaluó su pureza en un Thermo Scientific NanoDrop mediante las relaciones 230/260 y 280/260, para su posterior uso es necesario que se emplee material que tenga la relación 230/260 mayor a 1.8. En la [Tabla III](#), se observa la cuantificación de cada una de las muestras que se obtuvieron de cada una de las OE-MSCs de los individuos con sus respectivas replicas técnicas. La simbología de las muestras es la siguiente: control (C) o portador (P), consanguíneo (c), del género masculino (M) o femenino (F) y la edad al momento de la toma de muestra.

**Tabla III. Cuantificación y pureza de la extracción de RNA.**

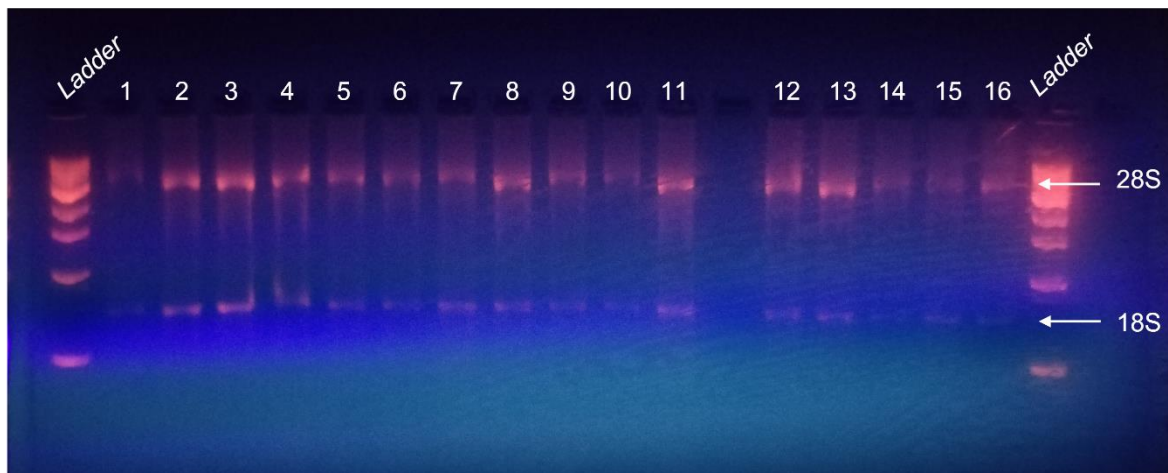
N	Muestra	Cuantificación	Relación	
			260/280	260/280
1	CcF18 A	505.9	1.90	1.98
2	CcF18 B	550.5	1.91	1.76
3	CcF18 C	1761.2	2.00	2.00
4	PM18 A	817.8	1.98	2.24
5	PM18 B	664.5	2.01	2.013
6	CcM35 A	832.6	1.94	2.13
7	CcM35 B	662.1	1.99	2.07
8	CcM35 C	952.1	1.95	2.03
9	PM36 A	562.0	1.95	1.91
10	PM36 B	617.7	1.95	1.71
11	CF42 A	720.2	1.98	1.91
12	CF42 B	526.6	1.92	2.01
13	CF42 C	443.0	1.94	1.69
14	PF44 A	672.4	1.92	1.78
15	PF44 B	577.5	1.96	1.65
16	PF44 C	488.7	1.92	1.71

C: control, P: portador, c: consanguíneo, M: masculino, F: femenino

Una vez realizada la cuantificación de RNA se hizo un gel de agarosa desnaturalizante al 3% ([Figura 18](#)), en el que en cada carril se corrió cada una de las diferentes extracciones de RNA anteriormente descritas ([Tabla III](#)), corriéndose 500 ng de RNA y se usó bromuro de etidio (BrEt) para su visualización en el transiluminador. En los carriles laterales se muestra la carga de 3  $\mu$ L de *ladder* (PCR 20 bp Low Ladder Sigma-Aldrich).



En el gel ([Figura 18](#)) se observan señaladas con flechas las bandas del RNA ribosomal 28S y 18S, esto se mantiene en la mayoría de los carriles. No se alcanza a observar la banda del RNA 5.8S, esto se podría deber a la calidad de la fotografía.



**Figura 18. Gel de integridad de RNA.**

Los números representan cada una de las muestras que se describieron en la Tabla III. A los costados marcador de peso molecular (*Ladder* 20 pb PCR Low Ladder Sigma-Aldrich).

Para hacer el cDNA se eligieron aquellas muestras que tuvieran una relación 260/280 más alta, y aquellas que mostraran una banda mucho más iluminada en el gel de integridad, usándose 1000 ng de muestra para cada tubo de reacción. Una vez obtenido el cDNA se hizo la cuantificación de miR-4521, miR-32, miR-3142, miR-147b, miR-146a, miR-130b, miR-1178, miR-4540, miR-4668, miR-155, miR-125b-1, miR-132, miR-9 y miR-548f-3. Previo a la cuantificación de los miRNAs, se hizo el diseño de los *primers* para cada uno de los miRNAs que se cuantificaron ([Anexo I](#) y [II](#)).

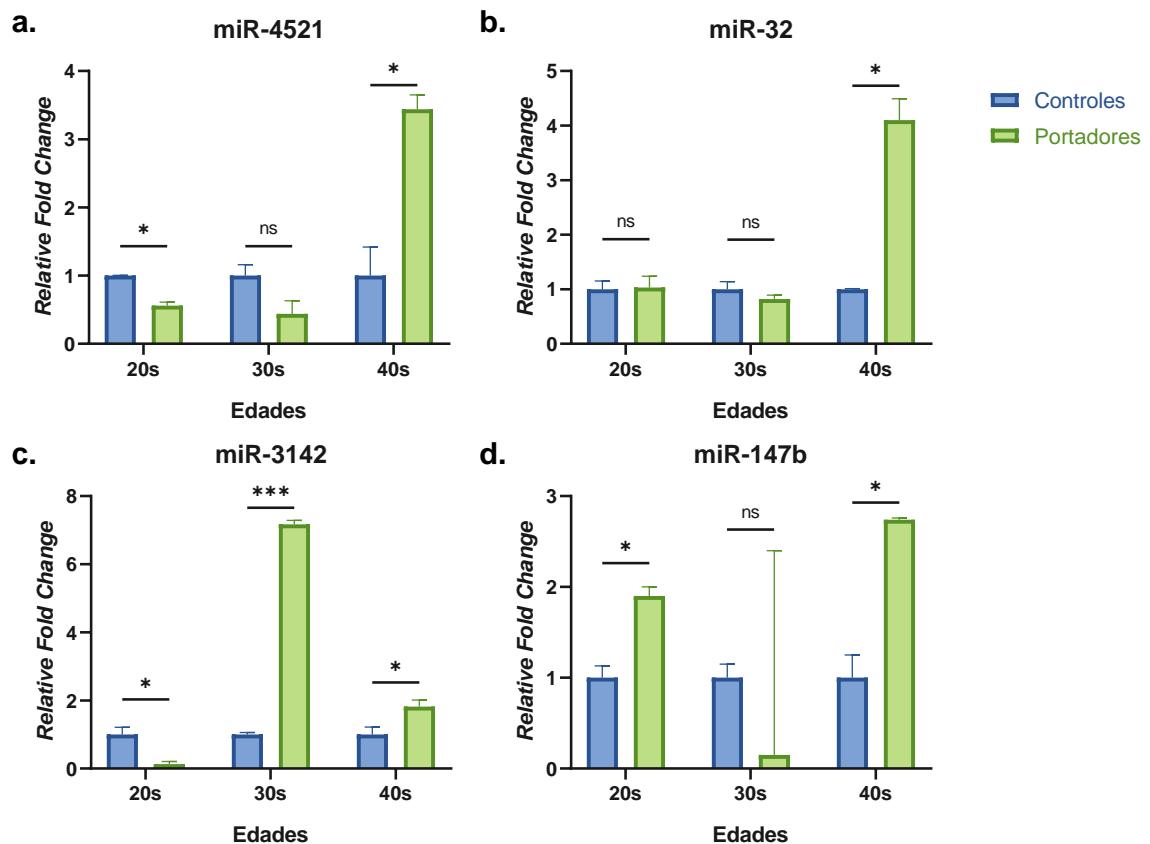
A continuación, se muestran las gráficas de los resultados obtenidos de las qPCRs (Figuras 19-22), el valor de *Relative Fold Change* (RFC) se calculó usando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Resultados detallados se muestran en [Anexo IV](#). Para que se puede considerar que hubo un cambio en la expresión el  $2.0 < RFC < 0.5$ . Las curvas de disociación se encuentran en [Anexo V](#).

En la Figura 19 ([Figura 19a](#)) se observa que en los estadios asintomáticos correspondientes a los grupos de edad 20s y 30s hay una expresión reducida del miR-4521 en comparación con el control. A pesar de que el cambio es estadísticamente significativo para el asintomático de 20s, el RFC es de 0.56 y caso contrario para el

asintomático de 30s, que tiene una reducción en la expresión a 0.44 pero no fue estadísticamente significativo. En el estadio presintomático se observa un cambio en la expresión a 3.44 siendo significativo.

El miR-32 ([Figura 19b](#)) tiene un comportamiento similar, en el que su expresión se mantiene relativamente constante en los estadios asintomáticos 20s y 30s al compararlo con el control, y hay un aumento significativo 4.1 en el estadio presintomático.

El miR-3142 ([Figura 19c](#)) tiene una disminución en la expresión en el estadio asintomático 20s de 0.13, y hay un aumento drástico en la expresión a 7.17 en el estadio asintomático 30s y este aumento baja a 1.82 en el estadio presintomático 40s. Todos los cambios fueron estadísticamente significativos.



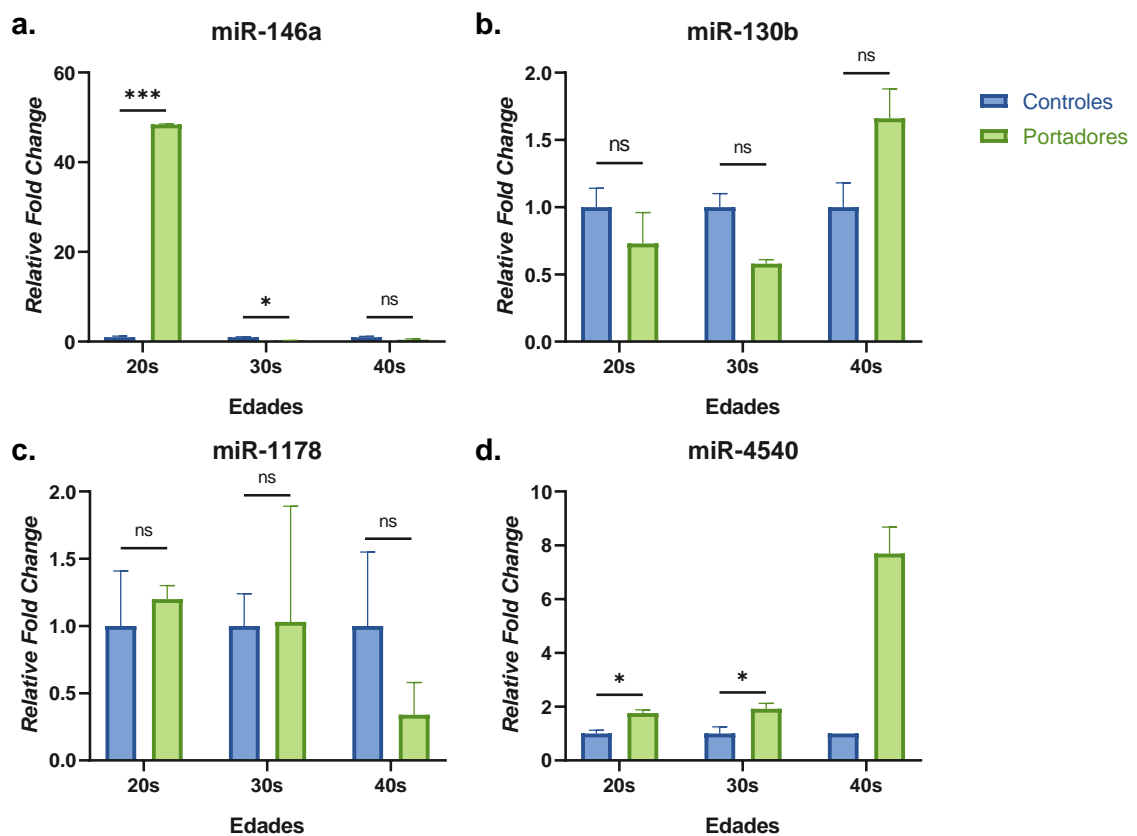
**Figura 19. Relative Fold Change de miRNA-4521, miR-32, miR-3142 y miR-147b.**

Significancia estadística calculada por T-test mediante GraphPad Prism 8.0.1. ns: no significativo (p-value > 0.05), \*: significativo (p-value < 0.033), \*\*: significativo (p-value < 0.002), \*\*\*: significativo (p-value < 0.001).

El miR-147b ([Figura 19d](#)) presenta un patrón de expresión inverso al miRNA anterior, en el que los grupos que tuvieron un aumento significativo en la expresión son los asintomático 20s y presintomático 40s con un RFC de 1.9 y 2.74 respectivamente, y una disminución en la expresión a 0.15 en el asintomático 30s.

La Figura 20 muestra el cambio de la expresión de los miRNAs 146a, 130b, 1178 y 4540. El miR-146a ([Figura 20a](#)) tiene un comportamiento muy particular, en el que se observa un cambio significativo en la expresión a 48.42, y después hay una reducción en la expresión a 0.15 en el asintomático 30s y 0.4 en el presintomático 40s.

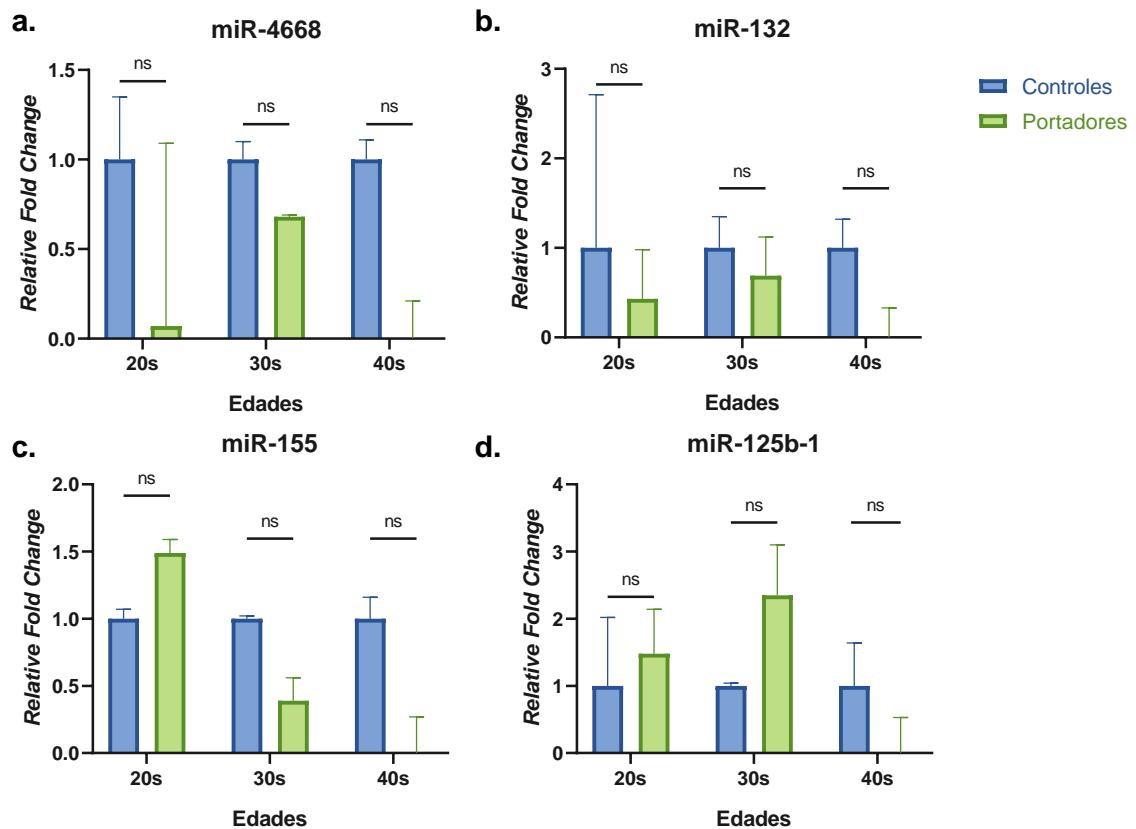
El miR-130b ([Figura 20b](#)) no presentó un cambio importante en su expresión, teniendo los asintomáticos 20s y 30s valores de 0.73 y 0.58, respectivamente, y de 1.66 para el presintomático 40s.



**Figura 20. Relative Fold Change de miRNA-146a, miR-130b, miR-1178 y miR-4540.** Significancia estadística calculada por T-test mediante GraphPad Prism 8.0.1. ns: no significativo (p-value > 0.05), \*: significativo (p-value < 0.033), \*\*: significativo (p-value < 0.002), \*\*\*: significativo (p-value < 0.001).

En el miR-1178 ([Figura 20c](#)) los estadios asintomáticos mantuvieron la expresión muy constante y parecida a la de los controles, con valores de 1.2 y 1.03 para los asintomáticos 20s y 30s, sufriendo un cambio en la expresión a 0.34 en el presintomático 40s.

Manteniendo un comportamiento similar al miR-1178 en los estadios asintomáticos 20s y 30s, la expresión del miR-4540 ([Figura 20d](#)) se mantuvo muy parecida con valores de 1.76 y 1.92, respectivamente. Habiendo un aumento en la expresión de este miRNA en el grupo presintomático 40s con un valor de 7.69. Este valor es único, por lo que sería importante llevar a cabo nuevamente el experimento para confirmar los datos.



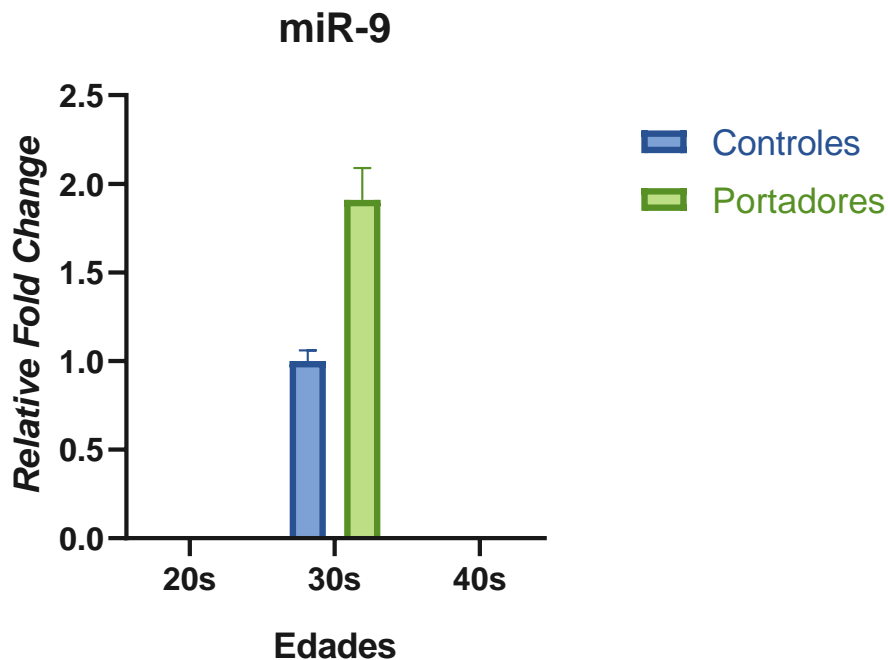
**Figura 21. Relative Fold Change de miRNA-4668, miR-32, miR-155 y miR-125b-1.**

Significancia estadística calculada por T-test mediante GraphPad Prism 8.0.1. ns: no significativo (p-value > 0.05), \*: significativo (p-value < 0.033), \*\*: significativo (p-value < 0.002), \*\*\*: significativo (p-value < 0.001).

El miR-4668 ([Figura 21a](#)) se encontró subexpresado en todos los estadios asintomático 20s y presintomáticos 40s. Teniendo un valor de 0.07 en el asintomático 20s, y

0.000003 en el presintomático 40s. El mismo comportamiento se mantiene para el miR-132 ([Figura 21b](#)), en el que el asintomático 20s tiene un valor de 0.43 y el presintomático 40s de 0.000005.

La expresión del miR-125b-1 ([Figura 21d](#)) es diferente en cada estadio, hay un cambio en la expresión en el estadio asintomático 30s de 2.35 y luego baja drásticamente en el estadio presintomático 40s a 0.0000048.



**Figura 22. Relative Fold Change de miR-9.**

Significancia estadística calculada por T-test mediante GraphPad Prism 8.0.1. ns: no significativo (p-value > 0.05), \*: significativo (p-value < 0.033, \*\*: significativo (p-value < 0.002), \*\*\*: significativo (p-value < 0.001).

Por último, se muestra la cuantificación del miR-9 ([Figura 22](#)). Este miRNA no logró ser detectado en el grupo asintomático 20s ni presintomático 40s, y en el grupo asintomático 30s en el que se muestra que no hubo un cambio en la expresión de este miRNA con un valor de 1.91.

Otro de los miRNAs que se evaluó fue el miR-548f-3, la forma madura del miR-548f5, sin embargo, este no logró ser amplificado.

Posteriormente se identificaron los miRNAs que estaban diferencialmente expresados en cada estadio (Tabla IV). De manera global, se encontraron 11 miRNAs DE con diferentes perfiles de expresión en cada uno de los estadios.

Para poder identificar un cambio de expresión, se consideró un cambio en la expresión (RFC) mayor a 2 o menor a 0.5. Bajo estos criterios, se identificaron 4 miRNAs DE en el grupo asintomático 20s, de los cuales 3 estaban subexpresados (miR-3142, miR-4668 y miR-132) y únicamente uno sobreexpresado (miR-146a). En el asintomático 30s hay un total de 6 miRNAs DE de los cuales 4 estaban subexpresados (miR-4521, miR-147b, miR-146a, miR-155) y 2 sobreexpresados (miR-3142 y miR-125b-1). El patrón que se observó en los dos últimos grupos se mantiene para el grupo presintomático 40s, en el que al igual que en los anteriores, hay un aumento en la cantidad de miRNAs DE, y en su mayoría son miRNAs subregulados. De los 10 que se encontraron, 4 estaban sobreexpresados (miR-4521, miR-32, miR-147b y miR-4540) y 6 estaban subexpresados (miR-146a, miR-1178, miR-4668, miR-132, miR-155 y miR-125b-1). Estos datos se concentran en la Tabla IV.

**Tabla IV. miRNAs validados diferencialmente expresados por edad.**

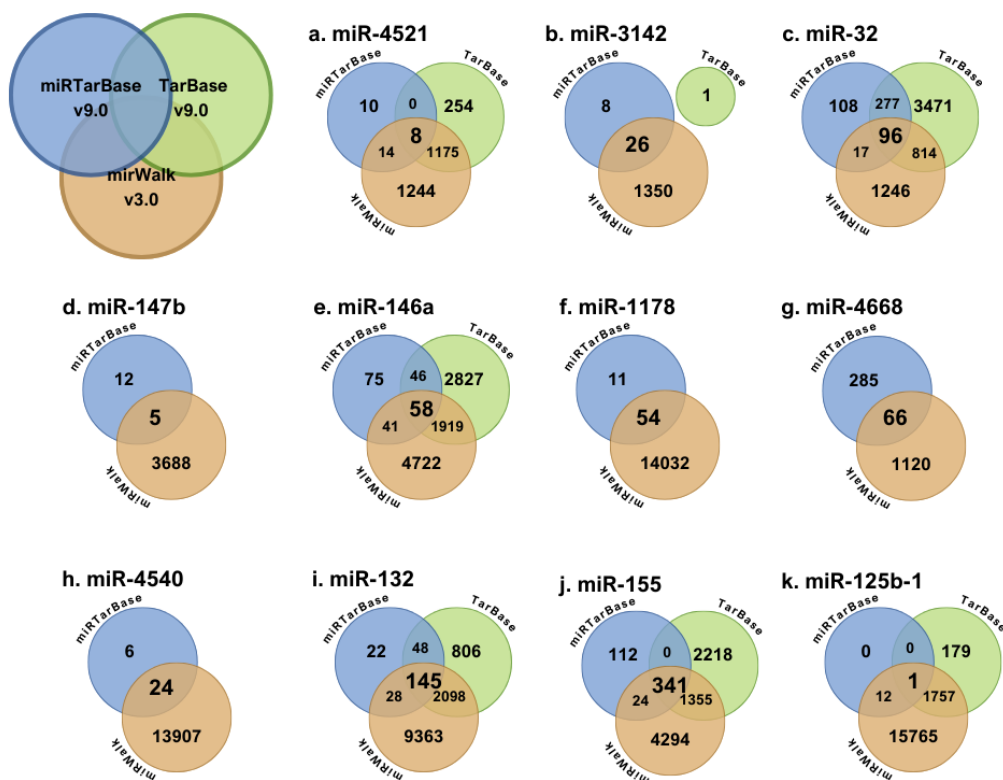
Edad	20s	30s	40s	Global
<b>miRNAs</b>	miR-3142 (↓) miR-146a (↑) miR-4668 (↓) miR-132 (↓)	miR-4521(↓) miR-3142 (↑) miR-147b (↓) miR-146a (↓) miR-155 (↓) miR-125b-1 (↑)	miR-4521 (↑) miR-32 (↑) miR-147b (↑) miR-146a (↓) miR-1178 (↓) miR-4540 (↑) miR-4668 (↓) miR-132 (↓) miR-155 (↓) miR-125b-1 (↓)	miR-4521 miR-32 miR-3142 miR-147b miR-146a miR-1178 miR-4540 miR-4668 miR-132 miR-155 miR-125b-1
<b>Total</b> (Up,Down)	<b>4</b> (1,3)	<b>6</b> (2,4)	<b>10</b> (4,6)	<b>11</b>

↑: Sobreexpresados, ↓:Subexpresados

Una vez identificados aquellos miRNAs que presentaron un cambio en su expresión en cada uno de los estadios (asintomático 20s, asintomático 30s y presintomático 40s), se identificaron los genes blancos en tres distintas bases de datos de datos validados experimentalmente: miRTarBase v9.0, TarBase v9.0 y miRWalk. Para poder curar los

datos, se buscaron mediante diagramas de Venn aquellos genes blancos que se compartían entre las tres bases de datos o dos en defecto. Estos resultados se muestran en la [Figura 23](#) y los genes blanco de cada una de las intersecciones que se usaron se encuentran listados en anexos ([Anexo VI](#)).

Como se puede observar en la Figura 23 ([Figura 23d, f, g y h](#)), algunos de los miRNAs no se encontraron en la base de datos TarBase, por lo que para estos se decidió hacer el curado de datos con los blancos encontrados en miRTarBase y mirWalk. Por otra parte, el miR-3142 ([Figura 23b](#)) tenía un solo blanco reportado en TarBase, por lo que para este se consideraron aquellos que se encontraron en  $\text{miRTarBase} \cap \text{mirWalk}$  y agregar aquel encontrado en TarBase.



**Figura 23. Genes blanco para los miRNAs encontrados en bases de datos miRTarBase, TarBase y mirWalk.**

Datos recuperados el día 30 de Julio de 2024.

Con los genes blanco, encontrados ([Anexo VI](#)), se hizo el análisis bioinformático de vías y la ontología de genes (GO) en DAVID para cada uno de los estadios de la enfermedad con los miRNAs DE en cada uno de ellos y el global considerando todos

los miRNAs DE (Figura 24-27; Tabla V-VIII); los genes involucrados en cada una de las vías se encuentran listados en anexos ([Anexo VII-X](#)). Además, se hizo el análisis de vías para cada uno de los miRNAs en dos distintos analizadores de vías: KEGG vía DAVID y miRPath v4.0 ([Anexo XI](#)).

Para el filtrado de resultados en KEGG *pathways* se muestran únicamente 15 términos, y se tomaron aquellos cinco primeros procesos/vías/términos que se obtuvieran en la búsqueda y los diez restantes se consideraron aquellos más relacionados con la patología de Alzheimer, con un *p-value* < 0.05. Este mismo filtrado se hizo para la GO de *biological process*. Para hacer el filtrado de GO *cellular component* y *molecular feature* se tomaron los primeros cuatro términos obtenidos en el análisis y los otros cuatro se seleccionaron por su relación con la patología de la EA, considerando a todos estos con un *p-value* < 0.05.

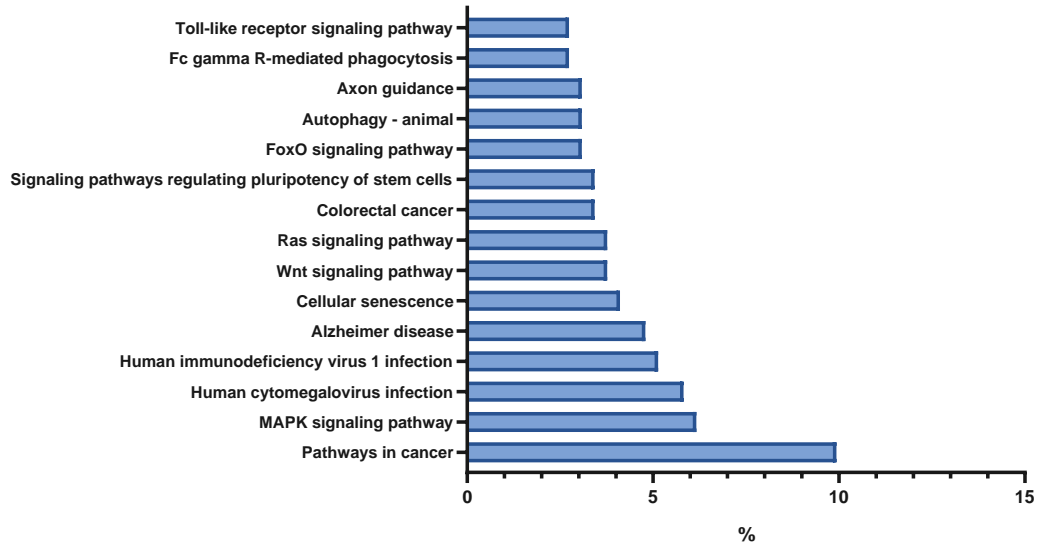
Se hizo además el análisis de redes de miRNAs para cada uno de los estadios y de manera global en miRNet 2.0 considerando los miRNAs descritos en la [Tabla IV](#). La elección de los blancos se hizo eligiendo a miRTarBase v9.0.



# ASINTOMÁTICO 20S

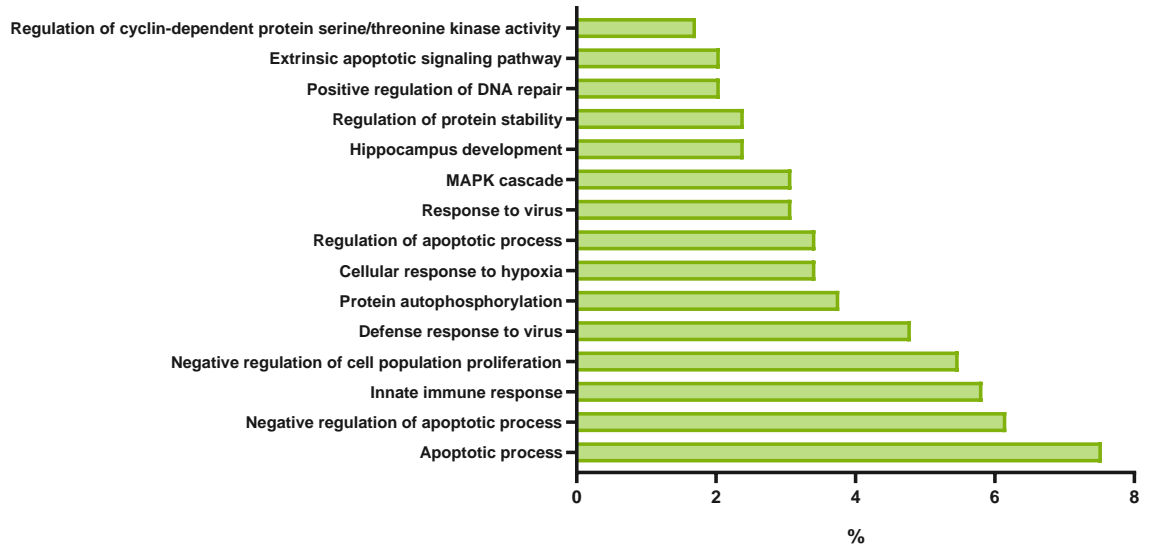
a.

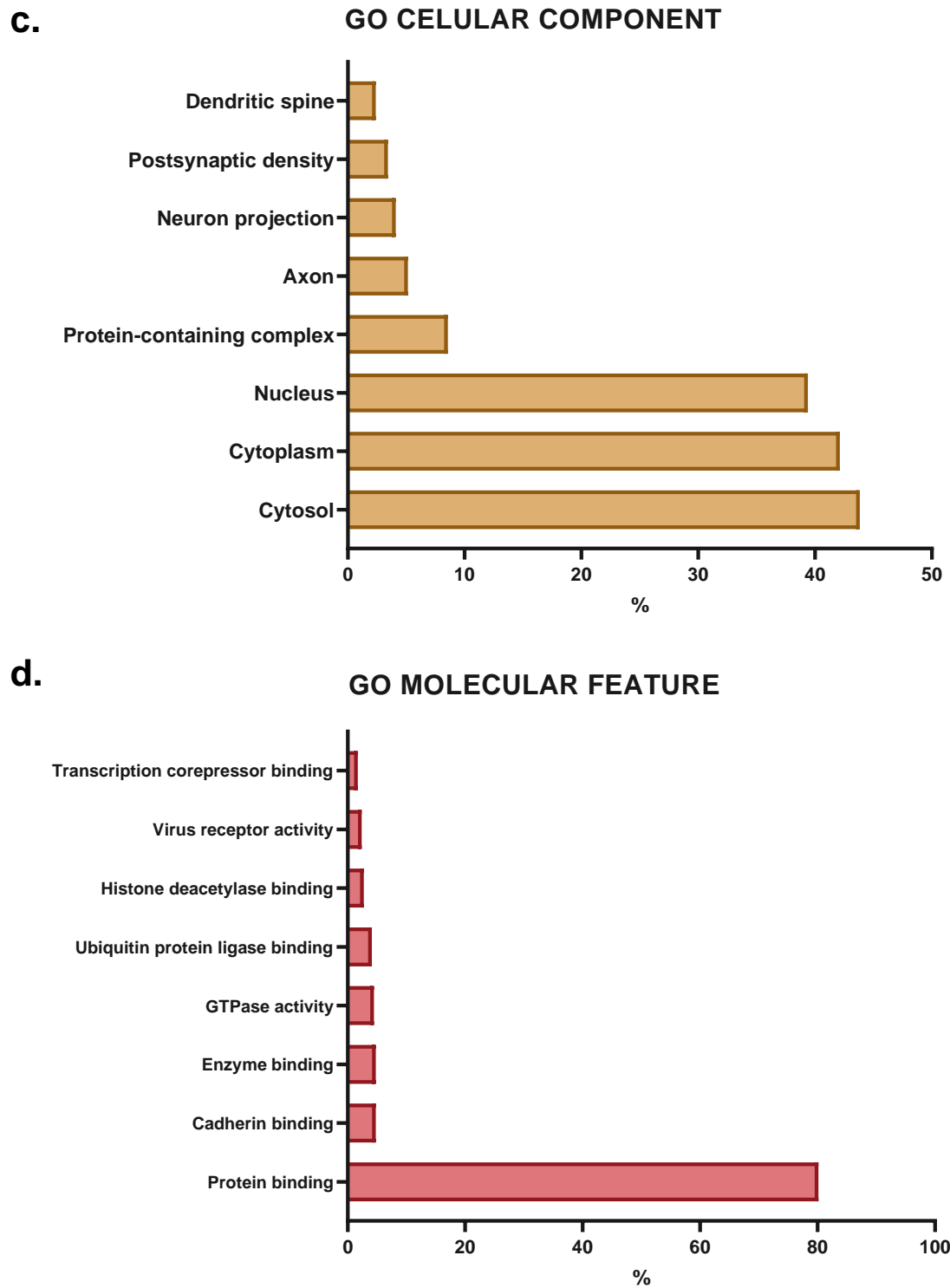
## KEGG PATHWAYS



b.

## GO BIOLOGICAL PROCESS





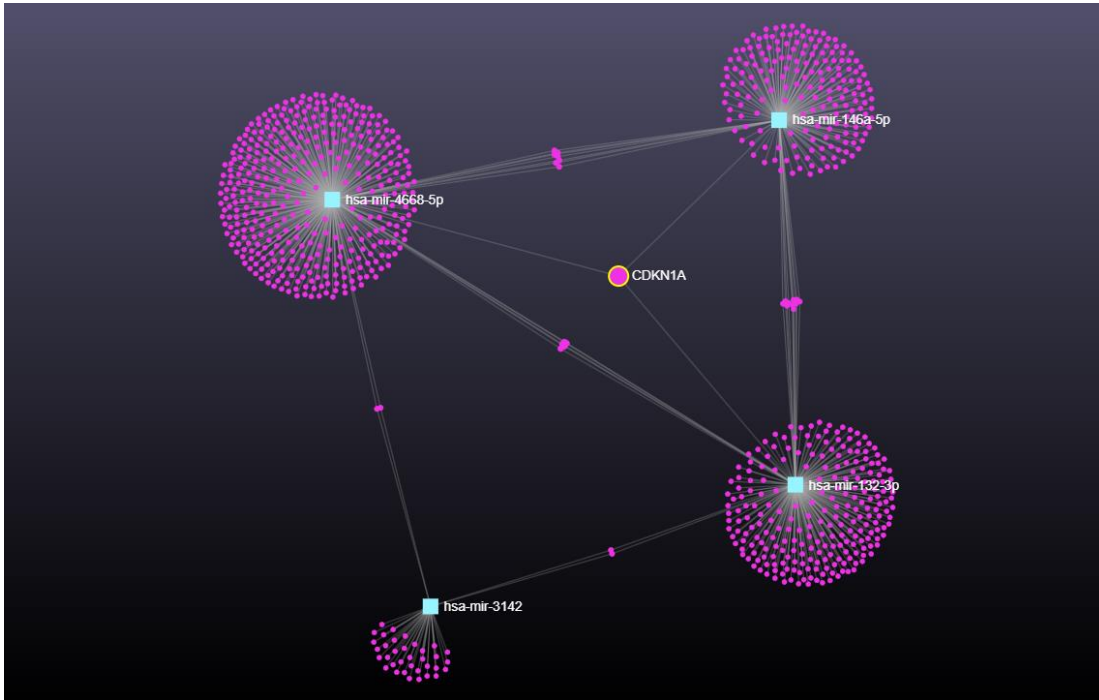
**Figura 24. Análisis KEGG y GO del estadio asintomático 20s.**  
 a) Análisis de vías KEGG, *Gene Ontology* de b) Procesos Biológicos, c) Componentes Celulares y d) Características Moleculares. El análisis se hizo en DAVID v2024q2 el día 31 de julio de 2024.

**Tabla V. Análisis de vías KEGG y GO para el estadio asintomático 20s.**

<b>n</b>	<b>Término</b>	<b>%</b>	<b><i>P value</i></b>	<b><i>Fold enrichment</i></b>
<b>KEGG PATHWAY</b>				
<b>1</b>	Pathways in cancer	9.93	1.0026E-07	3.12
<b>2</b>	Human cytomegalovirus infection	5.82	1.6774E-06	4.31
<b>3</b>	MAPK signaling pathway	6.16	1.5824E-05	3.44
<b>4</b>	Colorectal cancer	3.42	1.7871E-05	6.59
<b>5</b>	Human immunodeficiency virus 1 infection	5.13	1.8083E-05	4.04
<b>6</b>	Cellular senescence	4.10	8.3336E-05	4.38
<b>7</b>	Wnt signaling pathway	3.76	0.00085605	3.62
<b>8</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3.42	0.0008583	3.98
<b>9</b>	Fc gamma R-mediated phagocytosis	2.73	0.00150478	4.68
<b>10</b>	FoxO signaling pathway	3.08	0.00201919	3.91
<b>11</b>	Insulin signaling pathway	3.08	0.00266723	3.74
<b>12</b>	Toll-like receptor signaling pathway	2.73	0.00276834	4.21
<b>13</b>	Ras signaling pathway	3.76	0.0082496	2.65
<b>14</b>	Autophagy - animal	3.08	0.00896583	3.05
<b>15</b>	Axon guidance	3.08	0.014471	2.80
<b>GO BIOLOGICAL PROCESS</b>				
<b>1</b>	Defense response to virus	4.79	3.5165E-05	4.16
<b>2</b>	Protein autophosphorylation	3.76	5.1221E-05	5.22
<b>3</b>	Apoptotic process	7.53	0.00011104	2.62
<b>4</b>	Response to virus	3.08	0.0001662	5.78
<b>5</b>	Cellular response to hypoxia	3.42	0.00018746	4.98
<b>6</b>	MAPK cascade	3.08	0.00042001	5.05
<b>7</b>	Positive regulation of DNA repair	2.05	0.00050609	9.02
<b>8</b>	Hippocampus development	2.39	0.00053111	6.87
<b>9</b>	Extrinsic apoptotic signaling pathway	2.05	0.000884	8.00
<b>10</b>	Negative regulation of apoptotic process	6.16	0.00090629	2.51
<b>11</b>	Negative regulation of cell population proliferation	5.47	0.0013327	2.60
<b>12</b>	Regulation of protein stability	2.39	0.00161946	5.56
<b>13</b>	Innate immune response	5.82	0.00403592	2.24
<b>14</b>	Regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	1.71	0.00427231	7.52
<b>15</b>	Regulation of apoptotic process	3.42	0.00489087	3.12
<b>GO CELULAR COMPONENT</b>				
<b>1</b>	Cytosol	43.83	9.5521E-11	1.66
<b>2</b>	Cytoplasm	42.12	1.4384E-08	1.56
<b>3</b>	Protein-containing complex	8.561	2.3312E-05	2.67
<b>4</b>	Nucleus	39.38	8.2001E-05	1.36

5	Axon	5.136	0.00075271	2.89
6	Neuron projection	4.109	0.00550226	2.68
7	Postsynaptic density	3.424	0.00638125	3.00
8	Dendritic spine	2.397	0.02361099	3.16
<b>GO MOLECULAR FEATURE</b>				
1	Protein binding	80.13	1.2618E-09	1.24
2	Virus receptor activity	2.39	0.00116204	5.92
	Cadherin binding	4.79	0.00145517	2.83
4	Histone deacetylase binding	2.73	0.00342422	4.10
5	Enzyme binding	4.79	0.00360748	2.54
6	Transcription corepressor binding	1.71	0.00577948	6.91
7	Ubiquitin protein ligase binding	4.10	0.00654717	2.61
8	GTPase activity	4.45	0.00668539	2.47

GO: *gene ontology*



**Figura 25. Redes de miRNAs del estadio asintomático 20s.**

El cuadro en color azul muestran a los miRNAs: lado superior izquierdo miR-4668, lado superior derecho miR-146a, lado inferior izquierdo miR-3142 y lado inferior derecho miR-132. En color rosa se muestran los genes relacionados y los nódulos representan a aquellos genes compartidos entre los miRNAs.

En el estado asintomático joven (20s), se presentó la mayor cantidad de vías asociadas a alguna familia de proteínas ([Figura 24a](#)) como a MAPK, FoxO, Ras o Wnt. También hubo algunas vías asociadas a la respuesta a virus, a la inmunidad innata y otras relacionadas con procesos celulares como la senescencia celular, pluripotencia de células troncales y una vía asociada con la EA.

En la GO de procesos biológicos ([Figura 24b](#)), este estadio (20s), presentó en su mayoría procesos asociados con vías de proliferación celular y apoptosis, algunas relacionadas con el procesamiento de proteínas, algunos procesos asociados también a ciertas familias de proteínas, y hubo uno asociado al desarrollo del hipocampo.

En el GO de componente celulares ([Figura 24c](#)), se pudo identificar que muchos de los genes blanco estaban asociados a citoplasma, otra gran parte a núcleo, y otros de ellos estaban asociados a distintos compartimentos neuronales.

En las características moleculares ([Figura 24d](#)), se puede observar que la mayoría están asociadas a proteínas; unión de enzimas, actividad GTPasa, unión de ubiquitina y otras relacionadas con la actividad transcripcional.

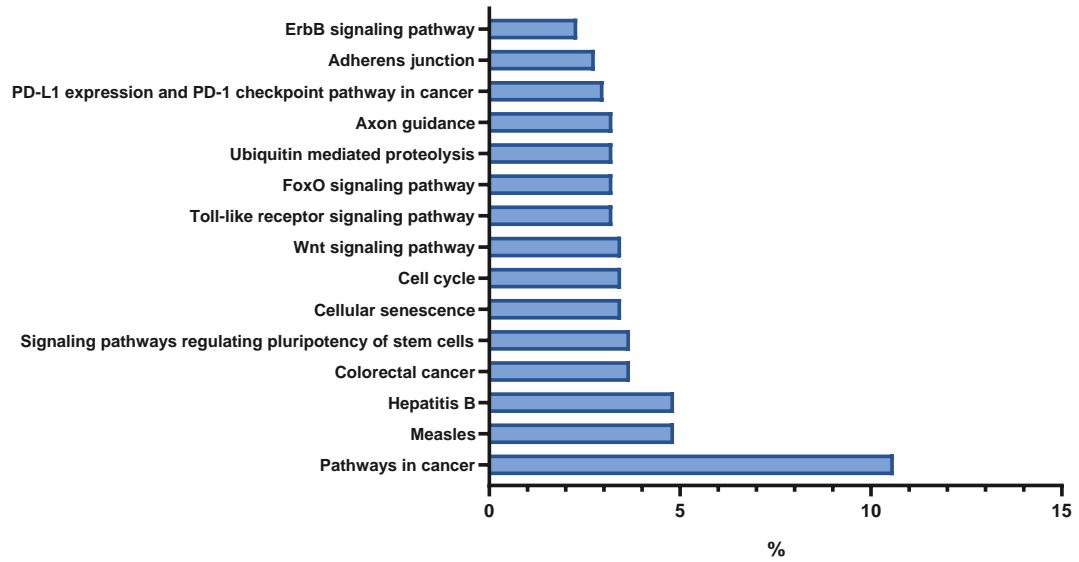
En la Tabla V. se muestran los porcentajes de genes involucrados en los respectivos términos, el *p-value* y la tasa de enriquecimiento de cada una de las vías, además, en anexos ([Anexo VII](#)) se muestra la lista detallada de los genes involucrados en cada uno de ellos.

En el análisis de redes ([Figura 25](#)), se muestran los cuatro miRNAs que se encontraban diferencialmente expresados en el estadio asintomático 20s. En él, se observa cada uno de los cuatro miRNAs en distintas esquinas, con un solo gen blanco en común entre ellos: CDKN1A. Este blanco esta compartido entre miR-4668, miR-146a y miR-132.

# ASINTOMÁTICO 30S

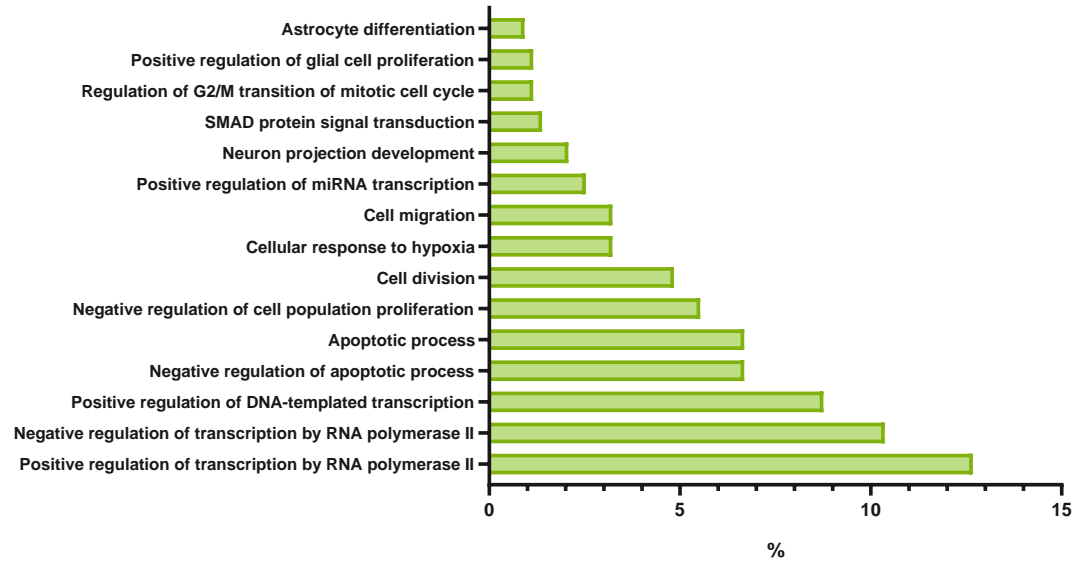
a.

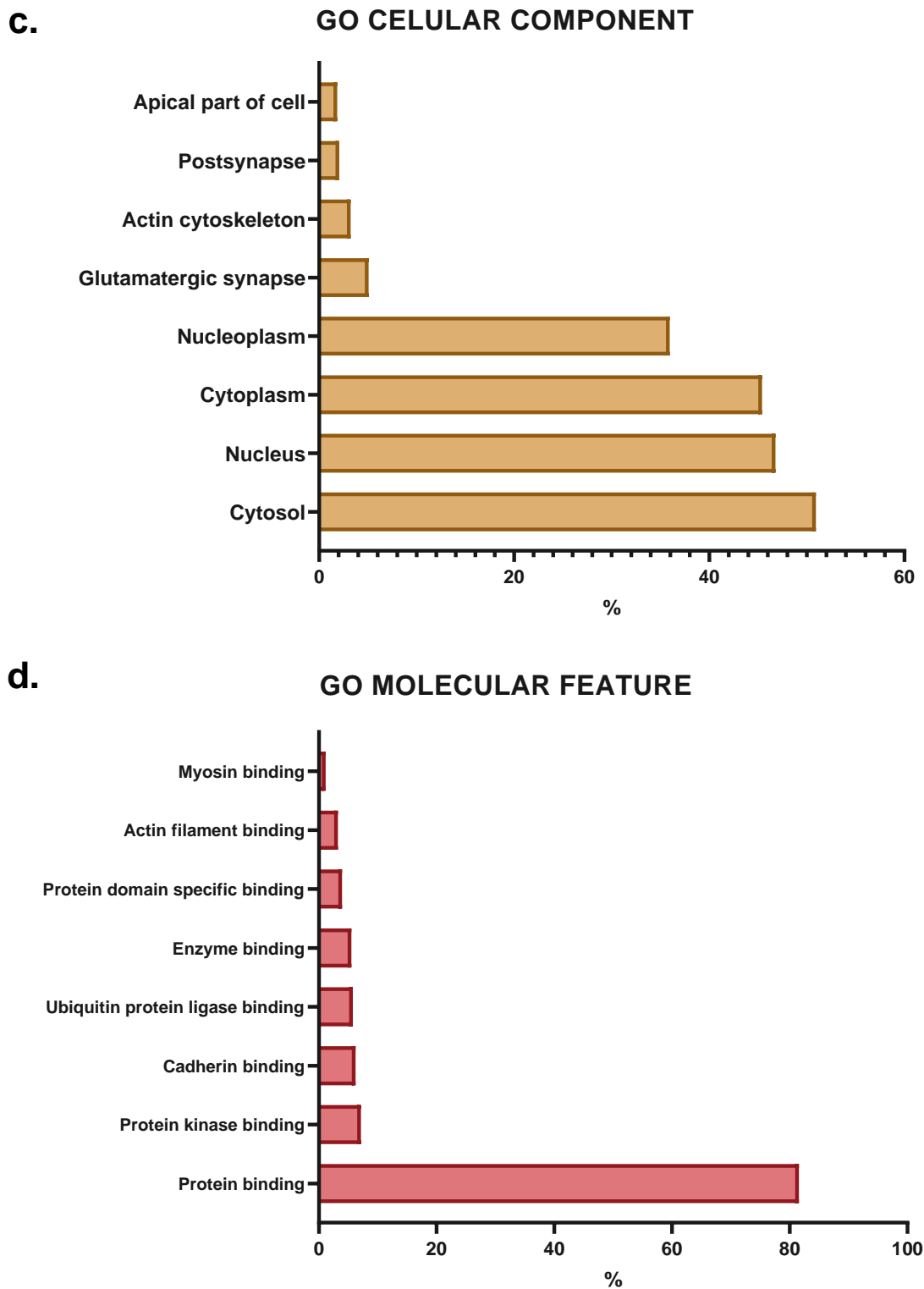
## KEGG PATHWAYS



b.

## GO BIOLOGICAL PROCESS





**Figura 26. Análisis KEGG y GO del estadio asintomático 30s.**  
a) Análisis de las vías KEGG, Gene Ontology de b) Procesos Biológicos, c) Componentes Celulares y d) Características Moleculares. El análisis se hizo en DAVID v2024q2 el día 31 de julio de 2024.

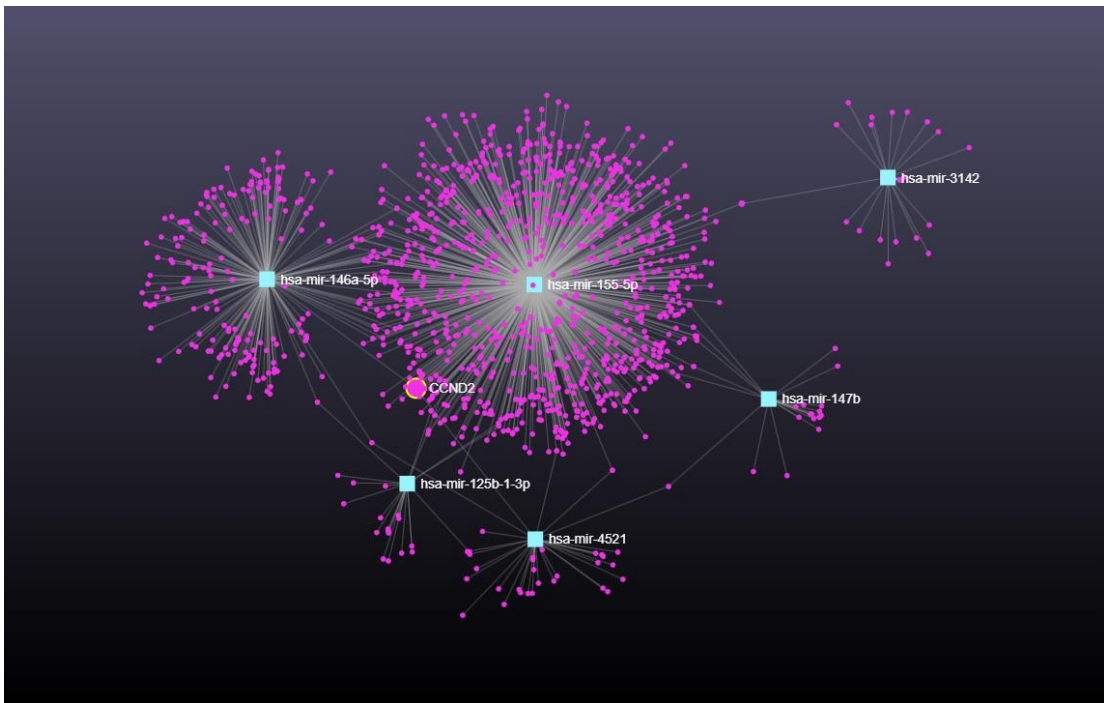
**Tabla VI. Análisis de vías KEGG y GO para el estadio asintomático 30s.**

<b>n</b>	<b>Termino</b>	<b>%</b>	<b>P value</b>	<b>Fold enrichment</b>
<b>KEGG PATHWAYS</b>				
<b>1</b>	Pathways in cancer	10.59	1.3428E-11	3.07
<b>2</b>	Measles	4.83	1.431E-09	5.38
<b>3</b>	Colorectal cancer	3.68	1.4142E-08	6.55
<b>4</b>	Hepatitis B	4.83	2.3704E-08	4.59
<b>5</b>	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	2.99	6.8716E-06	5.14
<b>6</b>	Toll-like receptor signaling pathway	3.22	9.9351E-06	4.57
<b>7</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3.68	1.107E-05	3.96
<b>8</b>	Adherens junction	2.76	5.226E-05	4.59
<b>9</b>	FoxO signaling pathway	3.22	7.7402E-05	3.78
<b>10</b>	Cellular senescence	3.45	0.00012172	3.40
<b>11</b>	Cell cycle	3.45	0.00013029	3.38
<b>12</b>	Ubiquitin mediated proteolysis	3.22	0.00016323	3.51
<b>13</b>	Wnt signaling pathway	3.45	0.00035763	3.07
<b>14</b>	ErbB signaling pathway	2.30	0.00063245	4.14
<b>15</b>	Axon guidance	3.22	0.0019183	2.71
<b>GO BIOLOGICAL FEATURE</b>				
<b>1</b>	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	12.67	3.8154E-07	2.08
<b>2</b>	Positive regulation of DNA-templated transcription	8.75	3.9849E-07	2.54
<b>3</b>	Positive regulation of miRNA transcription	2.53	4.286E-07	8.73
<b>4</b>	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	10.366	1.0302E-06	2.22
<b>5</b>	Negative regulation of apoptotic process	6.68	3.3755E-06	2.72
<b>6</b>	Cellular response to hypoxia	3.22	9.2696E-06	4.69
<b>7</b>	Negative regulation of cell population proliferation	5.52	4.8185E-05	2.63
<b>8</b>	Apoptotic process	6.68	5.9168E-05	2.33
<b>9</b>	Regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	1.15	0.00011638	18.33
<b>10</b>	SMAD protein signal transduction	1.38	0.00017933	11.00
<b>11</b>	Cell division	4.83	0.00019547	2.60
<b>12</b>	Positive regulation of glial cell proliferation	1.15	0.00085313	11.34
<b>13</b>	Neuron projection development	2.07	0.0045968	3.45
<b>14</b>	Astrocyte differentiation	0.92	0.00497463	11.21
<b>15</b>	Cell migration	3.22	0.00659555	2.37485172



GO CELULAR COMPONENT				
1	Cytosol	50.92	3.3753E-27	1.90
2	Nucleoplasm	35.94	7.3363E-17	1.88
3	Cytoplasm	45.39	4.5558E-16	1.66
4	Nucleus	46.77	8.698E-15	1.59
5	Glutamatergic synapse	5.06	0.00025951	2.47
6	Apical part of cell	1.84	0.00110675	4.98
7	Actin cytoskeleton	3.22	0.00562955	2.42
8	Postsynapse	2.07	0.00952251	3.05
GO MOLECULAR FEATURE				
1	Protein binding	81.56	3.984E-15	1.25
2	Cadherin binding	6.22	3.1952E-08	3.64
3	Ubiquitin protein ligase binding	5.76	1.2127E-07	3.63
4	Protein kinase binding	7.14	8.7759E-07	2.79
5	Enzyme binding	5.52	9.7175E-06	2.91
6	Protein domain specific binding	3.91	2.7439E-05	3.54
7	Actin filament binding	3.22	0.00243396	2.67
8	Myosin binding	1.15	0.00459108	7.29

GO: *gene ontology*



**Figura 27. Redes de miRNAs del estadio asintomático 30s.**

En el cuadro de color azul se muestran los miRNAs, de izquierda a derecha en la parte superior miR-146a, miR-155, miR-3142 y de izquierda a derecha en la parte inferior miR-125b, miR-4521 y miR-147b. En color rosa se muestran los genes y los nódulos más grandes representan aquellos genes compartidos entre los miRNAs.

En el estadio asintomático 30s, se encontró una mayor variedad de vías que en el de 20s, en la que además de estar las vías asociadas a alguna familia de proteínas ([Figura 26a](#)), se encontraron algunas relacionadas con procesos celulares, y la vía en común con todos los estadios, “Pathways in cancer”, se observa aquí con mayor representación, es decir, en este estadio existen más vías relacionadas con cáncer.

En la GO de procesos biológicos ([Figura 26b](#)), este estadio (30s), presentó en su mayoría procesos asociados con vías de proliferación celular, apoptosis y regulación de la transcripción, hubo mayor cantidad de procesos relacionados con el sistema nervioso, como diferenciación de astrocitos, regulación positiva de células gliales y desarrollo de proyecciones neuronales, y también se encontró un proceso de regulación positiva de la transcripción de miRNAs.

En el GO de componente celulares ([Figura 26c](#)), se pudo identificar que muchos de los genes blanco estaban asociados a citosol, citoplasma y núcleo, y otros de ellos estaban asociados a distintos compartimentos neuronales.

En las características moleculares ([Figura 26d](#)), se puede observar que todas están asociadas a unión de proteínas; unión de enzimas, de ubiquitinación, de proteínas de citoesqueleto, cadherina o algunas cinasas.

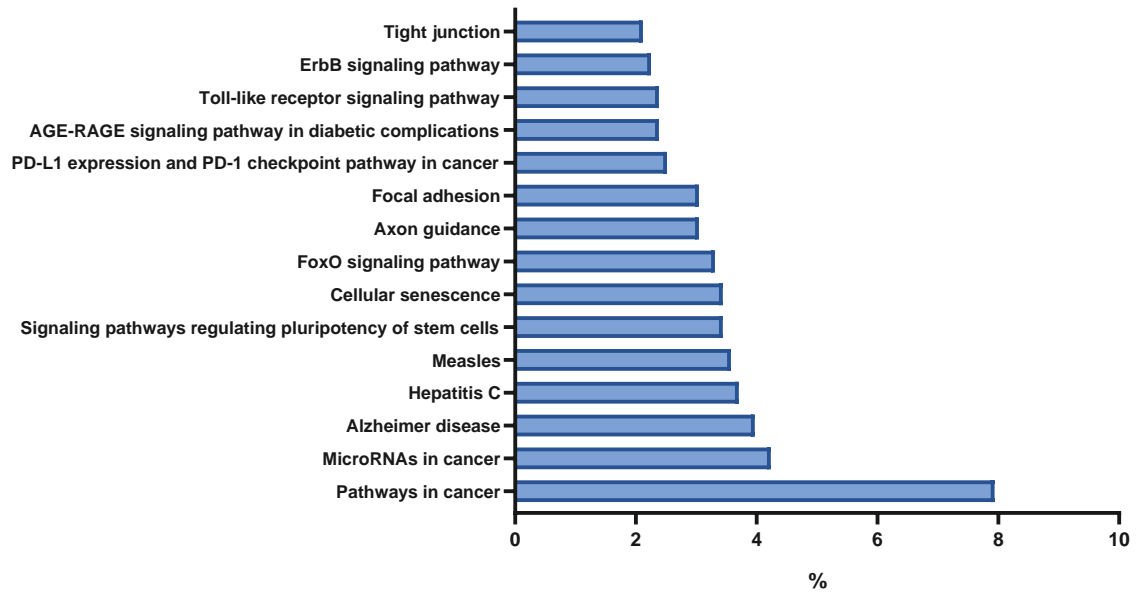
En la [Tabla VI](#), se muestran los porcentajes de genes involucrados en los respectivos términos, el *p-value* y la tasa de enriquecimiento de cada uno de los términos, además, en anexos ([Anexo VIII](#)) se muestra la lista detallada de los genes involucrados en cada uno de ellos.

En el análisis de redes ([Figura 27](#)), se muestran los seis miRNAs que se encontraban diferencialmente expresados en el estadio asintomático 30s. En él, se observa a cada uno de los miRNAs muy separados entre sí, con un solo gen blanco en común entre ellos: CCND2. Este blanco está compartido entre miR-146a, miR-155 y miR-4521.

# PRESINTOMÁTICO 40S

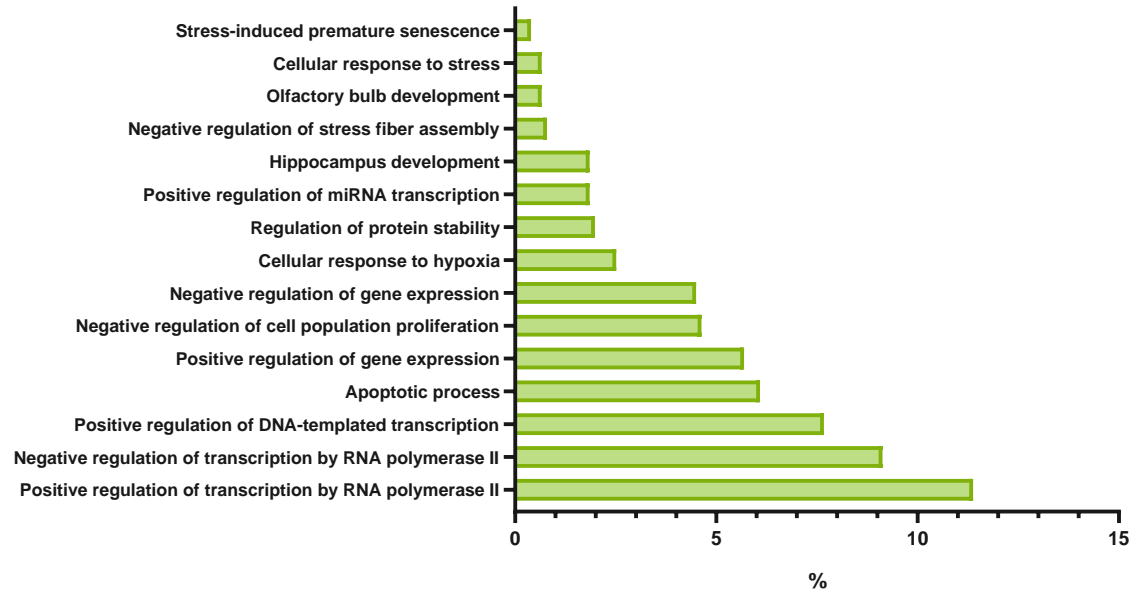
a.

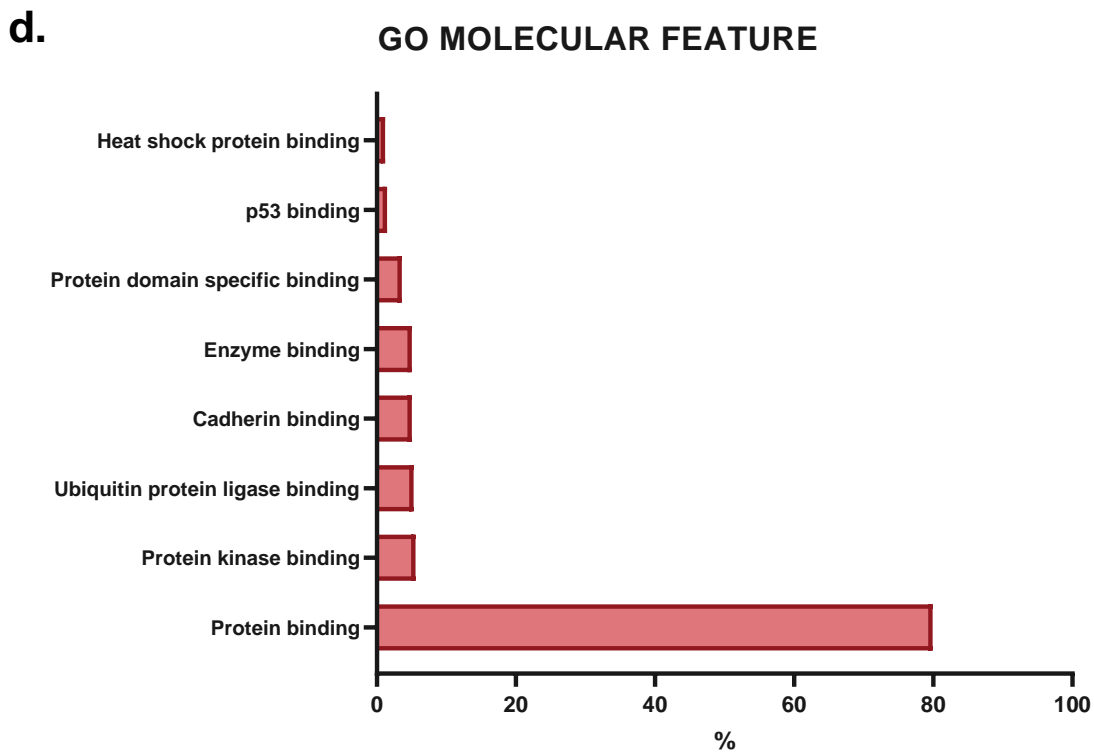
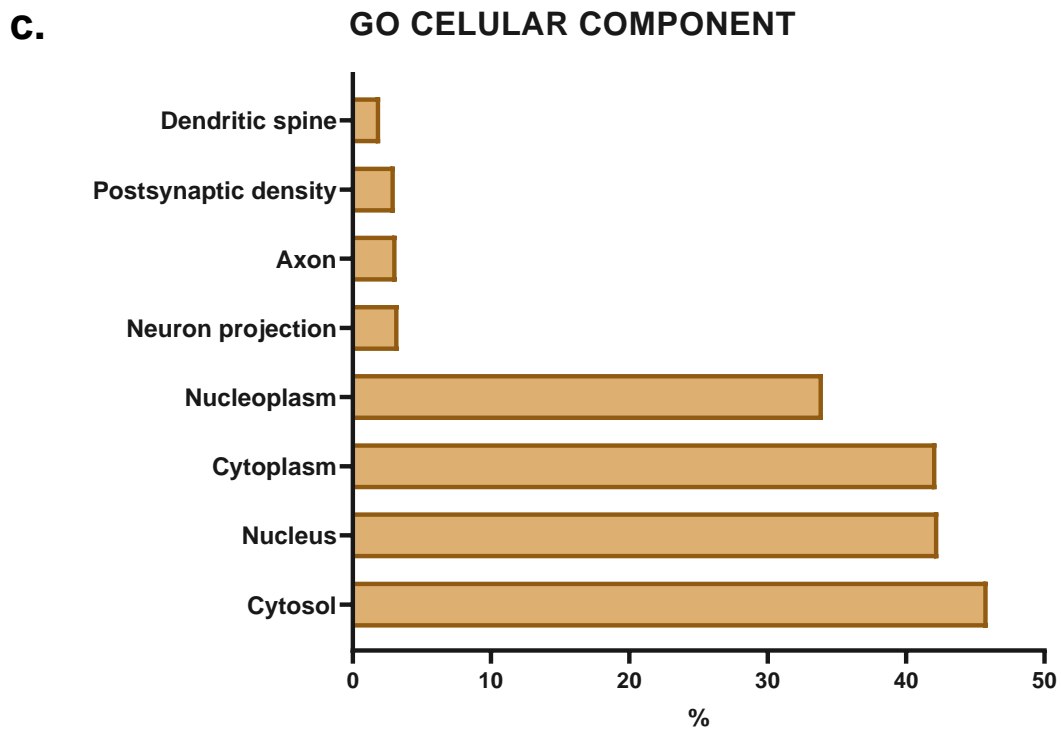
## KEGG PATHWAYS



b.

## GO BIOLOGICAL PROCESS





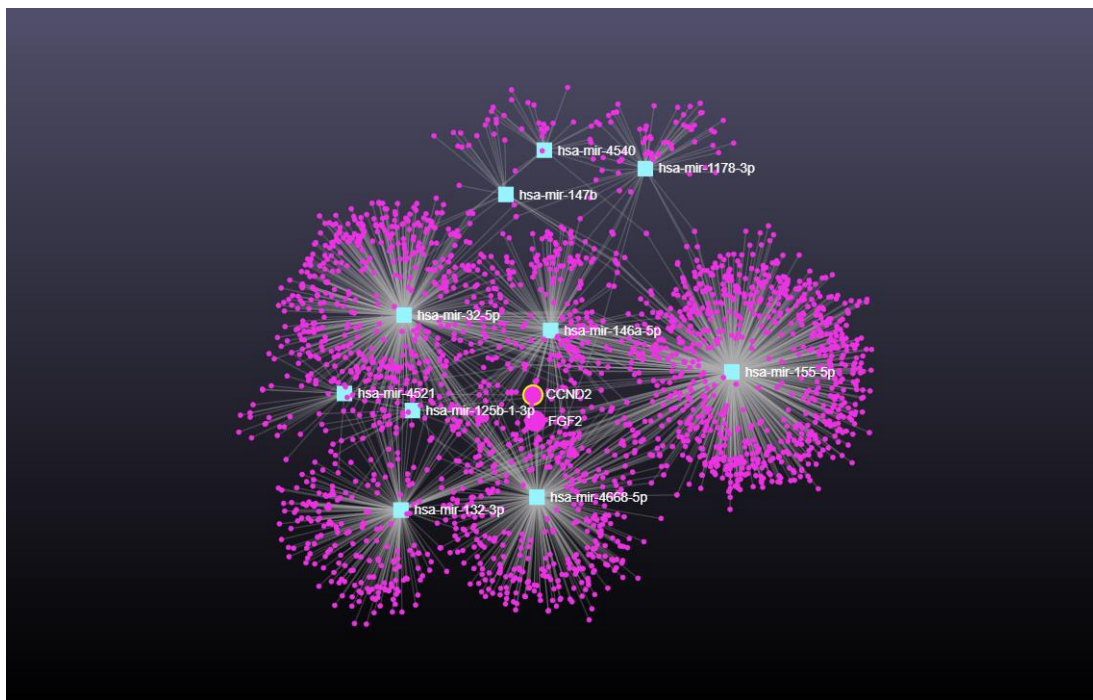
**Figura 28. Análisis KEGG y GO del estadio presintomático 40s.**  
 a) Análisis de vías KEGG, Gene Ontology de b) Procesos Biológicos, c) Componentes Celulares y d) Características Moleculares. El análisis se hizo en DAVID v2024q2 el día 31 de julio de 2024.

**Tabla VII. Análisis de vías KEGG y GO para el estadio presintomático 40s.**

<b>n</b>	<b>Termino</b>	<b>%</b>	<b><i>P value</i></b>	<b><i>Fold enrichment</i></b>
<b>KEGG PATHWAYS</b>				
1	Pathways in cancer	7.93	6.8569E-11	2.48
2	Measles	3.57	4.5078E-10	4.29
3	Hepatitis C	3.70	1.9618E-09	3.89
4	FoxO signaling pathway	3.30	3.8943E-09	4.18
5	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3.43	4.9478E-09	3.99
6	Cellular senescence	3.43	3.0268E-08	3.65
7	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	2.51	7.8224E-08	4.66
8	ErbB signaling pathway	2.24	1.1636E-06	4.36
9	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	2.38	2.3227E-06	3.93
10	Toll-like receptor signaling pathway	2.38	6.7996E-06	3.64
11	Axon guidance	3.04	2.6455E-05	2.76
12	MicroRNAs in cancer	4.23	2.7935E-05	2.26
13	Focal adhesion	3.04	0.00011815	2.50
14	Alzheimer disease	3.96	0.00568826	1.69
15	Tight junction	2.11	0.00983723	2.08
<b>GO BIOLOGICAL FEATURE</b>				
1	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	11.37	2.4364E-08	1.87
2	Positive regulation of DNA-templated transcription	7.67	2.6928E-08	2.22
3	Negative regulation of gene expression	4.49	4.0995E-08	2.99
4	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	9.12	1.4834E-07	1.95
5	Positive regulation of miRNA transcription	1.85	1.9646E-07	6.37
6	Positive regulation of gene expression	5.68	8.246E-07	2.30
7	Hippocampus development	1.85	1.8008E-06	5.31
8	Apoptotic process	6.08	3.2332E-06	2.12
9	Regulation of protein stability	1.98	4.0196E-06	4.60
10	Cellular response to hypoxia	2.51	4.3926E-06	3.65
11	Negative regulation of cell population proliferation	4.62	2.7009E-05	2.20
12	Olfactory bulb development	0.66	0.00643929	6.50
13	Negative regulation of stress fiber assembly	0.79	0.00742003	4.82
14	Stress-induced premature senescence	0.39	0.00761524	20.49
15	Cellular response to stress	0.66	0.00764638	6.21
<b>GO CELULAR COMPONENT</b>				

1	Cytosol	45.89	1.6771E-31	1.72
2	Nucleoplasm	33.99	1.1578E-23	1.79
3	Cytoplasm	42.19	2.8657E-20	1.55
4	Nucleus	42.32	1.8784E-15	1.45
5	Postsynaptic density	3.04	6.3758E-05	2.64
6	Neuron projection	3.30	0.00071124	2.14
7	Dendritic spine	1.98	0.00196134	2.60
8	Axon	3.17	0.00958197	1.77
<b>GO MOLECULAR FEATURE</b>				
1	Protein binding	79.89	8.4472E-23	1.24
2	Ubiquitin protein ligase binding	5.29	6.4847E-11	3.36
3	Cadherin binding	5.02	6.9978E-09	2.97
4	Enzyme binding	5.02	1.0965E-07	2.67
5	Protein domain specific binding	3.57	2.5019E-07	3.25
6	Protein kinase binding	5.55	4.1242E-06	2.19
7	p53 binding	1.45	0.00034423	4.05
8	Heat shock protein binding	1.19	0.00235688	3.80

GO: *gene ontology*



**Figura 29. Redes de miRNAs del estadio presintomático 40s.**

En el cuadro de color azul se muestran los miRNAs: miR-4540, miR-147b, miR-1178, miR-32, miR-146a, miR-155, miR-4521, miR-125b, miR-132, miR-4668. En color rosa se muestran los genes y los nódulos más grandes representan aquellos genes compartidos entre los miRNAs.

En este estadio presintomático 40s ([Figura 28a](#)), se encontró una variedad relativamente similar de vías a la del asintomático de 30s, pero se puede empezar a observar que existe un aumento en vías relacionadas a uniones celulares como son las

de uniones estrechas y focales. Nuevamente se encontró una vía de la enfermedad de Alzheimer, e interesantemente una de microRNAs en cáncer.

En la GO de procesos biológicos ([Figura 28b](#)), se empieza a observar una mayor variación en el enriquecimiento de procesos, ya que se empiezan a observar algunos relacionados con el estrés celular; vías de respuesta a estrés celular, senescencia prematura inducida por estrés, entre otras. Se conservan también las vías de regulación de la transcripción y de apoptosis.

En el GO de componente celulares ([Figura 28c](#)), se mantuvo similar a las del estadio anterior (30s), en el que se identificaron que los genes blanco estaban asociados a citosol, citoplasma y núcleo, y otros de ellos estaban asociados a distintos compartimentos neuronales.

Al igual que en el estadio anterior, en las características moleculares ([Figura 28d](#)) se pudo observar que todas están asociadas a unión de proteínas, de unión a p53 y de proteínas de choque térmico.

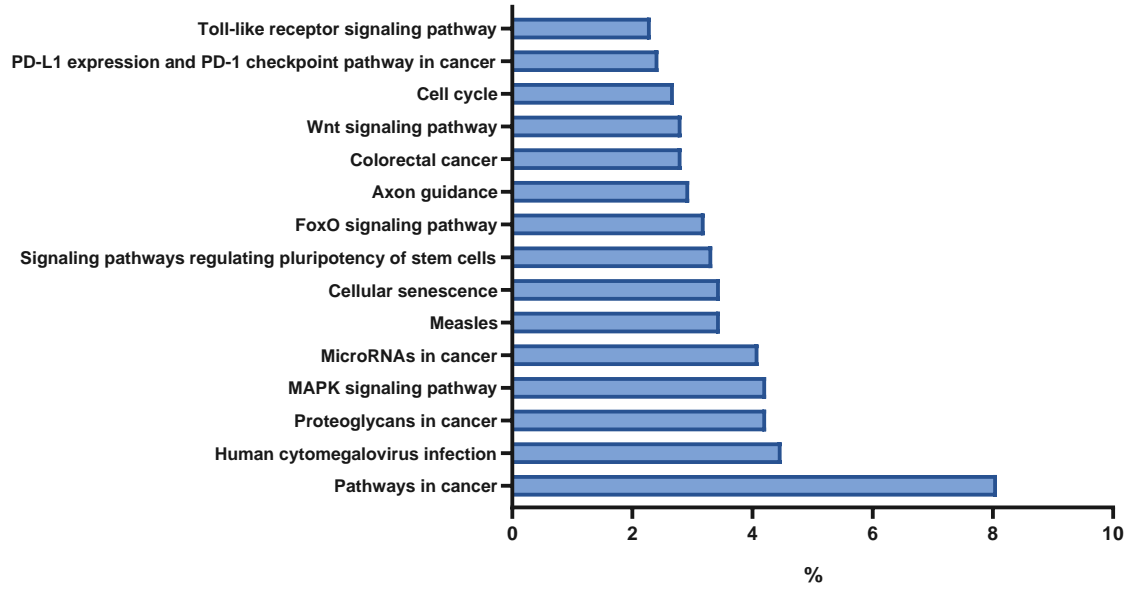
En la Tabla VII, se muestran los porcentajes de genes involucrados en los respectivos términos, el *p-value* y la tasa de enriquecimiento de cada uno de los términos, además, en anexos ([Anexo IX](#)), se muestra la lista detallada de los genes involucrados en cada uno de ellos.

En el análisis de redes ([Figura 29](#)), se muestran los diez miRNAs que se encontraron diferencialmente expresados en el estadio presintomático 40s. En él se observa que los miRNAs están separados entre sí con sus genes blancos cada vez más cercanos entre ellos. Hay únicamente dos genes blanco en común entre ellos: CCND2 y FGF2. CCND2 está compartido entre miR-4668, miR-146a, miR-155 y miR-4521, y FGF2 esta compartido entre miR-155, miR-132 y miR-4668.

# GLOBAL

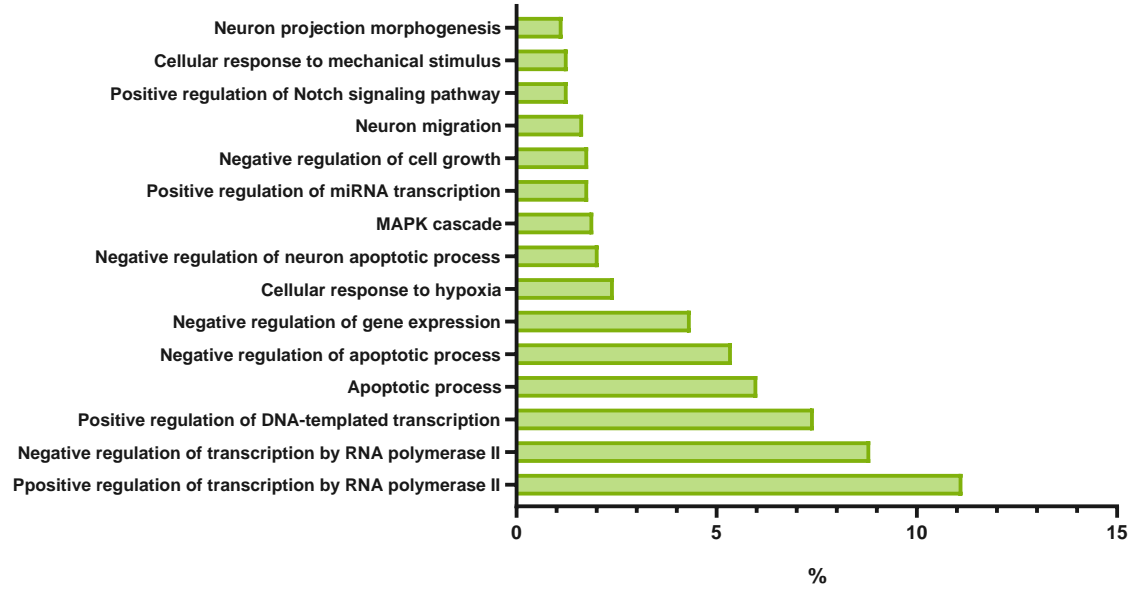
a.

## KEGG PATHWAYS

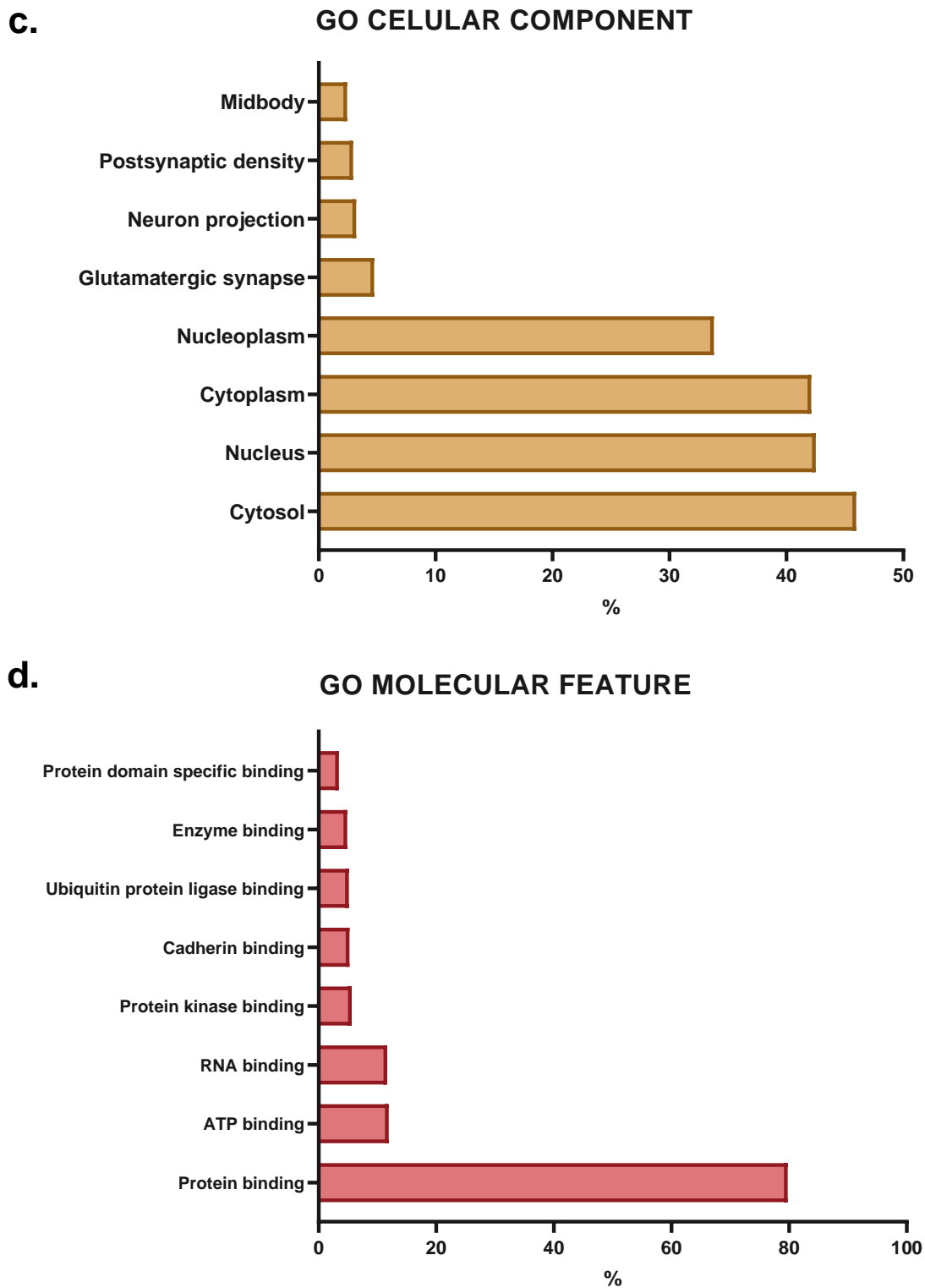


b.

## GO BIOLOGICAL PROCESS







**Figura 30. Análisis KEGG y GO de los miRNAd DE.**

a) Análisis de vías KEGG, Gene Ontology de b) Procesos Biológicos, c) Componentes Celulares y d) Características Moleculares. El análisis se hizo en DAVID v2024q2 el día 31 de julio de 2024.

**Tabla VIII. Análisis de vías KEGG y GO para los miRNAs DE.**

<b>n</b>	<b>Termino</b>	<b>%</b>	<b>P value</b>	<b>Fold enrichment</b>
<b>KEGG PATHWAYS</b>				
<b>1</b>	Pathways in cancer	8.06	1.1065E-11	2.52
<b>2</b>	Colorectal cancer	2.81	3.0322E-10	5.39
<b>3</b>	Measles	3.45	9.5002E-10	4.14
<b>4</b>	Human cytomegalovirus infection	4.48	1.0844E-09	3.30
<b>5</b>	Proteoglycans in cancer	4.22	1.1684E-09	3.45
<b>6</b>	FoxO signaling pathway	3.20	7.6934E-09	4.04
<b>7</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3.32	9.9605E-09	3.85
<b>8</b>	Cellular senescence	3.45	1.3978E-08	3.67
<b>9</b>	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	2.43	1.3183E-07	4.50
<b>10</b>	MAPK signaling pathway	4.22	9.7932E-06	2.34
<b>11</b>	Toll-like receptor signaling pathway	2.30	1.0726E-05	3.52
<b>12</b>	Cell cycle	2.68	4.3863E-05	2.83
<b>13</b>	Axon guidance	2.94	4.4718E-05	2.66
<b>14</b>	MicroRNAs in cancer	4.09	5.4041E-05	2.19
<b>15</b>	Wnt signaling pathway	2.81	5.7923E-05	2.69
<b>GO BIOLOGICAL FEATURE</b>				
<b>1</b>	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	11.13	4.9524E-08	1.83
<b>2</b>	Positive regulation of DNA-templated transcription	7.42	7.9331E-08	2.15
<b>3</b>	Negative regulation of gene expression	4.35	8.6277E-08	2.90
<b>4</b>	Positive regulation of miRNA transcription	1.79	2.8142E-07	6.18
<b>5</b>	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	8.83	4.7145E-07	1.89
<b>6</b>	Apoptotic process	6.01	3.1832E-06	2.09
<b>7</b>	Negative regulation of apoptotic process	5.37	4.0863E-06	2.19
<b>8</b>	Cellular response to hypoxia	2.43	6.7646E-06	3.54
<b>9</b>	Positive regulation of Notch signaling pathway	1.28	0.0001077	5.19
<b>10</b>	MAPK cascade	1.92	0.0002885	3.15
<b>11</b>	Negative regulation of neuron apoptotic process	2.04	0.00059727	2.80
<b>12</b>	Negative regulation of cell growth	1.79	0.00059996	3.09
<b>13</b>	Neuron migration	1.66	0.0016696	2.91
<b>14</b>	Neuron projection morphogenesis	1.15	0.00197965	3.90
<b>15</b>	Cellular response to mechanical stimulus	1.28	0.00239475	3.44

GO CELULAR COMPONENT				
1	Cytosol	45.96	8.2422E-33	1.73
2	Nucleoplasm	33.80	6.1823E-24	1.78
3	Cytoplasm	42.12	8.5346E-21	1.55
4	Nucleus	42.50	2.1868E-16	1.46
5	Glutamatergic synapse	4.73	4.4104E-06	2.33
6	Postsynaptic density	2.94	0.00010144	2.56
7	Midbody	2.43	0.00026114	2.69
8	Neuron projection	3.20	0.00110549	2.07
GO MOLECULAR FEATURE				
1	Protein binding	79.76	2.9612E-23	1.23
2	Ubiquitin protein ligase binding	5.12	1.6523E-10	3.26
3	Cadherin binding	5.24	4.2394E-10	3.10
4	Enzyme binding	4.86	2.3941E-07	2.59
5	Protein domain specific binding	3.45	4.6142E-07	3.15
6	Protein kinase binding	5.63	1.578E-06	2.22
7	RNA binding	11.65	1.1583E-05	1.58
8	ATP binding	11.90	3.6122E-05	1.53

GO: *gene ontology*



**Figura 31. Redes de miRNAs DE.**

En el cuadro de color azul se muestran los miRNAs: miR-4540, miR-147b, miR-1178, miR-32, miR-146a, miR-155, miR-4521, miR-125b, miR-132, miR-4668. En color rosa se muestran los genes y los nódulos más grandes representan aquellos genes compartidos entre los miRNAs.

En el análisis global ([Figura 30a](#)), se mantiene la variación de vías KEGG encontrada en los últimos dos estadios, pero con un aumento en la cantidad de vías relacionadas

con cáncer. Además, se mantiene la vía de senescencia celular y la de regulación de la pluripotencia de células troncales, entre algunas otras.

Los procesos biológicos de GO ([Figura 30b](#)), se encuentran distribuidos en tres grandes grupos, regulación de la transcripción, regulación de la apoptosis y procesos que regulan la morfología celular de células neuronales y no neuronales. Además, se encontró la regulación positiva de la vía de señalización de Notch. Los compartimentos celulares ([Figura 30c](#)), se mantienen relativamente igual, y las características moleculares ([Figura 30d](#)) que, en los estadios estaban casi en su totalidad representadas por características de unión a proteína, de manera global presenta dos características nuevas, que son la de unión a ATP, y la de unión a RNA.

En la Tabla VIII, se muestran los porcentajes de los genes involucrados en los respectivos términos, el *p-value* y la tasa de enriquecimiento de cada uno de los términos, además, en anexos ([Anexo X](#)) se muestra la lista detallada de los genes involucrados en cada uno de ellos.

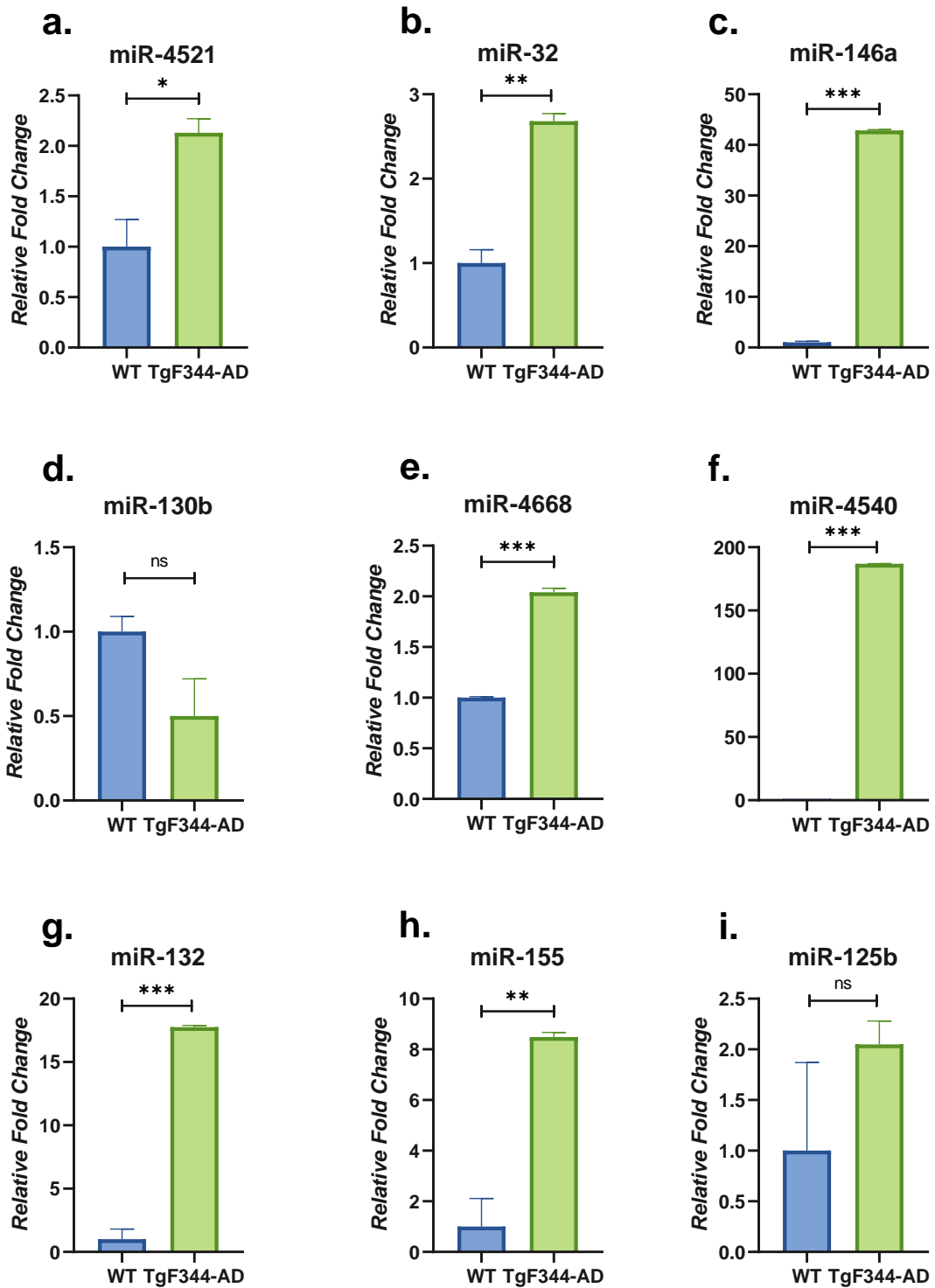
En el análisis de redes ([Figura 31](#)), se muestran los once miRNAs que se encontraron diferencialmente expresados. En él, se observa que los miRNAs están separados entre sí con sus genes blancos cada vez más cercanos entre ellos. Hay únicamente dos genes blanco en común entre ellos: CCND2 y FGF2. CCND2 está compartido entre miR-4668, miR-146a, miR-155 y miR-4521, y FGF2 esta compartido entre miR-155, miR-132 y miR-4668.

Finalmente, se analizó la expresión de los 13 miRNAs que amplificaron en las células ecto-mesenquimales de los portadores de la mutación Jalisco, en las células derivadas del bulbo olfatorio de la rata transgénica TgF344-AD de 14 meses de edad, utilizando como control células de rata sana *wild type* Fischer-344. Se tomaron las mismas consideraciones para usar la muestra de RNA: buena pureza (relación 260/280 > 1.8; [Anexo XII](#)) e integridad del RNA (evaluado mediante gel de agarosa desnaturizante 3%, [Anexo XIII](#)). Los resultados de la cuantificación se muestran en la [Figura 32](#) y los datos crudos en [Anexo XIV](#).

A pesar de que se logró la amplificación de todos los miRNAs, tras analizar las curvas de disociación ([Anexo XV](#)) se decidió descartar a los mirRNAs: miR-3142, miR-147b, miR-1178 y miR-9, debido a que presentaron poca especificidad.

Los miR-4521 ([Figura 32a](#)), miR-32 ([Figura 32b](#)), miR-146a ([Figura 32e](#)), miR-1178 ([Figura 32g](#)), miR-4668 ([Figura 32h](#)), miR-4540 ([Figura 32i](#)), miR-132 ([Figura 32j](#)), miR-155 ([Figura 32k](#)) y miR-125b ([Figura 32l](#)), se encontraron sobreexpresados, mostrando valores de RFC por arriba de 2.0. Todos estos miRNAs, a excepción del 125b-1, mostraron valores de expresión diferencial con significancia estadística.

Se encontró que el miR-130b estaba subexpresado con un RFC de 0.5 ([Figura 32f](#)), y este no fue estadísticamente significativo.



**Figura 32. Relative Fold Change de miRNAs en rata TgF344-AD**

En azul se muestra RFC de rata wild type (WT) y en verde a rata transgénica (TgF344-AD). Significancia estadística calculada por T-test mediante GraphPad Prism 8.0.1. ns: no significativo (p-value > 0.05), \*: significativo (p-value < 0.033), \*\*: significativo (p-value < 0.002), \*\*\*:significativo (p-value < 0.0001).

## DISCUSIÓN

Los miRNAs son una clase de RNAs que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, tanto en la regulación de la transcripción, como de la traducción a proteínas. Su participación en la enfermedad de Alzheimer ha sido extensamente descrita en diferentes procesos de la patología; mediando la generación y la agregación del A $\beta$ , en la inhibición de la autofagia y en la reducción de la eliminación (*clearance*) del A $\beta$ , además, de alterar la activación microglial y astrocítica, el proceso neuroinflamatorio, la hiperfosforilación de tau, la biogénesis mitocondrial y la pérdida sináptica (85,86).

Los microarreglos se han convertido en una herramienta invaluable para la investigación ómica, ya que producen una gran cantidad de información en un solo experimento, lo que permite estudiar problemas desde una perspectiva más amplia en enfermedades complejas difíciles de abordar (87). A pesar de su extenso uso, desde el 2004 se habla de la necesidad de validar los niveles de expresión alterados encontrados en los microarreglos, de genes presuntamente significativos, mediante métodos más exactos como la RT-qPCR, ya que puede presentar falsos positivos debido a la hibridación cruzada por genes relacionados o por variantes del *splicing* o defectos significativos durante la producción del microarreglo (88,89), y es práctica común la validación de los datos obtenidos, especialmente en experimentos de casos y control, tal como es nuestro estudio (87).

Es importante resaltar que para hacer la RT-qPCR se debe usar un RNA intacto; es decir en muy buenas condiciones de purificación (90). La cuantificación y calidad del RNA, se evalúa mediante un espectrofotómetro UV/VIS que permite identificar a diferentes longitudes de onda distintos componentes; a 260 nm se evalúa la presencia de ácidos nucleicos y a 280 nm es específica para proteínas. El ratio de densidad óptica 260/280 permite verificar la calidad de la muestra, de tal manera que ratios mayores a 1.8 son considerados un indicador de buena calidad del RNA. Este valor fue tomado en cuenta, utilizando para nuestra cuantificación únicamente preparaciones de RNA que tuvieran valores por arriba de 1.8 ([Tabla III](#)).

Nuestra extracción de RNA mostró la presencia de dos bandas correspondientes a los RNA ribosomales: 28S y 18S, siendo la banda 28S mucho más prominente que la 18S ([Figura 18](#)). De manera general, para poder evaluar la integridad del RNA, también se utiliza un gel de agarosa desnaturalizante teñido con bromuro de etidio. En este gel debe observarse la presencia de al menos dos bandas la 18S y la 28S, así como una pequeña banda, correspondiente a los RNA de transferencia 5S. En este tipo de ensayos, debe observarse que la banda correspondiente a la 28S sea aproximadamente el doble de la 18S para que la calidad del mRNA sea aceptable (90).

En este trabajo, se validaron la expresión de 14 miRNAs que, por microarreglos, se encontraron diferencialmente expresados en muestras de células derivadas de pacientes con enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF) con distintos estadios de desarrollo, de los cuales, 13 de ellos, amplificados exitosamente y, de estos, 11 presentaron algún cambio de expresión con un FC > 2 o menor a 0.5 (91). El miR-548f5, que no pudo ser amplificado, se encontró ~30 veces sobreexpresado en el microarreglo que se realizó en nuestro grupo de investigación; sin embargo, este se trataba de la forma pre-miRNA (92) y como ya se describió con anterioridad, esa forma inmadura, aún necesita ser procesada para llegar a su forma madura, que es la que tiene la actividad biológica (35). Además, la identificación de los pre-miRNAs mediante PCR es complicada y no se pueden amplificar selectivamente, ya que los *primers* se diseñan para amplificar el *hairpin*, también amplificarían al pri-miRNA (93), y por ello, se prefiere utilizar la técnica de *northern blot* que permite separar éstas estructuras de acuerdo a su tamaño (94). La abundancia del pre-miRNA se reduce tras su procesamiento con DICER (95), lo que podría explicar su ausencia al final del proceso.

El miR-4521 ha sido reportado que se encuentra subexpresado en cáncer gástrico regulando la degradación proteosomal y la autofagia (96). En un modelo de cáncer gástrico se demostró que la hipoxia reprimía la expresión de miR-4521, a través de la inducción de ETS1 y miR-4521 mitigaba la metástasis mediada por hipoxia, e inactivaba la vía AKT/GSK3 $\beta$ /Snai1 dirigiéndose a IGF2 y FOXM1, inhibiendo así el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) y la metástasis (97). Este miRNA,



también ha sido propuesto como un posible biomarcador en lentigos al encontrarse sobreexpresado en tejido con esta condición (96).

FOXM1, uno de sus blancos más reportados de este miRNA, es miembro de una superfamilia de factores de transcripción y está asociado a funciones biológicas como la reparación de daño a DNA, proliferación celular, progresión del ciclo celular, renovación celular, migración celular, angiogénesis y supervivencia celular. Este factor de transcripción regula la transcripción de múltiples genes esenciales para la respuesta ante daño del DNA. Si el daño al DNA no es reparado, se activan los mecanismos de *checkpoints* de respuesta a daño en el DNA para detener la progresión del ciclo celular impactando la senescencia y la transcripción. Si no existe una adecuada respuesta a daño de DNA en las células precursoras neurales, esto causaría una acumulación de las lesiones de DNA que está asociada a enfermedades neurodegenerativas, como la EA (98). Tanto como en nuestro modelo celular de portadores de la mutación Jalisco estadio presintomático 40s ([Figura 19a](#)), como en la rata transgénica TgF344-AD ([Figura 32a](#)), se encontró una sobreexpresión del miR-4521, lo que podría estar afectando la abundancia de FOXM1. Esta actividad disminuida de FOXM1 podría estar involucrada en la patogénesis de enfermedades degenerativas relacionadas con la respuesta a daño del DNA, como lo es la Enfermedad de Alzheimer (98). Es de importancia notar, que este miRNA y su sobreexpresión no ha sido reportada con anterioridad en la EA.

El miR-32, se ha asociado con distintos papeles dependiendo de la enfermedad o sistema del que se habla. Por ejemplo, en el sistema cardiovascular, cuando esta subexpresado se le ha asociado con la inhibición de la angiogénesis, mientras que cuando hay una sobreexpresión se le ha asociado con la inhibición de supresión de la viabilidad celular e inducción de un estado proinflamatorio, con la supresión de la autofagia, promoción de fibrosis e inflamación, así como un aumento de la apoptosis (99).

Por otra parte, el papel del miR-32 en cáncer ha sido controversial y, a pesar de que en la mayoría de las investigaciones se ha identificado como un oncomiR, también ha sido identificado como un miRNA supresor de tumores, regulando así la apoptosis, la

autofagia, la migración y la proliferación de distintas formas en los distintos tipos de cáncer. miR-32 está regulado, río arriba, a través de los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) Xist, ROR, SNHGS, GAS5, HNF1A-AS1 y WEE2-AS1 (99).

Los astrocitos son células cruciales para la recaptura y el metabolismo del glutamato en el sistema nervioso central. En respuesta a una lesión en el sistema nervioso central, los astrocitos se vuelven hipertróficos o con fenotipo reactivo denominado “astrogliosis”, aumentando la expresión de GFAP. En un modelo *wild type* de ratón, cuando se estimulaba la expresión del miR-32 con LPS (lipopolisacárido) se encontró una expresión aumentada de marcadores de microglía, de astrocitos y de citocinas proinflamatorias en el hipocampo y córtex prefrontal de ratones tratados con LPS. Estos niveles se mantenían regulados en un modelo de ratón *knockout* del miR-32, donde se observó la represión de la activación de los astrocitos y se vio eliminada la desregulación glutamatérgica (100).

La astrogliosis reactiva ha sido reportada tanto en tejidos humanos como en cerebros de modelos animales de la EA y es una característica morfológica arquetípica de los cerebros de pacientes en etapas tardías de la EA. Sin embargo, en un modelo de ratón triple transgénico 3xTg-AD, se observó que a los 6 meses de edad, los ratones mostraron signos de atrofia de la astrología en el hipocampo y en el giro dentado, meses antes de la aparición de las placas amiloides (101). Encontramos que existe una sobreexpresión del miR-32 en el estadio presintomático 40s ([Figura 19b](#)) y en la rata TgF344-AD ([Figura 32b](#)), por lo que sería interesante corroborar si en ambos modelos celulares se observa un incremento de marcadores de astrogliosis como el GFAP, que correspondería a lo ya reportado por Zhong et al (100).

Los circRNAs citoplasmáticos funcionan como esponjas de los miRNAs y sirven para regular la actividad de los miRNAs y controlar la expresión genética. Recientemente, se demostró que el circRNA circTAB2, cuando está sobreexpresado, actúa como esponja molecular para el miR-3142 y GLIS2 es un blanco funcional de este miRNA en células de cáncer de pulmón. circTAB2 y GLIS2 se unen competitivamente al miR-3142, atenuando el efecto inhibitorio de miR-3142 en GLIS2 sobre la vía de señalización de AKT, suprimiendo el inicio y la progresión del cáncer. El circTAB2 podría actuar

inhibiendo la proliferación, migración y promover la apoptosis de células de cáncer de pulmón (102).

Los lncRNA, actúan como competidores de los RNA competidores endógenos (ceRNAs), de los mRNAs para afectar su expresión. Se ha reportado que un lncRNA que se sobre expresa tras una lesión en el cerebro, el RMRP (*RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease*) actúa como una esponja de miR-3142 para elevar los niveles de TRIB3 (*Tribbles pseudokinase 3*), una proteína crítica para la neurodegeneración, causando apoptosis inducida por  $A\beta_{1-42}$  y autofagia (103).

En nuestros resultados, pudimos observar que hay un incremento en la expresión del miR-3142, en el estadio asintomático 30s y luego cae la expresión en el grupo presintomático 40s ([Figura 19c](#)), lo que podría hablarnos de que pudiera estarse llevando a cabo un efecto esponja; sin embargo, sería necesario validar los blancos tanto de la vía que involucra a los circRNA, como al lncRNA y determinar cuál sería el efecto funcional sobre nuestro modelo celular. Si el miRNA-3142 se está sobre expresando a pesar del efecto esponja de RMRP, entonces se inhibiría a TRIB3, lo que conllevaría a una inhibición de la apoptosis y autofagia.

El miR-147b, ha sido reportado por su papel en la regulación de la inflamación. Se describió que un incremento en la expresión de este miRNA, tras la activación celular de TLR4, TLR2 o TLR3 (por vías de NF- $\kappa$ B e IRF3), reducía la expresión de citocinas proinflamatorias en macrófagos (104). Este mismo mecanismo se conserva en una línea celular de epitelio pulmonar, en la que se observó que la sobreexpresión de miR-147b inhibió la fosforilación de p38. La inhibición de p38 MAPK inhibe la expresión de IL-1 $\beta$  y de caspasa 3/7, que resulta en la reducción de la respuesta inflamatoria y la apoptosis, respectivamente (105).

En un modelo de neurodegeneración de epilepsia, se observó que la sobreexpresión de miR-147b redujo la expresión de mediadores proinflamatorios IL-6 y COX-2, tras la estimulación con IL-1 $\beta$ . La sobreexpresión del miR-147b, bajo condiciones inflamatorias, podría servir como un mecanismo que restauración de la disfunción de la barrera hematoencefálica, que en la epilepsia contribuye a la progresión de la enfermedad (106). Este fenómeno de ruptura de la barrera hematoencefálica es un

fenómeno que se replica en la EA y podría ser una posible explicación para el aumento de la expresión del miR-147b en el estadio presintomático 40s ([Figura 19d](#)) (107).

El miR-146a, fue el primer microRNA proinflamatorio caracterizado, cuya inducción y sobreexpresión están asociados significativamente al inicio de la respuesta inmune innata y un incremento en la señalización inflamatoria en distintos estadios de varias enfermedades neurológicas. El gen precursor del miR-146a tiene 3 sitios de unión en tándem para NF- $\kappa$ B en el promotor inmediato, no solo es extremadamente sensible para la sobreexpresión de NF- $\kappa$ B sino también un sensor crítico inicial de NF- $\kappa$ B para el inicio y el comienzo de la señalización proinflamatoria. La activación de NF- $\kappa$ B y el miR-146a están acoplados estrechamente y representan un mecanismo de señalización neuro genético muy rápido. Incrementos en el NF- $\kappa$ B están seguidos de incrementos en el miR-146a. Los niveles de miR-146a se encuentran progresivamente incrementados con la severidad de la EA y co-localizan en los compartimentos anatómicos enriquecidos en la neuropatología inflamatoria y el estado final de la deposición de amiloide y proteolípidos (108). Nuestros resultados, mostraron una sobreexpresión del miR-146a en las células de rata TgF344-AD con un FC de 42.85 ([Figura 32c](#)). Esta sobreexpresión del miR-146a ha sido extensamente descrita y, en un modelo de ratón C57bl/6J tratado con A $\beta$ <sub>1-42</sub> inyectado intra cerebro ventricularmente, se determinó que su sobreexpresión aumenta la deposición de A $\beta$  y la fosforilación en MAPK (p38), APP y de ROS (109).

Por otra parte, en un análisis funcional se demostró que en células PC12 (línea neuronal), un *knockdown* del miR-146a redujo la citotoxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando la proliferación celular, la migración, y la invasión, así como una reducción en la apoptosis y el daño al DNA. Su blanco se confirmó ser MCL1, que regula la señalización ERK/MAPK y JAK/STAT. La señalización JAK/STAT mostró funciones de proliferación y anti-apoptosis en distintas enfermedades (110). Nuestros resultados muestran que existe una reducción significativa de la expresión del miR-146a del estadio asintomático 20s al asintomático 30s ([Figura 20a](#)), lo que nos podría hablar de la activación de un posible mecanismo protector ante la producción de especies reactivas de oxígeno. Otro estudio reportado por Hara et al., en EA esporádico,

reporta la subexpresión de este miRNA al analizar el córtex prefrontal del cerebro de estos pacientes (111). Sería interesante ver si este comportamiento del miR-146a se mantiene en etapas posteriores o se desregula hacia un aumento.

La sobreexpresión del miR-1178, en cáncer hepatocelular inhibió la proliferación celular, migración e invasión mediante su interacción con TBL1XR1 (*transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1*) en el eje TBL1XR1/PI3K/Akt (112). Otra de sus funciones conocidas es la inhibición de la expresión de CHIP (una co-chaperona que interactúa con Hsc/Hsp70, promueve la ubiquitinación y la degradación de numerosas proteínas cruciales en el cáncer como NF- $\kappa$ B, Met y p53), facilitando la proliferación, la transición de G1/S, la migración e invasión de células cancerosas pancreáticas, actuando como un oncomiR (113).

El miR-1178, tiene una regulación en su expresión mediada por distintos circRNA. Uno de ellos es el circFNDC3B, que une al miR-1178-3p en forma de esponja, cuyo blanco es el G3BP2, inhibiendo la vía río abajo de SRC/FAK que, en cáncer, juega un papel muy importante en la invasión y metástasis (114). El papel de G3BP2 (*Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein*) en la EA es distinto. La patogénesis de la EA puede acelerarse ante la exposición al estrés. Ante un estímulo de este estilo, se forman gránulos de estrés (GSs) que están contenidos con cientos de proteínas y RNAs de unión a proteínas. El estrés crónico causa la deposición permanente de los GSs que, de manera patológica, se quedan en un estado sólido, y en las enfermedades neurodegenerativas son nido de agregación de proteínas patológicas incluyendo a la proteína tau-p. G3BP1/2, mostró tener una contribución directa al ensamble de estos GSs (115). Por lo que si existe una disminución en la expresión de este miR-1178, como lo hemos detectado en nuestro modelo celular, podría reflejar un aumento en la expresión de G3BP2. Aunque, se requieren de mayores estudios para poder validar esta hipótesis.

El miR-1178, es un miRNA que ha sido reportado con anterioridad en el cortex prefrontal de individuos con EA de inicio tardío. Este miRNA, se encontró subexpresado y su expresión disminuyó aún más, conforme progresaba la enfermedad (116). Esto es similar a lo que se encontró en nuestro modelo celular ([Figura 20c](#)),

donde la expresión de este miRNA fue disminuyendo entre cada estadio, estando subexpresado en el estadio presintomático 40s.

Se ha reportado muy poco de los miR-4540 y miR-4668. Se realizó un estudio que, tras la estimulación de células troncales mesenquimales de cordón umbilical de humanos con TNF- $\alpha$  (20 ng/mL) como un factor inducible, hubo una reducción en la expresión en los miR-4540 y miR-4668-5p, y este patrón se mantuvo en la expresión del miR-4540 en exosomas, pero con una reducción en el FC. TNF- $\alpha$  produce una respuesta inflamatoria, que puede ser reducida tras la estimulación de células mesenquimales con TNF- $\alpha$ . (117). El cambio de expresión nos podría indicar que ambos miRNAs están participando en alguna vía asociada a TNF- $\alpha$ .

En nuestro modelo celular, encontramos una subexpresión del miR-4668 en el estadio asintomático 20s y presintomático 40s ([Figura 21a](#)), lo cual es consistente con lo reportado en otros estudios (117). Sin embargo, se encontró que en las células de la rata TgF344-AD, este miRNA estaba sobreexpresado ([Figura 32e](#)), indicando que la expresión de este miRNA se desregula a la alta, en etapas tardías de la EA.

También encontramos un aumento en la expresión del miR-4540 en el estadio presintomático 40s ([Figura 20d](#)), lo que podría indicar que hay alguna otra vía propia de la EA que está regulando su expresión. Esto se confirmó al analizar la expresión de este miR-4540 en las células de rata TgF344-AD, en las que se encontró un FC de 186.84 ([Figura 32f](#)). Al igual que el miR-4521, esta es la primera vez que se reportan estos miRNAs asociados a la EA.

Uno de los miRNAs más reportados en la EA es el miR-155 y recientemente ha sido propuesto como un factor vital responsable de la respuesta inmune y la inflamación en el desarrollo y progresión de la EA y de otras enfermedades neurológicas (118). En un estudio publicado en 2018, se determinó como uno de los miRNAs que tienen una función vital en el proceso patológico de la EA (119). Sus acciones en la patogénesis de la EA son variadas: puede regular la deposición del A $\beta$  al inducir SKP2 o SNX27, podría estar involucrado en la deposición de los ovillos neurofibrilares al regular vías de GSK3 $\beta$ , AMPK, PKI- $\alpha$ , mTOR, MAPK o Wnt (proteínas efectoras), que surgen del ensamble de proteína tau hiperfosforilada que induce la disfunción sináptica. El miR-

155 también está involucrado en la disfunción sináptica al regular la vía C/EBP $\beta$ /SNX27. La microglía puede fagocitar el A $\beta$  agregado, pero también puede liberar citocinas proinflamatorias que aceleran la agregación de A $\beta$  y causan neurodegeneración, y el miR-155 puede activar la microglía al actuar sobre SOCS-1 o SHIP1 (118).

De manera global se ha establecido que el miR-155 está sobreexpresado en el EA, tanto en distintos modelos de roedores, como en muestras de pacientes (120), tal como se encontró en el modelo celular de la rata TGF344-AD ([Figura 32h](#)). En nuestro modelo celular, se observó una disminución progresiva en su expresión ([Figura 21c](#)), esto es un resultado atípico; sin embargo, García y colaboradores, reportaron en un modelo de neuronas iPSCs generadas de una paciente presintomática con la mutación de una delección en el exón 9 en PSEN1 (*PSEN1 $\Delta$ E9*) que el miR-155 se encontraba subexpresado, mientras que en células SH-SY5Y se encontró sobreexpresado (54). Liu et al., mencionan que la diferencia en la expresión entre las neuronas derivadas de iPSC y las SH-SY5Y revela su potencial para la patología del A $\beta$ , y que estas inconsistencias en la expresión del miR-155 podrían ser dependientes del modelo de EA (118). Tanto el modelo de neuronas derivadas de iPSC como el nuestro, provienen de pacientes con EA familiar, por lo que la subexpresión del miR-155 podría ser una característica de esta forma de la enfermedad.

El miR-132, es uno de los miRNAs más abundantes y enriquecidos en el cerebro modulando la morfogénesis, plasticidad sináptica, supervivencia neuronal y cognición, y también modula distintos estados del proceso neurogénico, que incluyen la proliferación, la diferenciación, la maduración y provee de soporte neurotrópico y neuroprotector; sin embargo, está más consistentemente regulado a la baja en la EA (121,122,116). El miR-132 puede regular tanto la amiloidosis como la fosforilación de Tau mediante la modulación de ITPKB, el cual a su vez incrementa la actividad de ERK1/2 y BACE1 (123). Los blancos en la vía de Tau pueden actuar en la fosforilación de Tau, en el *splicing* o en el mRNA de Tau mismo. Además puede modular directamente la apoptosis a través de la regulación de PTEN, FOXO3 y P300 (121). Su subexpresión no se limita a la EA, también se ha encontrado en distintas enfermedades

neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson, Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica, entre otras (124).

En nuestro modelo celular, se observa una subexpresión del miR-132 desde el estadio asintomático 20s ([Figura 21b](#)), dicha reducción es consistente con otros modelos, como el de dos distintos ratones transgénicos, uno que sobre expresa la forma mutada de APP y PSEN1 (*APP/PS1*) y otro *knock-in* con el gen de *APP* mutado humanizado (*App<sup>NL-G-F</sup>*), en los que en etapas tempranas se les midió el miR-132 en giro dentado, observándose una disminución en su expresión, volviéndose significativa a los 9 meses de edad, y la supresión de este miRNA está determinada por los oligómeros de A $\beta$  (122).

Múltiples estudios han demostrado el potencial terapéutico que podría tener la sobreexpresión del miR-132 en la EA ejerciendo un papel protector en el cerebro (125–127). En un modelo de la enfermedad de Parkinson, en el que se trataron células SH-SY5Y con 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) (una neurotoxina usada para inducir muerte celular), se encontró sobreexpresado al miR-132 y que este regula a SIRT1 (*Silent Information Regulator 1*), una deacetilasa de histonas de la familia de las sirtuinas. Se encontró que la sobreexpresión de miR-132 reduce la abundancia de SIRT1, que a su vez aumenta la expresión de p53 y dos de sus marcadores proapoptóticos blanco Puma y Noxa, lo que resulta en muerte celular. Se ha reportado ya la actividad reducida de SIRT1 en cerebros con la EA (128). Esto tendría que ser validado en nuestro modelo celular de rata TgF344-AD, ya que se reportó la sobreexpresión del miR-132 ([Figura 32g](#)).

Otro de los miRNAs más estudiados en la EA es el miR-125b. En el cerebro de pacientes con la EA se ha encontrado sobreexpresado y correlacionado con la expresión aumentando de genes de cinasas de Tau (*p35/CDK5R1*, *CDK5*, *ERK1* y *ERK2*) y una expresión decrementada de genes de fosfatasas de Tau *DUSP6* y *PPP1CA* (genes blanco-validados del miR-125b). Niveles altos del miR-125b también ha sido involucrados en ciclo celular a través de la subexpresión del CDKN2A (inhibidor 2A de las cinasas dependientes de ciclina), que lleva a la proliferación aumentada de células gliales. El miR-125b está fuertemente sobre regulado por el *enhancer* de la



cadena ligera de kappa del factor nuclear de células B activadas, y puede contribuir al desarrollo de la neuroinflamación al actuar sobre el mRNA de *CFH* (el factor H del complemento (129). Tal sobreexpresión fue encontrada en nuestro modelo de células de rata TgF344-AD ([Figura 32i](#)), por lo que podría estar involucrado en la hiperfosforilación de la proteína Tau.

Un estudio reportó la subexpresión del miR-125b, en suero en pacientes con la EA, un resultado totalmente diferente a lo anteriormente reportado. Sin embargo, la población analizada era una población confinada a una región, y concluyeron que aspectos como la variación genética y los efectos extraños, como los diferentes estatus de alelos relevantes en la EA, y los estilos de vida de las diferentes poblaciones pueden influenciar el perfil de miRNAs, su abundancia y complejidad. Los niveles de miRNAs de distintos individuos también indican la abundancia y especiación de estos miRNA dentro de regiones claramente definidas y pueden diferir significativamente entre los individuos analizados (129). En nuestro estudio se encontró que el miR-125 estaba subexpresado en el estado presintomático 40s ([Figura 21d](#)) y si las variaciones en la expresión de los miRNAs esta influenciada por las poblaciones mismas, al tratarse de una misma familia y con una mutación característica de una población, los resultados obtenidos son los esperados.

En nuestros ensayos, fue posible la amplificación del miR-130b y miR-9 tanto en los portadores de la mutación Jalisco como en las células de rata TgF344-AD. En los portadores de la mutación Jalisco, no mostraron cambios en su expresión y, a pesar de que los microarreglos son excelentes herramientas para obtener datos de expresión para miles de genes, sus capacidades podrían estar limitadas debido a su precisión. La medición de los niveles de un transcrito en un microarreglo provee solo un estimado de las condiciones intracelulares en una condición específica en un tiempo específico, y es afectado por una serie de factores relacionados con el experimento mismo (89). Por lo que es usual que los resultados obtenidos en el microarreglo puedan variar tras la cuantificación por qPCR.

En las células de la rata Tg344-AD, se encontró una subexpresión del miR-130b ([Figura 32d](#)). En un estudio en corazones de embriones y neonatos de ratones se

determinó la sobreexpresión de este miRNA. Esta sobreexpresión, promueve la proliferación de los cardiomiocitos *in vitro* e *in vivo*, y esto lo hace teniendo como blanco a DUSP6 (Fosfatasa dual específica 6), un regulador negativo de la vía MAPK/ERK (130). Por lo que se esperaría un efecto contrario en nuestro modelo, causando muerte celular. Sin embargo, es necesaria la validación de su desregulación en etapas más tardías de la enfermedad.

Es importante notar que, aunque las curvas de disociación nos dan información de la especificidad de los *primers*, muchas veces aparecen picos que no necesariamente implican la amplificación de otro producto. Tal es el caso de los miR-3142, 1178 y 4668 para los portadores de la mutación Jalisco, por lo que es importante analizar las reacciones de qPCR mediante gel de agarosa para confirmar que se trata de un único amplicón (131). Por lo tanto, los datos obtenidos con esos *primers* deben ser tomados con precaución y deben ser validados con otros ensayos.

En este trabajo, se hizo el análisis bioinformático por estadio considerando los miRNAs diferencialmente expresados en cada uno de los estadios ([Tabla IV](#)). Algunas de las vías en el análisis de KEGG se encontraron compartidas entre todos los estadios (Figura 24a, 26a y 28a) y se mantuvieron presentes al hacer el análisis global (Figura 30a), tal es el caso de “*Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells*”, “*Cellular senescence*”, “*Axon guidance*” y “*FoxO signaling pathways*”. La primera nos habla de la auto renovación que hay, y podría estar enriquecida esa vía porque se tratan de células mesenquimales (132), la senescencia celular habla del arresto del ciclo celular (133), la guía de axones está relacionada con la formación del circuitos neurales (134), y la vía de FoxO está implicada en muchas vías río abajo como control del ciclo celular, respuesta ante daño al DNA, estrés oxidativo y nutricional, envejecimiento, longevidad y apoptosis celular (88).

Otra de las vías que estuvo presente en todos los estadios ([Figura 24a](#), [26a](#) y [28a](#)) fue la de “*Toll-like receptor signaling pathway*”, la cual está reportada activa en la EA, en la que se da la activación del sistema inmune innato que reconoce distintos ligandos derivados de patógenos y de tejido dañado (135).

Hay algunas otras vías de señalización enriquecidas como MAPK, Ras, Wnt. Sin embargo, se trata de familias de proteínas que funcionan dentro de las vías más grandes, por ejemplo MAPK que está asociada tanto a senescencia como a guía de axones (133,134).

Otras vías se mantuvieron relativamente similares en los diferentes estadios y de manera global también (Figura [24a](#), [26a](#), [28a](#) y [30a](#)), pero desde el estadio asintomático 30s se empieza a ver vías relacionadas con las interacciones célula-célula como “*Tight junctions*” y “*Adherent junctions*”. Se ha reportado en la EA que la acumulación del A $\beta$  en las paredes de venas endoteliales genera disfunciones endoteliales y una barrera hematoencefálica con la integridad dañada (136), por lo que la aparición de estas vías podría indicarnos el inicio de la activación de vías que llevarán a la pérdida de estas interacciones que mantienen la estabilidad del tejido.

Una de las vías que se encontraron enriquecidas de manera global ([Figura 30a](#)) fue “*Alzheimer disease*”, dentro de las cuales hay distintas vías alteradas como la señalización neuronal a la insulina, autofagia, defectos en el transporte axonal, disfunción de la mitocondria. También a distintas vías activadas que conducen a la apoptosis y producción de ROS, además de múltiples vías activadas para el procesamiento de proteínas, y otras vías activas como la vía de señalización de insulina, vías de señalización AGE-RAGE en complicaciones diabéticas, vías de Wnt, procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico, vía de señalización de calcio, procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico, autofagia, proteosoma, apoptosis y fosforilación oxidativa. Todas estas vías llevan a la muerte celular ([Anexo XVI](#)) (137).

Algunos de los procesos compartidos en la GO de procesos biológicos ([Figura 24b](#), [26b](#), [28b](#)) son aquellos relacionados con apoptosis: “*Extrinsic apoptotic signaling pathway*”, “*Regulation of apoptotic process*”, “*Apoptotic process*” y “*Negative regulation of apoptotic process*” y con proliferación “*Negative regulation of cell population proliferation*”, pero se encuentran más representados en el estadio asintomático 20s.

Los procesos en respuesta a estrés se empezaron a enriquecer desde el estadio asintomático 30s (Figura [26b](#), [28b](#)), aumentando la cantidad de procesos relacionados a respuesta celular a estrés “*Stress-induced premature senescence*”, “*Cellular response to stress*”, “*Negative regulation of stress fiber assembly*”. El proceso que se mantiene en todos los estadios ([Figura 24b](#), [26b](#) y [28b](#)) es “*Cellular response to hypoxia*”

A partir de los estadios asintomático 30s y presintomático 40s ([Figura 26b](#) y [28b](#)) se empiezan a observar procesos relacionados con la regulación de la transcripción “*Negative regulation of transcription by RNA polymerase II*”, “*Positive regulation of transcription by RNA polymerase II*” “*Positive regulation of DNA-templated transcription*”, “*Positive regulation of miRNA transcription*”, “*Positive regulation of gene expression*” y con ciclo celular “*Regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle*”, “*Cell division*”.

Los programas de apoptosis involucran la participación de un amplio rango de proteínas y un estado balanceado de factores pro-apoptóticos y anti-apoptóticos que son cruciales para preservar la integridad neuronal (138). La muerte neuronal en la EA inicia en la etapa preclínica y progresa durante el declive cognitivo y puede estar activada en respuesta a varias formas de estrés interno o celular (139).

Una forma de estrés en la célula puede estar dada por la acumulación de proteínas mal plegadas que es característica en la EA. El retículo endoplásmico (RE) es necesario para el plegamiento fisiológico, oligomerización y modificaciones postraduccionales de proteínas, y el daño, mal plegamiento y proteínas sin plegar contribuyen al almacenamiento y anormalidades conformacionales dentro del este, que desencadena el inicio del estrés en el RE que es un proceso común en la EA (140).

El mal plegamiento de las proteínas, característico en la patogénesis de la EA, activa la UPR (respuesta a proteínas sin plegar; *Unfolded Protein Response*). Se sugiere que la acumulación/agregación de la proteína p-tau o péptidos A $\beta$  induce estrés irreversible al RE, causando disfunción de las sinapsis y neurodegeneración. La UPR inicia una serie de cascadas de señalización que modifican los eventos transcripcionales y

traduccionales en su búsqueda de afrontar el estrés y reintegrar la homeostasis del RE (140).

Los genes regulados por los distintos miRNAs diferencialmente expresados en cada uno de los estadios nos permiten ver con mayor detalle este proceso. En los primeros estadios, asintomático 20s y 30s ([Figura 24b](#) y [26b](#)), podría existir el ya reportado periodo silencioso en el que se da la acumulación y agregación de proteínas aberrantes en el cerebro (140), que causan neurodegeneración (139). Posteriormente, en el estadio asintomático 30s ([Figura 26b](#)), existe esta activación de vías de estrés celular, causada por la acumulación de proteínas mal plegadas y finalmente ocurriría la activación de la UPR durante el estadio presintomático en la que se activan distintas vías para reinstaurar la homeostasis del RE.

Durante este proceso, la acumulación de estas proteínas desencadena la neuroinflamación y la activación de células de la glía (140). Estos efectos se ven reflejados en el enriquecimiento de procesos relacionados con la glía, como: la “*Astrocyte differentiation*”, “*Positive regulation of glial cell proliferation*”, como lo observado en el estadio asintomático 30s.

Los análisis de componente celular tanto de los distintos estadios como el global ([Figura 24c](#), [26c](#), [28c](#) y [30c](#)), nos habla de que los genes regulados por los miRNAs están presentes en distintos compartimentos propios de la neurona, como “*Dentritic spine*”, “*Neuron projection*”, “*Axon*”, etc. De manera muy interesante, el compartimento “*Nucleoplasm*” apareció a partir del estadio asintomático 30s ([Figura 26c](#)), lo que podría indicar que la traducción de los distintos genes inicia a partir de ese momento.

En el análisis de GO de característica molecular describen las actividades que llevan a cabo los productos de los genes. Se observa que en el estadio asintomático 20s ([Figura 24d](#)) hay algunas moléculas asociadas a la modulación transcripcional “*Transcription corepresor binding*” y “*Histone deacetylase binding*” lo que podría indicar que en esta primera etapa aún existe una regulación de vías. A partir del estadio asintomático 30s ([Figura 26d](#)) se empieza a observar que las características están exclusivamente

relacionadas con la unión de proteínas “*Protein kinase binding*”, “*Cadherin binding*”, “*Myosin binding*”, entre otras; las cuales están asociadas con la misma patología de la EA, el mal plegamiento de proteínas. Finalmente, en el estadio presintomático 40s ([Figura 28d](#)) además de las características de unión de proteínas, se empieza a ver la unión de algunas proteínas relacionadas con vías de muerte celular “*Heat shock protein binding*” y “*p53 binding*”.

Para finalizar se hizo un análisis de las vías de los miRNAs en miRNet 2.0. Esta base de datos está basada en análisis virtuales usando literatura existente. Este *software* permite establecer redes entre genes, factores de transcripción y RNAs no codificantes. Después de procesar la entrada, el *software* genera una red con todos los posibles nódulos o sitios de interacción que se refina usando el camino más corto y grado de nódulo y valores de cercanía y enriquecimiento funcional basado en la base de datos KEGG (141).

En estos análisis ([Figura 25](#), [27](#), [29](#) y [31](#)) se observan a todos los miRNAs muy separados entre sí y muy pocos blancos son los que se comparten, independientemente de si se trataba del análisis por estadio o global. Esto puede hablar de que los miRNAs regulan vías diferentes y por eso no están en tanta cercanía o puede deberse también a la base de datos que se eligió para el filtrado de datos que es miRTarBase v9.0. miRTarBase incluye solo blancos de miRNAs validados experimentalmente, que fueron después curados manualmente basados en un sistema de alta exactitud de búsqueda (142).

En el estadio asintomático 20s se muestra ([Figura 25](#)) que el blanco compartido entre tres miRNAs (miR-4668, miR-146a y miR-132) es CDKN1A. Se reportó que genes relacionados son un “subtipo” de EA FoxO como lo es CDKN1A, MAPK14, MAPK8 y PRKAA2 podrían estar regulados por lncRNAs y factores de transcripción como Gas5, HOTAIR y MYC. Particularmente, CDKN1A (inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1A) que interactúa con C1Z1 (proteína de dedos de zinc 1) juega un papel en la replicación del DNA y la progresión del ciclo celular en el *checkpoint* G1/S y podría contribuir al desarrollo de varias enfermedades neurodegenerativas (143).

Los nódulos de la red de los miRNAs del estadio presintomático 40s reveló la presencia de dos miRNAs compartidos: CCND2 y FGF2. CCND2 (está regulado por miR-4668, miR-132 y miR-4668 y miR-4521; los tres primeros subexpresados y el último sobreexpresados. FGF2 está regulado por miR-155, miR-132 y miR-4668, los cuales encontramos a todos subexpresados en nuestro modelo celular.

FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2), es un miembro de la familia FGF, que frecuentemente esta incrementado en distintas malignidades, y controla procesos celulares como la migración celular tumoral y la invasión. La CCND2 (ciclina 2) es una ciclina bien conocida que funciona en el ciclo celular, específicamente en la transición G1/S. En un estudio con líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, se encontró que el miR-646 silencia tanto a CCND2 como a FGF2 y se identificó que la subexpresión de este miRNA reduce la proliferación celular y la invasión (144). Nuestros resultados muestran que los miRNA que regulan a estos blancos en su mayoría están subexpresados ([Tabla IV](#)), lo que significaría que hay una gran cantidad de señales que inducirían poca proliferación para nuestras células. Esto es consistente con lo anteriormente descrito de la pérdida de balance en las señales de supervivencia.

Podemos observar que a pesar de que los miRNAs parecieran no regular las mismas vías, comparten blancos que independientemente del estadio regulan la proliferación celular.

## **CONCLUSIONES**

Es importante validar la expresión de los miRNAs encontrados DE en los microarreglos de las células derivadas de los pacientes en distintos estadios de desarrollo de la EAF.

Conocer el perfil de expresión, así como los distintos blancos que regulan y las vías en las que participan estos miRNAs, nos permite conocer los tres ejes funcionales en los que participan: 1) inflamación, 2) supervivencia/muerte y 3) agregación de proteínas. Nuestro estudio nos permitió demostrar que estos ejes, no son independientes entre sí y que los mecanismos de regulación, así como los de la propia enfermedad, son muy amplios y se sobrelapan entre sí.

Los miRNAs son importantes reguladores de la expresión génica, pero estos a su vez tienen reguladores río arriba, por lo que es indispensable hacer una evaluación integral de los mecanismos de regulación para identificar a todos los actores que se encuentran alterados en la enfermedad de Alzheimer.



## **PERSPECTIVAS**

Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de la EA, el conocimiento que hay acerca de la forma familiar de esta enfermedad es aún limitado. Se sabe que en ambas formas de la enfermedad los hallazgos histopatológicos son similares. Sin embargo, aún no se conoce en su totalidad si las vías por los que se llega a ellos son similares también. Por ello, es importante evaluar si los blancos para los distintos miRNAs diferencialmente expresados en la forma esporádica y la familiar afectan los mismos procesos biológicos.

Una de las ventajas que nos brinda los modelos celulares derivados de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer Familiar, es que, a diferencia de la forma esporádica, en esta se conoce la edad promedio de inicio de síntomas, por lo que el estudio de biomarcadores para rastrear aspectos como el inicio de síntomas, neurodegeneración, es más sencillo y podría ayudar a relacionarlo con la forma esporádica.

En ese sentido, es importante seguir estudiando todas las alteraciones moleculares que se llevan a cabo en el proceso de neurodegeneración, utilizando el modelo celular de las células ecto-mesenquimales y usarlas para su diferenciación a los distintos linajes celulares y ver las alteraciones que produce la mutación Jalisco.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Duong S, Patel T, Chang F. Dementia. *Can Pharm J CPJ*. el 7 de febrero de 2017;150(2):118–29.
2. Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and Management of Dementia: A Review. *JAMA*. el 22 de octubre de 2019;322(16):1589–99.
3. Dementia [Internet]. [citado el 17 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
4. Emmady PD, Schoo C, Tadi P. Major Neurocognitive Disorder (Dementia). En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado el 17 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557444/>
5. Kumar A, Sidhu J, Goyal A, Tsao JW. Alzheimer Disease. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado el 17 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
6. Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q. Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression. *Neurol Ther*. el 14 de marzo de 2022;11(2):553–69.
7. Li X, Feng X, Sun X, Hou N, Han F, Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2022 [citado el 17 de mayo de 2023];14. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.937486>
8. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. enero de 2020;25(24):5789.
9. Sheppard O, Coleman M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. En: Huang X, editor. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2020 [citado el 17 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK566126/>
10. Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*. el 1 de junio de 2016;12(6):733–48.
11. Barber RC. The Genetics of Alzheimer's Disease. *Scientifica*. el 31 de diciembre de 2012;2012:e246210.
12. Ryan NS, Rossor MN. Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med*. febrero de 2010;4(1):99–112.

13. Silva MVF, Loures C de MG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho M das G. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci.* el 9 de mayo de 2019;26(1):33.
14. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primer.* el 13 de mayo de 2021;7(1):1–21.
15. Lichtenthaler SF. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem.* 2011;116(1):10–21.
16. Zhao J, Liu X, Xia W, Zhang Y, Wang C. Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci.* el 4 de agosto de 2020;13:137.
17. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry.* octubre de 2021;26(10):5481–503.
18. Hur JY.  $\gamma$ -Secretase in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med.* abril de 2022;54(4):433–46.
19. Brown MR, Radford SE, Hewitt EW. Modulation of  $\beta$ -Amyloid Fibril Formation in Alzheimer's Disease by Microglia and Infection. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2020 [citado el 18 de mayo de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.609073>
20. Ayodele T, Rogaeva E, Kurup JT, Beecham G, Reitz C. Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research? *Curr Neurol Neurosci Rep.* el 19 de enero de 2021;21(2):4.
21. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Thirumalai D, Palaniappan B. Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *Int J Biol Macromol.* el 15 de noviembre de 2020;163:1599–617.
22. Yescas P, Huertas-Vazquez A, Villarreal-Molina MT, Rasmussen A, Tusié-Luna MT, López M, et al. Founder effect for the Ala431Glu mutation of the presenilin 1 gene causing early-onset Alzheimer's disease in Mexican families. *Neurogenetics.* el 1 de julio de 2006;7(3):195–200.
23. Orozco-Barajas M, Oropeza-Ruvalcaba Y, Canales-Aguirre AA, Sánchez-González VJ. PSEN1 c.1292C< A Variant and Early-Onset Alzheimer's Disease: A Scoping Review. 2022;
24. Meraz-Ríos MA, Cabrera-Reyes EA, Padilla-Cristerna ML. The Jalisco Mutation: Familiar Alzheimer's Disease in México. *J Exp Neurol.* el 28 de diciembre de 2022;3(3):75–7.
25. Huart C, Rombaux P, Hummel T. Plasticity of the Human Olfactory System: The Olfactory Bulb. *Molecules.* el 17 de septiembre de 2013;18(9):11586–600.

26. Gómez-Virgilio L, Luarte A, Ponce DP, Bruna BA, Behrens MI. Analyzing Olfactory Neuron Precursors Non-Invasively Isolated through NADH FLIM as a Potential Tool to Study Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* el 12 de junio de 2021;22(12):6311.
27. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *J Neurosci.* el 1 de febrero de 2002;22(3):629–34.
28. Makrygianni EA, Chrousos GP. Neural Progenitor Cells and the Hypothalamus. *Cells.* el 11 de julio de 2023;12(14):1822.
29. Delorme B, Nivet E, Gaillard J, Häupl T, Ringe J, Devèze A, et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. *Stem Cells Dev.* junio de 2010;19(6):853–66.
30. Jaloux C, Bonnet M, Vogtensperger M, Witters M, Veran J, Giraud L, et al. Human nasal olfactory stem cells, purified as advanced therapy medicinal products, improve neuronal differentiation. *Front Neurosci [Internet].* el 17 de noviembre de 2022 [citado el 6 de julio de 2024];16. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2022.1042276/full>
31. Monti Graziadei GA, Graziadei PPC. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol.* abril de 1979;8(2):197–213.
32. Ge L, Jiang M, Duan D, Wang Z, Qi L, Teng X, et al. Secretome of Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cell, a Multiple Potential Stem Cell. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1243659.
33. Benítez-King G, Riquelme A, Ortíz-López L, Berlanga C, Rodríguez-Verdugo MS, Romo F, et al. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *J Neurosci Methods.* el 30 de septiembre de 2011;201(1):35–45.
34. Zhang X, Klueber KM, Guo Z, Lu C, Roisen FJ. Adult human olfactory neural progenitors cultured in defined medium. *Exp Neurol.* el 1 de abril de 2004;186(2):112–23.
35. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol [Internet].* 2018 [citado el 6 de junio de 2023];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402>
36. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells.* el 23 de enero de 2020;9(2):276.

37. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* el 1 de octubre de 2019;30(4):656–73.
38. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* el 15 de julio de 2019;8(7):727.
39. Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev.* 2018;118(4):1917–50.
40. Klyucherev TO, Olszewski P, Shalimova AA, Chubarev VN, Tarasov VV, Attwood MM, et al. Advances in the development of new biomarkers for Alzheimer’s disease. *Transl Neurodegener.* el 21 de abril de 2022;11(1):25.
41. Paprzycka O, Wieczorek J, Nowak I, Madej M, Strzalka-Mrozik B. Potential Application of MicroRNAs and Some Other Molecular Biomarkers in Alzheimer’s Disease. *Curr Issues Mol Biol.* junio de 2024;46(6):5066–84.
42. Azam HMH, Rößling RI, Geithe C, Khan MM, Dinter F, Hanack K, et al. MicroRNA biomarkers as next-generation diagnostic tools for neurodegenerative diseases: a comprehensive review. *Front Mol Neurosci* [Internet]. el 31 de mayo de 2024 [citado el 7 de julio de 2024];17. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2024.1386735/full>
43. Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y, Wang PC. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer’s Disease Biomarkers. *Biomed Environ Sci BES.* febrero de 2018;31(2):87–96.
44. Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer’s disease. *Exp Neurol.* el 1 de junio de 2012;235(2):491–6.
45. Mancuso R, Agostini S, Hernis A, Zanzottera M, Bianchi A, Clerici M. Circulatory miR-223-3p Discriminates Between Parkinson’s and Alzheimer’s Patients. *Sci Rep.* el 28 de junio de 2019;9(1):9393.
46. Nagaraj S, Laskowska-Kaszub K, Dębski KJ, Wojsiat J, Dąbrowski M, Gabryelewicz T, et al. Profile of 6 microRNA in blood plasma distinguish early stage Alzheimer’s disease patients from non-demented subjects. *Oncotarget.* el 5 de febrero de 2017;8(10):16122–43.
47. Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, et al. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer’s disease. *PloS One.* 2013;8(7):e69807.

48. Kiko T, Nakagawa K, Tsuduki T, Furukawa K, Arai H, Miyazawa T. MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2014;39(2):253–9.
49. MicroRNA Expression in Alzheimer Blood Mononuclear Cells - Hyman M. Schipper, Olivier C. Maes, Howard M. Chertkow, Eugenia Wang, 2007 [Internet]. [citado el 7 de julio de 2024]. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/10.4137/GRSB.S361>
50. Leidinger P, Backes C, Deutscher S, Schmitt K, Mueller SC, Frese K, et al. A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biol*. el 29 de julio de 2013;14(7):R78.
51. Tiribuzi R, Crispoltoni L, Porcellati S, Di Lullo M, Florenzano F, Pirro M, et al. miR128 up-regulation correlates with impaired amyloid  $\beta$ (1-42) degradation in monocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. el 1 de febrero de 2014;35(2):345–56.
52. Lehmann SM, Krüger C, Park B, Derkow K, Rosenberger K, Baumgart J, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*. junio de 2012;15(6):827–35.
53. Alexandrov PN, Dua P, Hill JM, Bhattacharjee S, Zhao Y, Lukiw WJ. microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF). *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(4):365–73.
54. Garcia G, Pinto S, Cunha M, Fernandes A, Koistinaho J, Brites D. Neuronal Dynamics and miRNA Signaling Differ between SH-SY5Y APPSwe and PSEN1 Mutant iPSC-Derived AD Models upon Modulation with miR-124 Mimic and Inhibitor. *Cells*. septiembre de 2021;10(9):2424.
55. Bekris LM, Lutz F, Montine TJ, Yu CE, Tsuang D, Peskind ER, et al. MicroRNA in Alzheimer's disease: an exploratory study in brain, cerebrospinal fluid and plasma. *Biomarkers*. el 1 de agosto de 2013;18(5):455–66.
56. Burgos K, Malenica I, Metpally R, Courtright A, Rakela B, Beach T, et al. Profiles of extracellular miRNA in cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases correlate with disease status and features of pathology. *PloS One*. 2014;9(5):e94839.
57. McKeever PM, Schneider R, Taghdiri F, Weichert A, Multani N, Brown RA, et al. MicroRNA Expression Levels Are Altered in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Young-Onset Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. diciembre de 2018;55(12):8826–41.
58. Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*. el 10 de noviembre de 2015;6(35):37043–53.

59. Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport*. el 12 de febrero de 2007;18(3):297–300.
60. Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF- $\kappa$ B-sensitive Micro RNA-146a-mediated Inflammatory Circuit in Alzheimer Disease and in Stressed Human Brain Cells \*. *J Biol Chem*. el 14 de noviembre de 2008;283(46):31315–22.
61. Cui JG, Li YY, Zhao Y, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. Differential regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF-kappaB in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. el 10 de diciembre de 2010;285(50):38951–60.
62. Sethi P, Lukiw WJ. Micro-RNA abundance and stability in human brain: Specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett*. el 7 de agosto de 2009;459(2):100–4.
63. Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, Waters M, Shi Y, Cannon B, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis JAD*. mayo de 2008;14(1):27–41.
64. Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, et al. The Expression of MicroRNA miR-107 Decreases Early in Alzheimer's Disease and May Accelerate Disease Progression through Regulation of  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1. *J Neurosci*. el 30 de enero de 2008;28(5):1213–23.
65. Boissonneault V, Plante I, Rivest S, Provost P. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem*. el 23 de enero de 2009;284(4):1971–81.
66. Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, et al. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2010;36(4):320–30.
67. Hébert SS, Horr  K, Nicol i L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahatoglu AN, et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. el 29 de abril de 2008;105(17):6415–20.
68. Faghihi MA, Zhang M, Huang J, Modarresi F, Van der Brug MP, Nalls MA, et al. Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol*. 2010;11(5):R56.
69. Smith P, Al Hashimi A, Girard J, Delay C, H bert SS. In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs. *J Neurochem*. enero de 2011;116(2):240–7.

70. Wang WX, Huang Q, Hu Y, Stromberg AJ, Nelson PT. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathol (Berl)*. febrero de 2011;121(2):193–205.
71. Geekiyanage H, Chan C. MicroRNA-137/181c Regulates Serine Palmitoyltransferase and In Turn Amyloid  $\beta$ , Novel Targets in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. el 12 de octubre de 2011;31(41):14820–30.
72. Benedikz E, Kloskowska E, Winblad B. The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. junio de 2009;13(6):1034–42.
73. Collins HM, Greenfield S. Rodent Models of Alzheimer's Disease: Past Misconceptions and Future Prospects. *Int J Mol Sci [Internet]*. junio de 2024 [citado el 7 de julio de 2024];25(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11172947/>
74. Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, et al. A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A $\beta$ , and Frank Neuronal Loss. *J Neurosci*. el 10 de abril de 2013;33(15):6245–56.
75. TgF344-AD | ALZFORUM [Internet]. [citado el 8 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.alzforum.org/research-models/tgf344-ad>
76. Rochín-Hernández LJ, Rochín-Hernández LS, Padilla-Cristerna ML, Duarte-García A, Jiménez-Acosta MA, Figueroa-Corona MP, et al. Mesenchymal Stem Cells from Familial Alzheimer's Patients Express MicroRNA Differently. *Int J Mol Sci*. enero de 2024;25(3):1580.
77. Padilla Cristerna ML. La mutación A431E en PSEN1, altera la regulación de la expresión génica mediada por miRNAs en células precursoras neurales derivadas del epitelio olfatorio [Tesis de Maestría]. [México]: CINVESTAV; 2019.
78. Xia B, Gao J, Li S, Huang L, Ma T, Zhao L, et al. Extracellular Vesicles Derived From Olfactory Ensheathing Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration in Rats. *Front Cell Neurosci [Internet]*. 2019 [citado el 17 de julio de 2023];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00548>
79. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. el 6 de enero de 2010;2010(6):pdb.prot5439.
80. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis*. enero de 2012;33(2):366–9.
81. Cirera S, Busk PK. Quantification of miRNAs by a simple and specific qPCR method. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1182:73–81.



82. Busk PK. A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*. el 28 de enero de 2014;15(1):29.
83. Kariuki D, Asam K, Aouizerat BE, Lewis KA, Florez JC, Flowers E. Review of databases for experimentally validated human microRNA–mRNA interactions. *Database J Biol Databases Curation*. el 25 de abril de 2023;2023:baad014.
84. Mubeen S, Hoyt CT, Gemünd A, Hofmann-Apitius M, Fröhlich H, Domingo-Fernández D. The Impact of Pathway Database Choice on Statistical Enrichment Analysis and Predictive Modeling. *Front Genet* [Internet]. 2019 [citado el 4 de agosto de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.01203>
85. Seyedaghamiri F, Rajabi M, Mohaddes G. Targeting Novel microRNAs in Developing Novel Alzheimer’s Disease Treatments. *Neurochem Res*. el 1 de enero de 2023;48(1):26–38.
86. Arora T, Prashar V, Singh R, Barwal TS, Changotra H, Sharma A, et al. Dysregulated miRNAs in Progression and Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. *Mol Neurobiol*. el 1 de octubre de 2022;59(10):6107–24.
87. Agapito G, Arbitrio M. Microarray Data Analysis Protocol. En: Agapito G, editor. *Microarray Data Analysis* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2022 [citado el 4 de agosto de 2024]. p. 263–71. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1839-4\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1839-4_17)
88. Rockett JC, Hellmann GM. Confirming microarray data—is it really necessary? *Genomics*. el 1 de abril de 2004;83(4):541–9.
89. Jaksik R, Iwanaszko M, Rzeszowska-Wolny J, Kimmel M. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct*. el 3 de septiembre de 2015;10:46.
90. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med*. el 1 de abril de 2006;27(2):126–39.
91. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of Real-Time Quantitative PCR to Validate the Results of cDNA Array and Differential Display PCR Technologies. *Methods*. el 1 de diciembre de 2001;25(4):443–51.
92. miRBase entry: hsa-mir-548f-5 [Internet]. [citado el 5 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://mirbase.org/hairpin/MI0006378>
93. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods San Diego Calif*. enero de 2008;44(1):31–8.

94. Yang F, Cheng Y, Cao Y, Dong H, Lu H, Zhang K, et al. Sensitively distinguishing intracellular precursor and mature microRNA abundance. *Chem Sci*. el 6 de febrero de 2019;10(6):1709–15.
95. Li N, You X, Chen T, Mackowiak SD, Friedländer MR, Weigt M, et al. Global profiling of miRNAs and the hairpin precursors: insights into miRNA processing and novel miRNA discovery. *Nucleic Acids Res*. el 1 de abril de 2013;41(6):3619–34.
96. Maeno H, Suzuki-Horiuchi Y, Funakoshi A, Chumsakul O, Sato Y, Ishii T, et al. miR-4521—A novel biomarker for human lentigos. *Exp Dermatol*. 2024;33(6):e15118.
97. Xing S, Tian Z, Zheng W, Yang W, Du N, Gu Y, et al. Hypoxia downregulated miR-4521 suppresses gastric carcinoma progression through regulation of IGF2 and FOXM1. *Mol Cancer*. el 6 de enero de 2021;20(1):9.
98. Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EWF. FOXM1: An emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta*. noviembre de 2014;1839(11):1316–22.
99. Zeng Z, Zhu Q, Zhao Z, Zu X, Liu J. Magic and mystery of microRNA-32. *J Cell Mol Med*. septiembre de 2021;25(18):8588–601.
100. Zhong X, Cao W, Zhao H, Chen L, Cao J, Wei L, et al. MicroRNA-32-5p knockout eliminates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice through inhibition of astrocyte overactivity. *Brain Behav Immun*. el 1 de febrero de 2020;84:10–22.
101. Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*. el 1 de octubre de 2010;7(4):399–412.
102. Man W, Cui Y, Li J, Li Y, Jin J, Jin Y, et al. circTAB2 inhibits lung cancer proliferation, migration and invasion by sponging miR-3142 to upregulate GLIS2. *Apoptosis*. el 1 de abril de 2023;28(3):471–84.
103. Tang ZB, Chen HP, Zhong D, Song JH, Cao JW, Zhao MQ, et al. LncRNA *RMRP* accelerates autophagy-mediated neurons apoptosis through *miR-3142/TRIB3* signaling axis in alzheimer's disease. *Brain Res*. el 15 de junio de 2022;1785:147884.
104. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Park YJ, Tsuruta Y, Abraham E. miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci*. el 15 de septiembre de 2009;106(37):15819–24.
105. gianni. MicroRNA-147b alleviates inflammation and apoptosis in acute lung injury via inhibition of p38 MAPK signaling pathway [Internet]. *European Review*.

- 2021 [citado el 5 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.europeanreview.org/article/25098>
106. van Scheppingen J, Mills JD, Zimmer TS, Broekaart DWM, Iori V, Bongaarts A, et al. miR147b: A novel key regulator of interleukin 1 beta-mediated inflammation in human astrocytes. *Glia*. 2018;66(5):1082–97.
  107. Alkhalifa AE, Al-Ghraiyyah NF, Odum J, Shunnarah JG, Austin N, Kaddoumi A. Blood–Brain Barrier Breakdown in Alzheimer’s Disease: Mechanisms and Targeted Strategies. *Int J Mol Sci*. enero de 2023;24(22):16288.
  108. Lukiw WJ. microRNA-146a Signaling in Alzheimer’s Disease (AD) and Prion Disease (PrD). *Front Neurol*. el 25 de junio de 2020;11:462.
  109. Zhan-qiang H, Hai-hua Q, Chi Z, Miao W, Cui Z, Zi-yin L, et al. miR-146a aggravates cognitive impairment and Alzheimer disease-like pathology by triggering oxidative stress through MAPK signaling. *Neurología*. el 1 de septiembre de 2023;38(7):486–94.
  110. Yang X, Mao X, Ding X, Guan F, Jia Y, Luo L, et al. miR-146a down-regulation alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity of PC12 cells by regulating MCL1/JAK/STAT pathway. *Cell Biol Toxicol*. el 1 de diciembre de 2018;34(6):479–89.
  111. Hara N, Kikuchi M, Miyashita A, Hatsuta H, Saito Y, Kasuga K, et al. Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol Commun*. el 31 de enero de 2017;5(1):10.
  112. Pan Q, Shao Z, Zhang Y, Liu H. MicroRNA-1178-3p suppresses the growth of hepatocellular carcinoma by regulating transducin (beta)-like 1 X-linked receptor 1. *Hum Cell*. el 1 de septiembre de 2021;34(5):1466–77.
  113. Cao Z, Xu J, Huang H, Shen P, You L, Zhou L, et al. MiR-1178 Promotes the Proliferation, G1/S Transition, Migration and Invasion of Pancreatic Cancer Cells by Targeting CHIP. *PLoS ONE*. el 30 de enero de 2015;10(1):e0116934.
  114. Liu H, Bi J, Dong W, Yang M, Shi J, Jiang N, et al. Invasion-related circular RNA circFNDC3B inhibits bladder cancer progression through the miR-1178-3p/G3BP2/SRC/FAK axis. *Mol Cancer*. el 20 de noviembre de 2018;17(1):161.
  115. Sato K, Takayama K ichi, Inoue S. Stress granules sequester Alzheimer’s disease-associated gene transcripts and regulate disease-related neuronal proteostasis. *Aging*. el 22 de mayo de 2023;15(10):3984–4011.
  116. Lau P, Bossers K, Janky R, Salta E, Frigerio CS, Barbash S, et al. Alteration of the micro RNA network during the progression of Alzheimer’s disease. *EMBO Mol Med*. octubre de 2013;5(10):1613–34.

117. Ma H, Zhang S, Xu Y, Zhang R, Zhang X. Analysis of differentially expressed microRNA of TNF- $\alpha$ -stimulated mesenchymal stem cells and exosomes from their culture supernatant. *Arch Med Sci AMS*. agosto de 2018;14(5):1102–11.
118. Liu J jia, Long Y fan, Xu P, Guo H dong, Cui G hong. Pathogenesis of miR-155 on nonmodifiable and modifiable risk factors in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. el 14 de julio de 2023;15:122.
119. Chen J, Qi Y, Liu CF, Lu JM, Shi J, Shi Y. MicroRNA expression data analysis to identify key miRNAs associated with Alzheimer's disease. *J Gene Med*. 2018;20(6):e3014.
120. Park JS, Kim ST, Kim SY, Jo MG, Choi MJ, Kim MO. A novel kit for early diagnosis of Alzheimer's disease using a fluorescent nanoparticle imaging. *Sci Rep*. el 12 de septiembre de 2019;9:13184.
121. Walgrave H, Zhou L, De Strooper B, Salta E. The promise of microRNA-based therapies in Alzheimer's disease: challenges and perspectives. *Mol Neurodegener*. el 6 de noviembre de 2021;16(1):76.
122. Walgrave H, Balusu S, Snoeck S, Vanden Eynden E, Craessaerts K, Thrupp N, et al. Restoring miR-132 expression rescues adult hippocampal neurogenesis and memory deficits in Alzheimer's disease. *Cell Stem Cell*. el 7 de octubre de 2021;28(10):1805-1821.e8.
123. Salta E, Sierksma A, Eynden EV, Strooper BD. miR-132 loss de-represses ITPKB and aggravates amyloid and TAU pathology in Alzheimer's brain. *EMBO Mol Med [Internet]*. el 2 de agosto de 2016 [citado el 7 de agosto de 2024]; Disponible en: <https://www.embopress.org/doi/10.15252/emmm.201606520>
124. Salta E, De Strooper B. microRNA-132: a key noncoding RNA operating in the cellular phase of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2017;31(2):424–33.
125. Liu X, Wang H, Bei J, Zhao J, Jiang G, Liu X. The protective role of miR-132 targeting HMGA2 through the PI3K/AKT pathway in mice with Alzheimer's disease. *Am J Transl Res*. el 15 de mayo de 2021;13(5):4632–43.
126. Deng Y, Zhang J, Sun X, Ma G, Luo G, Miao Z, et al. miR-132 improves the cognitive function of rats with Alzheimer's disease by inhibiting the MAPK1 signal pathway. *Exp Ther Med*. diciembre de 2020;20(6):159.
127. Cong L, Cong Y, Feng N, Liang W, Wu Y. Up-regulated microRNA-132 reduces the cognition-damaging effect of sevoflurane on Alzheimer's disease rats by inhibiting FOXA1. *Genomics*. noviembre de 2021;113(6):3644–52.
128. Qazi TJ, Lu J, Duru L, Zhao J, Qing H. Upregulation of mir-132 induces dopaminergic neuronal death via activating SIRT1/P53 pathway. *Neurosci Lett*. el 1 de enero de 2021;740:135465.

129. Tan L, Yu JT, Liu QY, Tan MS, Zhang W, Hu N, et al. Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* el 15 de enero de 2014;336(1):52–6.
130. Feng K, Wu Y, Li J, Sun Q, Ye Z, Li X, et al. Critical Role of miR-130b-5p in Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Repair in Mice After Myocardial Infarction. *Stem Cells.* el 1 de enero de 2024;42(1):29–41.
131. Integrated DNA Technologies [Internet]. [citado el 19 de agosto de 2024]. Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis | IDT. Disponible en: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>
132. Dalton S. Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* abril de 2013;25(2):241–6.
133. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. el 29 de marzo de 2021 [citado el 8 de agosto de 2024];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.645593/full>
134. Russell SA, Bashaw GJ. Axon guidance pathways and the control of gene expression. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* abril de 2018;247(4):571–80.
135. Calvo-Rodríguez M, García-Rodríguez C, Villalobos C, Núñez L. Role of Toll Like Receptor 4 in Alzheimer's Disease. *Front Immunol* [Internet]. el 26 de agosto de 2020 [citado el 8 de agosto de 2024];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.01588/full>
136. Song J, Choi SM, Whitcomb DJ, Kim BC. Adiponectin controls the apoptosis and the expression of tight junction proteins in brain endothelial cells through AdipoR1 under beta amyloid toxicity. *Cell Death Dis.* octubre de 2017;8(10):e3102–e3102.
137. KEGG PATHWAY: Alzheimer disease - Homo sapiens (human) [Internet]. [citado el 8 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://www.genome.jp/pathway/hsa05010>
138. Sharma VK, Singh TG, Singh S, Garg N, Dhiman S. Apoptotic Pathways and Alzheimer's Disease: Probing Therapeutic Potential. *Neurochem Res.* el 1 de diciembre de 2021;46(12):3103–22.
139. Goel P, Chakrabarti S, Goel K, Bhutani K, Chopra T, Bali S. Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Front Mol Neurosci* [Internet]. el 25 de agosto de 2022 [citado el 8 de agosto de 2024];15. Disponible

en: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2022.937133/full>

140. Ajoolabady A, Lindholm D, Ren J, Pratico D. ER stress and UPR in Alzheimer's disease: mechanisms, pathogenesis, treatments. *Cell Death Dis.* el 15 de agosto de 2022;13(8):1–15.
141. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res.* el 2 de julio de 2020;48(W1):W244–51.
142. Huang HY, Lin YCD, Li J, Huang KY, Shrestha S, Hong HC, et al. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database. *Nucleic Acids Res.* el 8 de enero de 2020;48(D1):D148–54.
143. Ma M, Liao Y, Huang X, Zou C, Chen L, Liang L, et al. Identification of Alzheimer's Disease Molecular Subtypes Based on Parallel Large-Scale Sequencing. *Front Aging Neurosci.* el 28 de abril de 2022;14:770136.
144. Wang J, Shu H, Guo S. MiR-646 suppresses proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer by repressing FGF2 and CCND2. *Cancer Med.* 2020;9(12):4360–70.

## ANEXOS

### Anexo 1. Secuencias de los miRNAs en humano y en rata.

#### miR-130-5p

Humano	ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC
Rata	ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC

#### miR-147b-5p

Humano	UGGAAACAUUUCUGCACAAACU
Rata	UGGAAACACUUCUGCACAAACU

#### miR-146a-5p

Humano	UAGAACUGAAUCCAUGGGUU
Rata	UAGAACUGAAUCCAUGG_UU

#### miR-32-5p

Humano	UAUUGCACAUAACUAAGUUGCA
Rata	UAUUGCACAUAACUAAGUUGCA

#### miR-4521

Humano	GCUAAGGAAGUCCUGUGCUCAG
Rata	No encontrado

#### miR-3142

Humano	AAGGCCUUUCUGAACCUUCAGA
Rata	No encontrado

#### miR-1178-3p

Humano	UUGCUCACUGUUCCCUAG
Rata	No encontrado

#### miR-4668-5p

Humano	AGGGAAAAAAAAAAGGAUUUGUC
Rata	No encontrado

#### miR-4540

Humano	UUAGUCCUGCCUGUAGGUUUA
Rata	No encontrado

#### miR-548f-3

Humano	AAAAACUGUAAUUACUUUU
Rata	No encontrado

**miR-155-5p**

Humano

UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU

Rata

UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU

**miR-125b-1-3p**

Humano

ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU

Rata

ACAAGUCAGGCUCUUGGGACCU

**miR-132-3p**

Humano

U AACAGUCUACAGCCAUGGUCG

Rata

U AACAGUCUACAGCCAUGGUCG

**miR-9-5p**

Humano

UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA

Rata (miR-9a-3p)

UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA



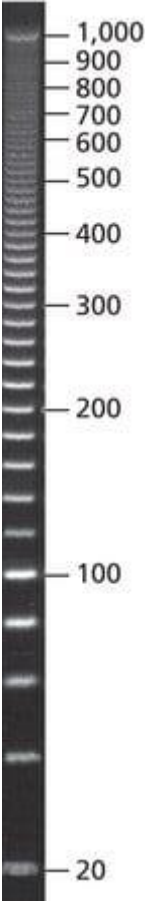
**Anexo II. Secuencia de los primers para la validación de los miRNAs por qPCR.**

<b>Primer</b>	<b>Longitud (nt)</b>	<b>Secuencia</b>
<b>RNU6_Fw</b>	23	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
<b>RNU6_Rv</b>	22	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
<b>miR-130b-5p_Fw</b>	18	ACTCTTTCCTGTTGCAC
<b>miR-130b-5p_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGTAG
<b>miR-4521_Fw</b>	19	GCTAAGGAAGTCCTGTGCT
<b>miR-4521_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCTGA
<b>miR-3142_Fw</b>	19	AGAAGGCCTTCTGAACCT
<b>miR-3142_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCTGA
<b>miR-147b-5p_Fw</b>	20	CAGTGGAACATTTCTGCAC
<b>miR-147b-5p_Rv</b>	28	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAGTTG
<b>miR-146a-5p_Fw</b>	20	GCAGTGAGAACTGAATTCCA
<b>miR-146a-5p_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAACC
<b>miR-32-5p_Fw</b>	22	CGCAGTATTGCACATACTAAG
<b>miR-32-5p_Rv</b>	25	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTGCAAC
<b>miR-1178-3p_Fw</b>	18	GCAGTTGCTCACTGTTCT
<b>miR-1178-3p_Rv</b>	26	CCAGTTTTTTTTTTTTTTCTAGGGA
<b>miR-4668-5p_Fw</b>	23	GCAGAGGGAAAAAAAAAAGGATT
<b>miR-4668-5p_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTGACA
<b>miR-4540_Fw</b>	19	GGAGTTAGTCCTGCCTGTA
<b>miR-4540_Rv</b>	28	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAAAC
<b>miR-548f-3_Fw</b>	24	CAGCAAGCAGAAAACTGTAATTA
<b>miR-548f-3_Rv</b>	29	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTAAAAG
<b>miR-155-5p_Fw</b>	21	GGCAGTTAATGCTAATCGTGA

<b>miR-155-5p_Rv</b>	27	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTAACCCCTA
<b>miR-155-3p_Fw</b>	22	AGGAGCTCCTACATATTAGCAT
<b>miR-155-3p_Rv</b>	27	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGTTA
<b>miR-125b-5p_Fw</b>	18	AGTCCCTGAGACCCTAAC
<b>miR-125b-5p_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCACA
<b>miR-125b-1-3p_Fw</b>	18	AGACGGGTTAGGCTCTTC
<b>miR-125b-1-3p_Rv</b>	26	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGCT
<b>miR-132-3p_Fw</b>	20	GCAAGCAGTAACAGTCTACA
<b>miR-132-3p_Rv</b>	25	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTCGACCA
<b>miR-9-5p_Fw</b>	22	GCAGTCTTTGGTTATCTAGCT
<b>miR-9-5p_Rv</b>	28	CAGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCATAC
<b>rno-RNU6_Fw</b>	22	CTGGCATTGGCAGTACATATAC
<b>rno-RNU6_Rv</b>	19	CTTGCACACTCTTGCACAG

Fw: Forward, Rv: Reverse, rno: rata.

**Anexo III. Patrón de bandeo del *Ladder* 20 bp Low Ladder Sigma-Aldrich.**



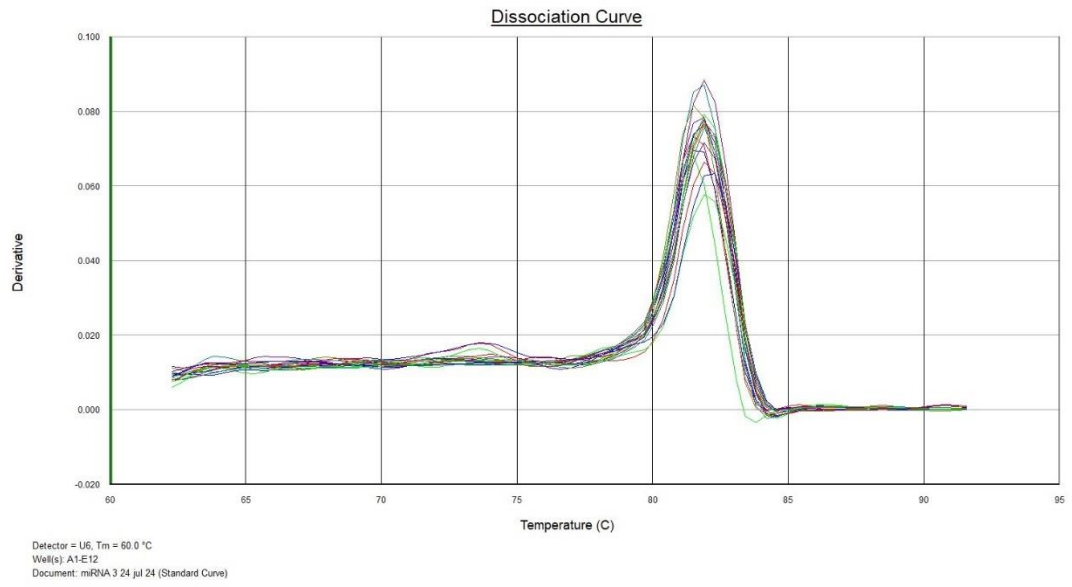
**Anexo IV. Relative Fold Change de los miRNAs**

<b>miR-4521</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.003	2	0.56	0.05	2	0.019
30s	1	0.16	2	0.44	0.19	2	0.086
40s	1	0.42	2	3.44	0.21	2	0.036
<b>miR-32</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.15	2	1.03	0.21	2	0.885
30s	1	0.14	2	0.82	0.07	2	0.431
40s	1	0.01	2	4.1	0.39	2	0.023
<b>miR-3142</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.21	2	0.13	0.08	2	0.041
30s	1	0.06	2	7.17	0.12	2	<0.001
40s	1	0.22	2	1.82	0.19	3	0.041
<b>miR-147b</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.13	2	1.9	0.1	3	0.009
30s	1	0.15	2	0.15	2.25	2	0.647
40s	1	0.25	2	2.74	0.02	2	0.020
<b>miR-146a</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.24	3	48.42	0.07	3	<0.001
30s	1	0.08	2	0.24	0.01	2	0.011
40s	1	0.18	2	0.4	0.22	2	0.062
<b>miR-130b</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.14	2	0.73	0.23	3	0.244
30s	1	0.1	2	0.58	0.03	2	0.086
40s	1	0.18	2	1.66	0.22	3	0.086
<b>miR-1178</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b>P value</b>
<b>Edad</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2<sup>-ΔΔCt</sup></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.41	2	1.2	0.1	2	0.817
30s	1	0.24	2	1.03	0.86	2	0.966
40s	1	0.55	2	0.34	0.24	2	0.595

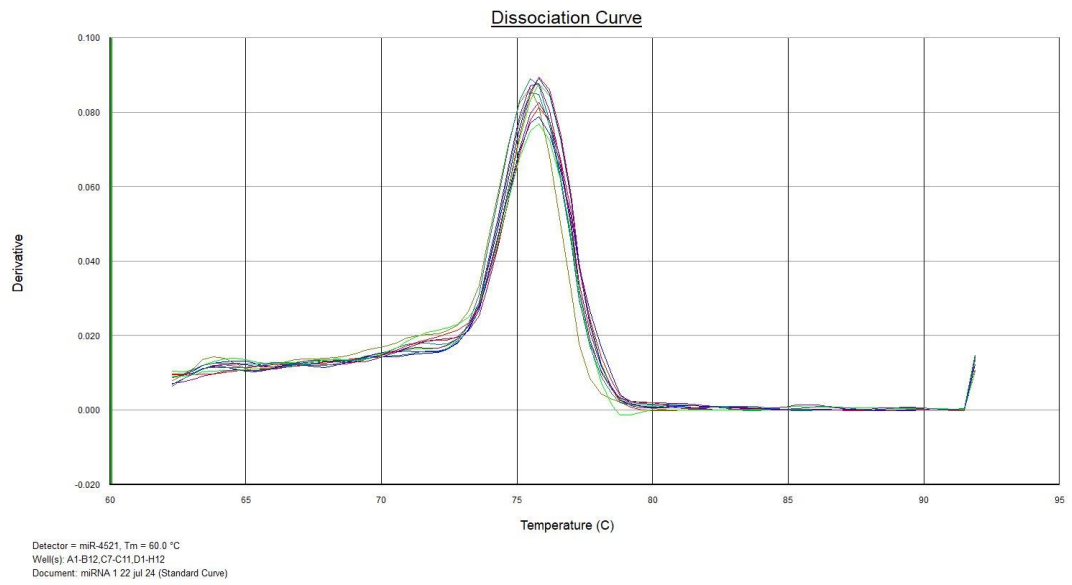
<b>miR-4540</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b><i>P value</i></b>
<b>Edad</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.12	2	1.76	0.12	2	0.046
30s	1	0.25	3	1.92	0.2	2	0.046
40s	1		1	7.69	0.99	2	-
<b>miR-4668</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b><i>P value</i></b>
<b>Edad</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.35	2	0.07	1.02	2	0.347
30s	1	0.1	2	0.68	0.01	2	0.090
40s	1	0.11	2	0.000003	0.21	2	0.079
<b>miR-155</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b><i>P value</i></b>
<b>Edad</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	0.07	2	1.49	0.1	2	0.058
30s	1	0.02	2	0.39	0.17	3	0.051
40s	1	0.16	2	0.0000004	0.27	2	0.058
<b>miR-125b-1</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b><i>P value</i></b>
<b>Edad</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	1.02	2	1.48	0.66	2	0.633
30s	1	0.04	2	2.35	0.75	2	0.333
40s	1	0.64	2	0.0000048	0.53	2	0.408
<b>miR-132</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b><i>P value</i></b>
<b>Edad</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	1	1.71	2	0.43	0.55	2	0.762
30s	1	0.35	2	0.69	0.43	2	0.762
40s	1	0.32	2	0.000005	0.33	2	0.250
<b>miR-9</b>							
	<b>Controles</b>			<b>Portadores</b>			<b><i>P value</i></b>
<b>Edad</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	<b>2-<math>\Delta\Delta\text{Ct}</math></b>	<b>SD</b>	<b>N</b>	
20s	NA	-	-	NA	-	-	-
30s	1	0.06	2	1.91	0.18	2	-
40s	NA	-	-	NA	-	-	-

SD: standard deviation; N: número de repeticiones

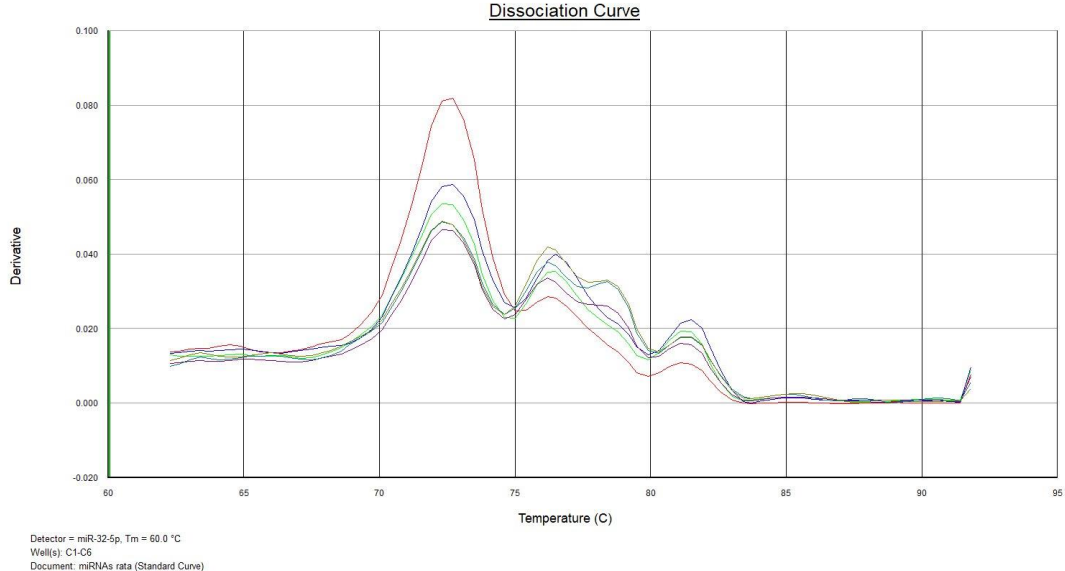
## Anexo V. Curvas de disociación de qPCR de células de portadores U6



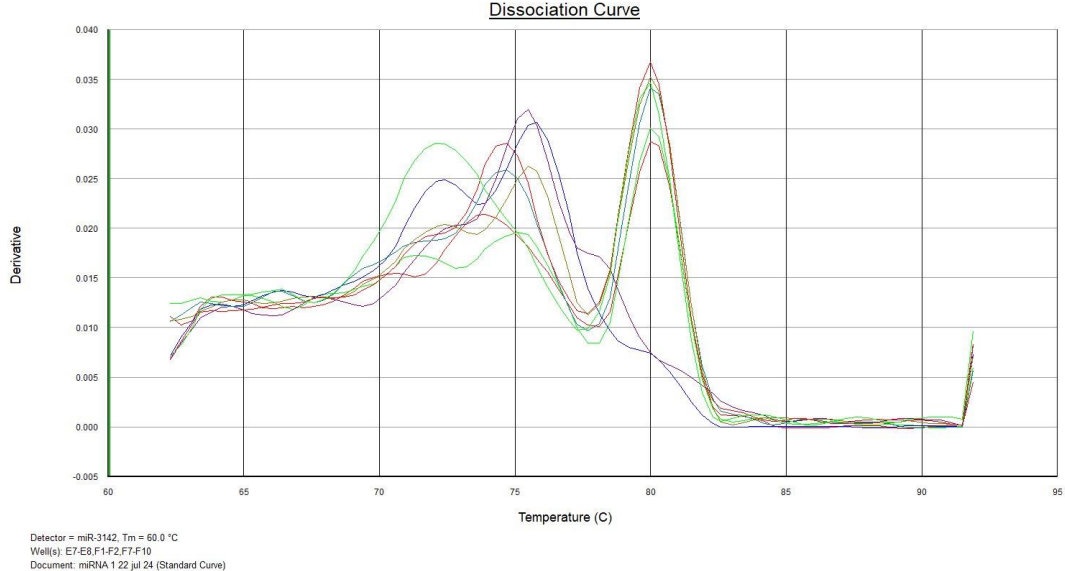
## miR-4521



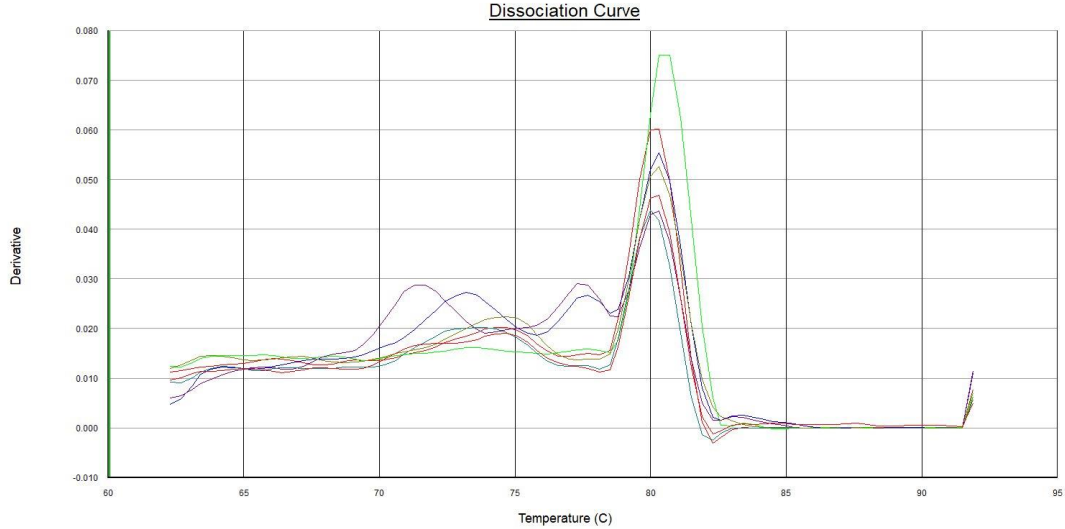
**miR-32**



**miR-3142**

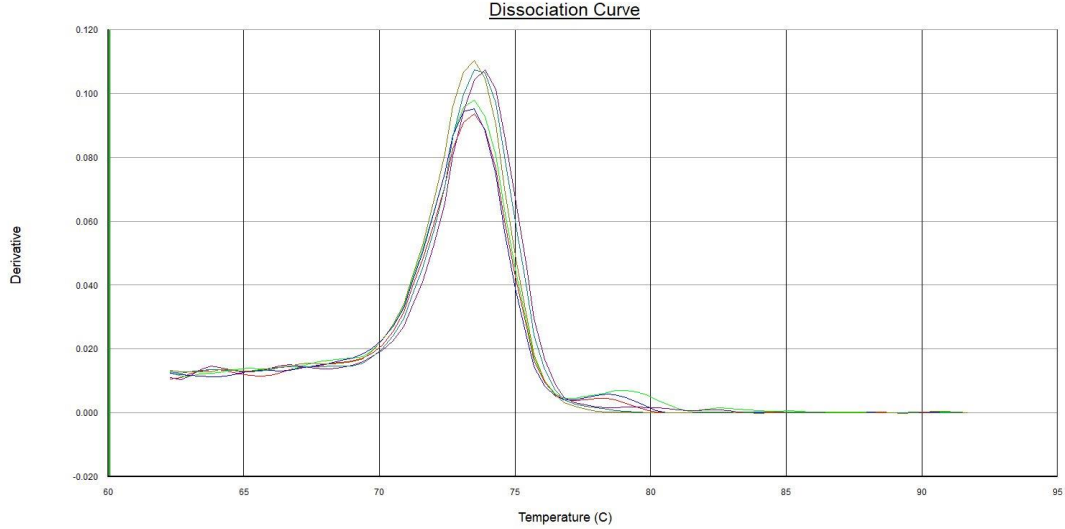


# miR-147b



Detector = miR-147b-5p, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A1-G1,G6,G10-G11,H1,H4-H6  
Document: miRNA 1 22 jul 24 (Standard Curve)

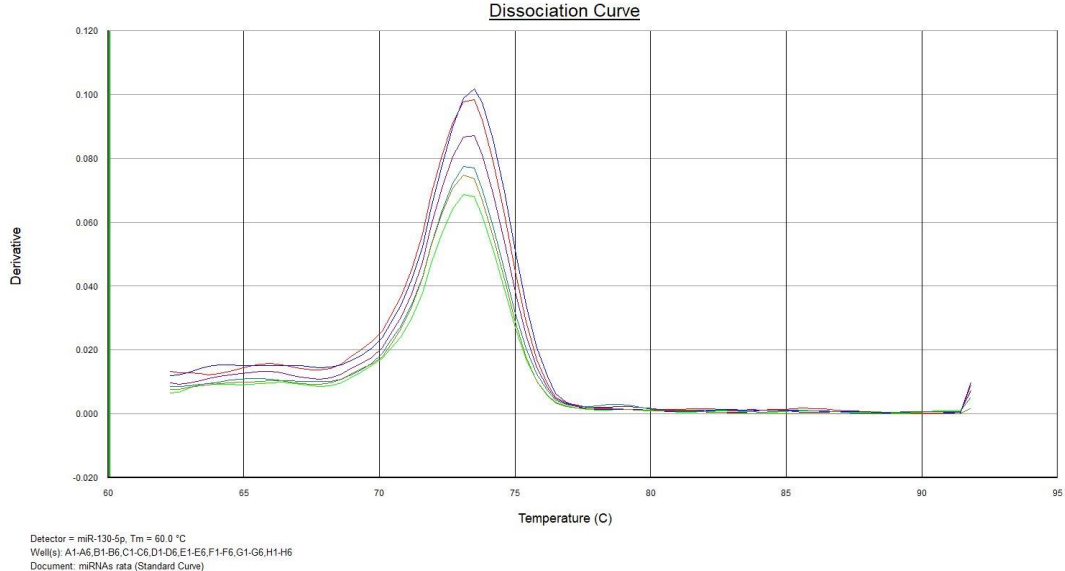
# miR-146a



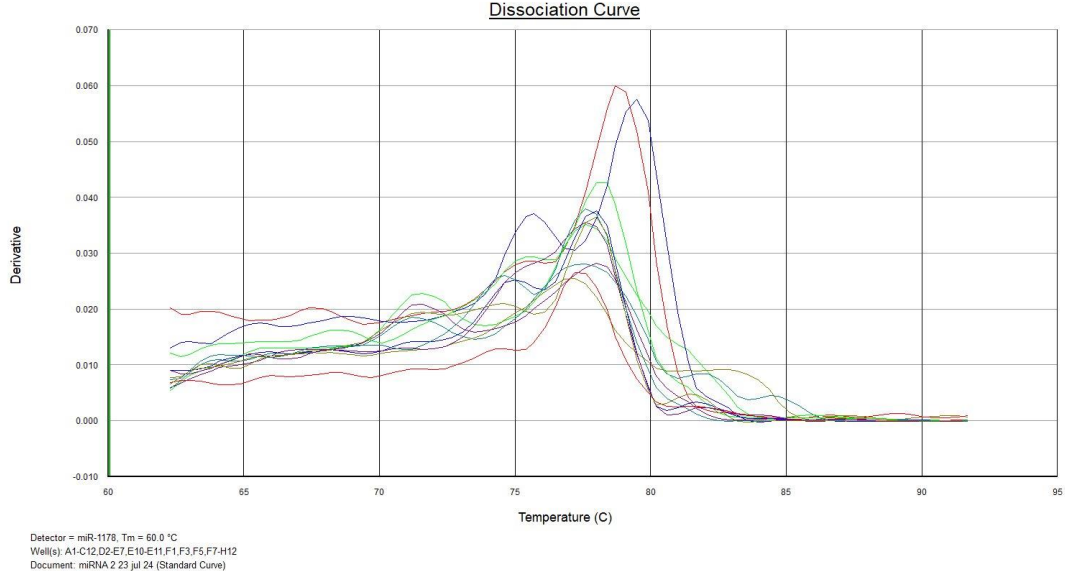
Detector = miR-146a, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A1-B1,B7-B12  
Document: miRNA 2 23 jul 24 (Standard Curve)



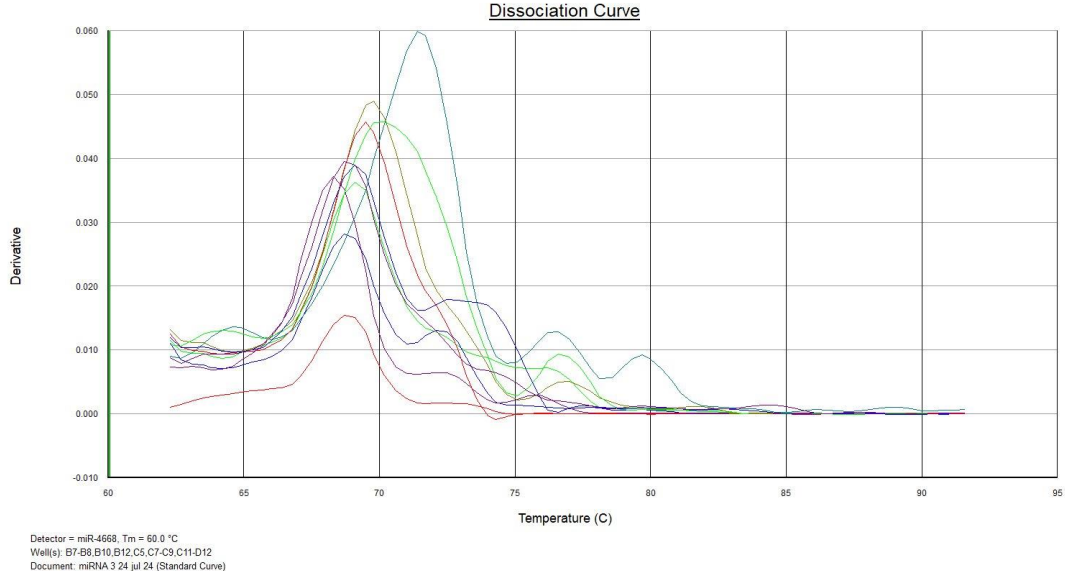
# miR-130b



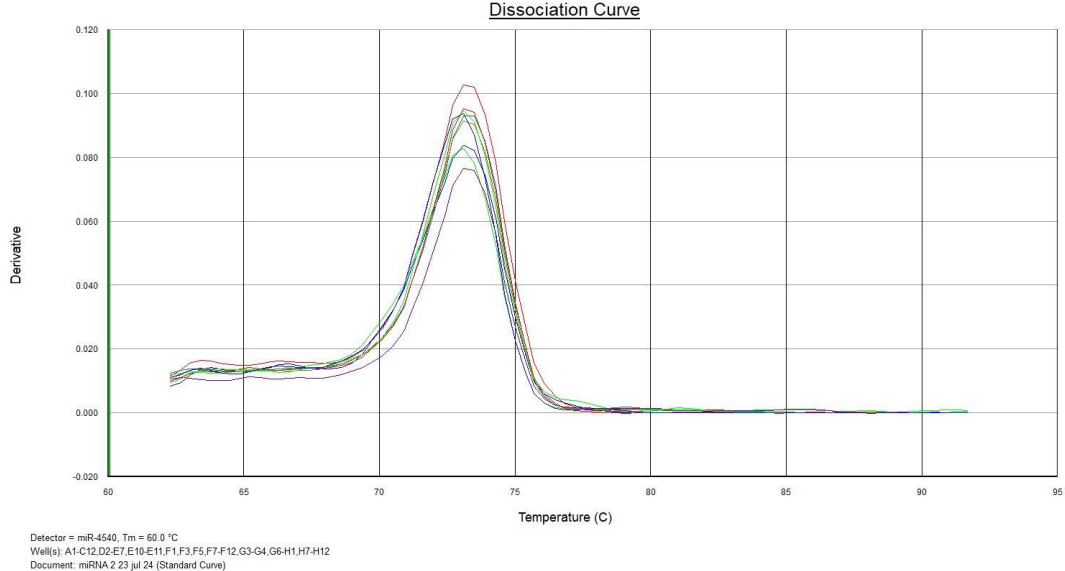
# miR-1178



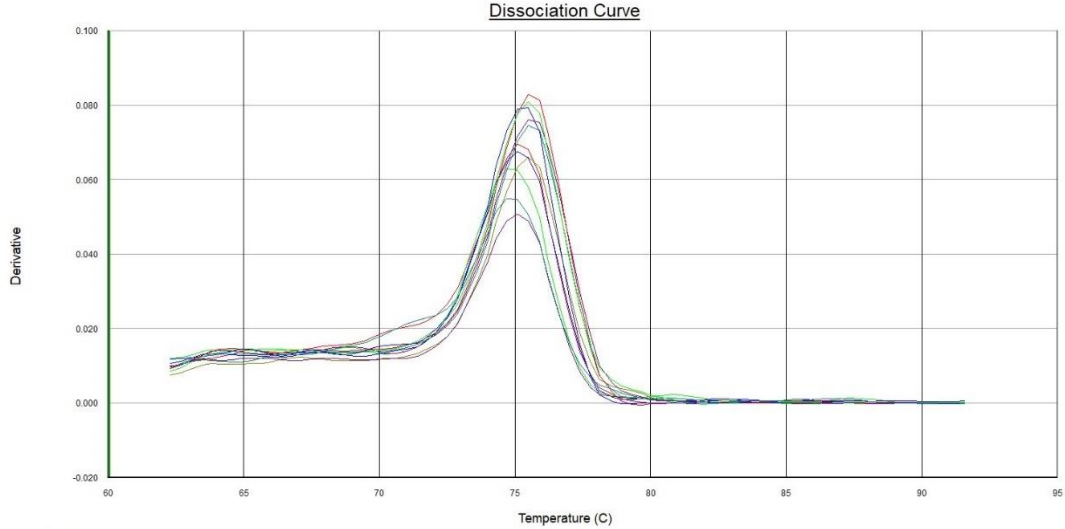
# miR-4668



# miR-4540

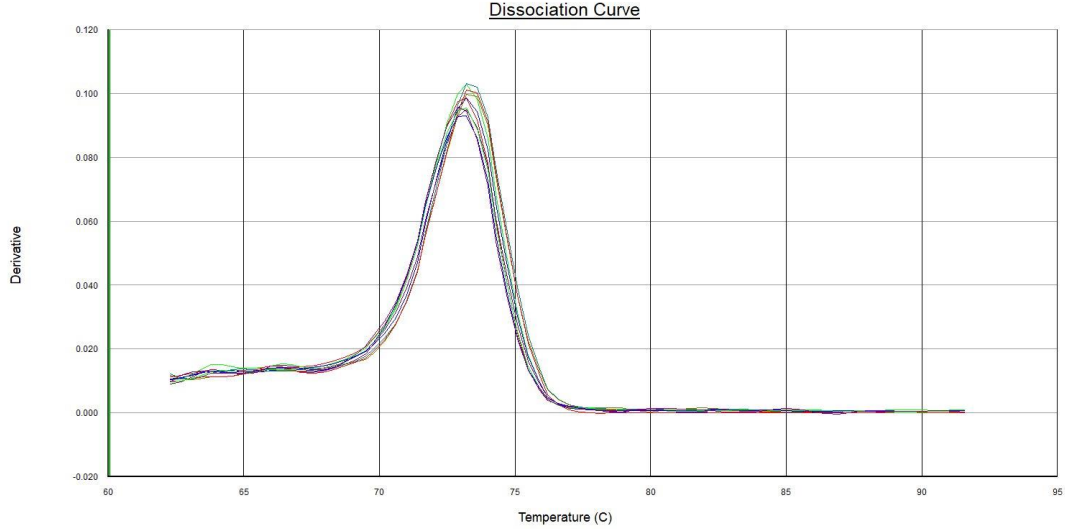


# miR-132



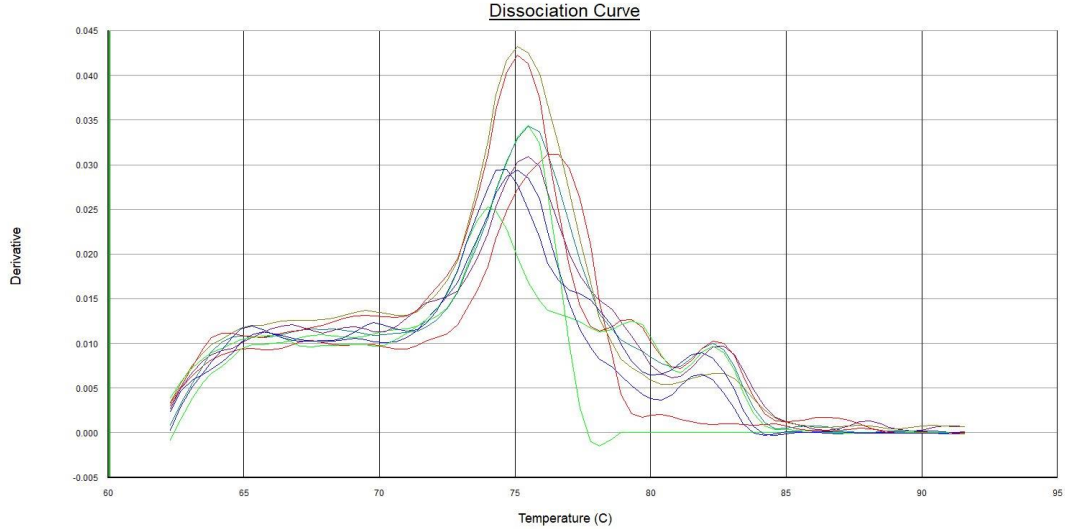
Detector = miR-132, Tm = 60.0 °C  
Well(s): G1, G4, G5, G7, H2, H6  
Document: miRNA 3 24 jul 24 (Standard Curve)

# miR-155



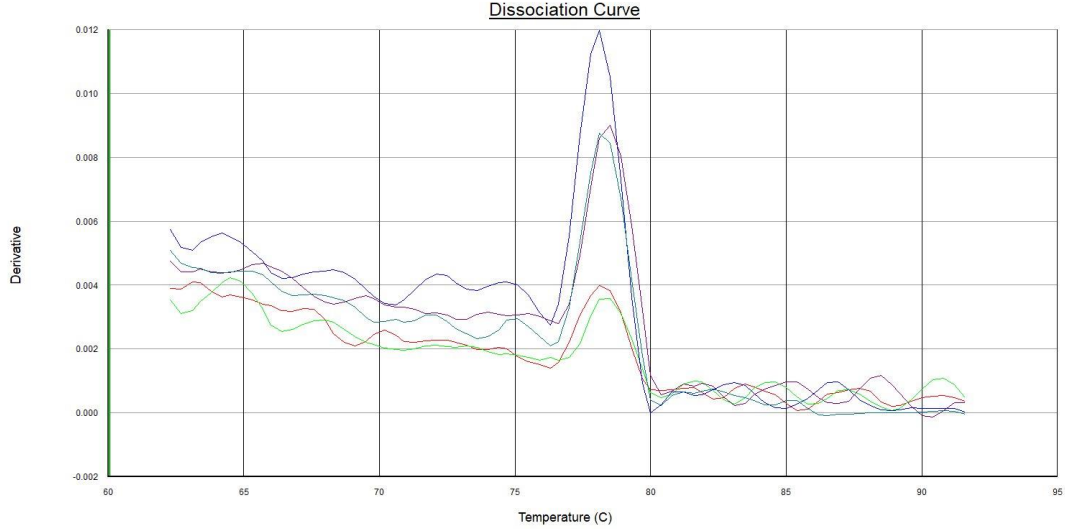
Detector = miR-155, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A1-C12, D2-D4, D6-D9, E4-E7, F1-H12  
Document: miRNA 3 24 jul 24 (Standard Curve)

# miR-125b-1



Detector = miR-125b-1, Tm = 60.0 °C  
Well(s): E10, E12, F3, F5, F6, F10, F11  
Document: miRNA 3 24 jul 24 (Standard Curve)

# miR-9



Detector = miR-9, Tm = 60.0 °C  
Well(s): C2-C6  
Document: miRNA 4 25 jul 24 (Standard Curve)

**Anexo VI. Blancos moleculares de los miRNAs**

<b>miRNA</b>	<b>Blancos</b>
<b>miR-4521</b>	CCND2, FOXM1, MAN2A1, CELF1, CRIM1, NUFIP2, KLHL42, ANKRD13A
<b>miR-3142</b>	ANG, CALM3, CLNS1A, CYLD, MKNK2, PLCB3, TPT1, ZNF74, BZW1, IP6K1, DNAJA2, NEU3, XPOT, RAD54L2, CAMSAP2, DOCK9, SLC24A2, FKBP14, CSRNP3, QRFPR, RAB11FIP4, GSTO2, ADAMTS17, RBM24, ZNF772, SPANXN1
<b>miR-32</b>	ATP2B4, BMPR1A, DST, GOLGA3, GTF2A1, HOXA13, IL6ST, ITGAV, KIF5B, LAMP2, LETM1, DNAJB9, MDM2, MYO5A, NEFL, NEO1, NF2, CNOT4, PTGER4, REL, REV3L, RNF4, SOX11, TMF1, TRAF3, UCK2, UVRAG, ZNF24, ZNF224, EVI5, FXR1, HMGA2, FZD6, GEMIN2, SCAF11, XPR1, KLF4, EDEM1, SPOCK2, EPM2AIP1, TECPR2, CNIH1, ZNF460, PAXIP1, KLHDC10, SMG1, TNRC6B, RPRD2, OTUD3, MORC3, RBFOX2, HECTD1, IBTK, CCDC113, MYLIP, SERTAD3, BCL11A, CCSER2, XRN1, ANKIB1, RSBN1, UHRF1BP1, RBM28, SETD5, SMU1, FBXW7, ATF7IP, WRNIP1, TULP4, MRS2, GATAD2B, CASKIN1, NUFIP2, FAM135A, USP28, PLEKHA1, PBLD, MOAP1, FNDC3B, SHCBP1, QSER1, PTGES2, CPEB4, SLC10A7, KIAA1109, PRRC2B, PIK3AP1, LIN54, CPEB2, MPP7, SESN3, CCDC171, CNEP1R1, PPP1R37, FAM126B, MIA3
<b>miR-147b</b>	HMGCS1, NDUFA4, ALDH5A1, VGLL4, SLCO3A1
<b>miR-146a</b>	CCNA2, EGFR, ERBB4, HSPA1A, IFI27, IFIT1, IFIT3, IRAK1, SMAD4, MX2, NFIX, PMAIP1, PRKCE, RAC1, ROBO1, SFRP1, SNAP25, STAT1, TBP, PP1R11, TFDP2, TLR2, TRAF6, CXCR4, CCDC6, OASL, FADD, IL1RL2, ITGBL1, BCLAF1, IFI44, CCR9, COPS8, IFI44L, FAF1, TAB2, MTUS2, IFIT5, LSM4, SPATS2L, SERBP1, TIGAR, PLEKHG5, SRPRB, KCTD15, ATG9A, CYBRD1, LIMD2, TMPRSS5, USP48, RAB2B, STON2, SYT12, EPSTI1, ARL8A, TMEM167A, SAMD9L, ZNF260
<b>miR-1178</b>	ICE2, ABCF1, DUSP6, CTTN, HSPA6, HTR1F, KLK2, PLS1, PPP3CB, MAPK9, RDX, SOS1, STAT3, SURF4, TLR4, TP63, CCPG1, RASSF2, ABI2, SPTLC1, PARVB, GPR132, HUNK, C9orf78, RNF216, UEVLD, CABP4, ANKRD50, RHOJ, SFMBT2, ZMAT3, TNS3, SLC30A5, METTL16, PAGR1, TMEM134, STK40, FBXL20, STON2, ZNF486, PLXNA4, BTBD9, USH1G, GPR155, RNF38, THAP6, SLFN5, ago-03, FADS6, RPL7L1, GPIHBP1, ANKRD36, RGS9BP, FLG2
<b>miR-4540</b>	MYOCD, ZNF678, DDX6, GNAS, ABLIM1, ATXN3, ORC4, PEX13, YWHAE, PER2, B3GALT5, TMEM50A, FBXO25, PI4K2A, RALGAPB, ODF2L, CCDC90B, RSRC2, PHF5A, FBXL20, ACBD5, KLHL23, ADAMTS15, UBN2
<b>miR-4668</b>	CCNF, CPM, CPT1B, DLG4, EXT1, B4GALT1, IGF1R, KCNB1, SMAD4, MAZ, KMT2A, MYC, NF2, OCRL, PDPK1, PPIA, PPP1CB, RAP2B, REST, SP1, TAPBP, TRPS1, TSC1, UCP1, WEE1, SHOC2,

	AXIN2, OGT, KCNK6, PHACTR2, FCHSD2, DLC1, ACAP2, SRPX2, RAB30, SLC35C2, DPP8, SOX6, CISD1, RCC2, SH3RF1, PHF12, KLHL12, WNK3, ZBTB10, TBL1XR1, ZBTB3, ZFP91, CRISPLD2, TMEM164, LCOR, NAV2, XKR4, SLC24A4, TRPM6, LACC1, CCDC117, ZNF579, GBP6, TET3, ARL5B, SIAH3, ZNF619, GEN1, ZNF713, SFT2D2
<b>miR-132</b>	ADH1A, ALK, AMD1, TRIM23, ARF6, TNFRSF17, BNIP2, CA1, CALU, CASP7, CCNB1, CDH3, CDKN1A, CFTR, CHRNA5, CR2, CRK, CYP26A1, HBEGF, ECT2, EGFR, EIF2S3, EPHA4, EYA4, ACSL4, FUT1, GK, GNB1, GSK3B, GTF2H1, HSPA1B, IMPA1, KCNJ9, KPNA1, STMN1, LDLR, LFNG, LIFR, MAP1B, MECP2, MEF2A, MAP3K3, NAP1L1, NBN, NDUFB10, OAS2, PLAGL2, PLSCR1, MAPK1, PTGS2, RAF1, RASA1, RPL7, SDF2, SMN1, SPAST, SSR3, STAU1, TSPAN6, VDAC2, ZNF148, ZNF236, MLLT10, TAF15, KDM5C, FZD6, CNTNAP1, PLA2G4C, CD164, HDAC3, ATP6V0E1, USP8, ARHGAP32, ZEB2, HS3ST3B1, ACTR2, FRY, YKT6, CHL1, NCKAP1, TUSC2, ZNF652, TBC1D9, FBXO28, ANKRD28, CAMSAP2, CSTF2T, SMCHD1, CRTC1, SIRT1, NCS1, ASF1A, EML4, SEC61A1, DMGDH, PHF20L1, IER3IP1, CTDSPL2, BRWD1, SLC38A2, CCSER2, GNL3L, MTMR10, KLHL11, VPS13D, UBE2W, LGR4, DOCK10, INTS8, MUC13, RTN4, TNRC6C, PRX, FKBP10, PRSS22, RNF128, FAT4, GSTCD, SLC25A32, VMP1, FBN3, EBPL, DEPDC7, ADAMTSL1, TJAP1, OSBPL8, SFXN2, FAT3, CMTM3, FAM199X, MUC17, ZNF280B, KBTBD3, FAM81A, ANKRD29, SYNE3, SPRED1, ARID2, CC2D1B, EOGT, KRT6C, COX8C, KCTD4, FAM221B, KRTAP4-11
<b>miR-155</b>	ADD3, AP1G1, AGL, ALDH3A2, ANPEP, ANXA2, APAF1, RHOA, ASPH, ATP6V1C1, BACH1, CCND1, BDNF, CALU, CBL, CDH2, CDH13, CDK2, CDK5, CDKN1B, CDKN2A, CFL2, CPD, MAPK14, CSE1L, CSNK1A1, CTNND1, CUX1, CYB5A, DBN1, DMD, DR1, DSG2, PHC2, EGFR, EIF4G2, EPB41L2, F5, FOS, GLG1, GNAS, GPM6B, NR3C1, GSK3B, HAL, HIF1A, HIVEP2, HMGCS1, DNAJB1, IL1B, KIF22, KPNA5, KRAS, LPL, MARCKS, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, MECP2, MEIS1, MET, MKLN1, MLH1, MMP16, MOV10, MSH2, MTAP, MYBL1, MYC, MYLK, MYO1E, NFE2L2, NFKB1, NOTCH2, NOVA1, SLC11A2, NT5E, PAK2, PCCA, PDK1, PIK3CA, PIK3R1, PLK1, PLS1, PPP2R2A, PKIA, PRKAR1A, PRKCI, PTPRJ, RAB3B, RAB6A, RAC1, RAP1B, RCN2, RORA, RP2, RREB1, SDCBP, SEL1L, SRSF1, SMARCA4, SMARCD2, SP1, UAP1, STAT3, HSPA13, AURKA, STX5, SUPT5H, TCF4, GCFC2, TCF12, TMBIM6, TERF1, TJP1, TLE4, TPD52, TPP2, TRIO, TRPS1, UBE2D2, UBE2D3, UBE2G1, UBE2H, UGT8, UQCRB, VAV2, VCAM1, WNT5A, YWHAZ, ZFP36, ZIC3, ZNF148, VEZF1, SLC30A1, LUZP1, ALDH5A1, PICALM, CUL4B, PPFIBP1, YBX3, COPS3, SOCS1, DDX3Y, EIF3A, TRIM24, GMPS,

	<p>SGPL1, FUBP1, EIF2B5, KYNU, UBA3, USP8, NOLC1, VAMP3, ZNF254, FEZ2, IKBKE, PHF14, RAPGEF2, DOCK4, PHACTR2, CKAP5, LPGAT1, KIF14, DMTF1, UBA2, ACTR2, PSME3, ABCC4, BET1, PGRMC2, ZBTB18, CCT2, PDLIM5, GNA13, STAG2, NCKAP1, MTHFD2, CCR9, MAN1A2, PAPOLA, TOMM34, SLC27A2, GLIPR1, PDCD10, ACOT7, HSPA4L, ZNF652, RAB11FIP2, AAK1, TRAK1, TRIM32, PLXND1, RGL1, RCOR1, GANAB, FAM120A, PSME4, ANKRD12, DPY19L1, UBR4, MED13L, EXOSC2, TRAM1, MORC3, SLC39A14, CARHSP1, SLC7A11, ZKSCAN5, SH3BP4, GABARAPL1, ATXN10, RPAP1, LTN1, RAI14, HERC4, CHTOP, GAPVD1, ARL5A, PHGDH, INTS6, DNAJC2, ARFIP1, PDCD4, RAB30, EML4, OSTM1, UBQLN1, GOLT1B, VPS36, TXNDC12, KLHL5, MECR, MEX3C, PCYOX1, LUC7L2, RSF1, BTBD1, LRP1B, KCTD5, PLEKHA5, GNL3L, ARL15, KLHL28, TBC1D8B, MRPL16, PDPR, DET1, ARGLU1, TMEM33, RIF1, PBRM1, RPRD1A, STRBP, IL17RB, SOX6, LRRC40, NSUN5, MBNL3, SLC25A40, CTNNB1, MFF, TWSG1, PELI1, SLC39A10, ERGIC1, TBC1D14, FAM135A, WDFY1, TSHZ3, GPAM, CHD8, RBAK, GNB4, BCORL1, RNF123, NCAPG, ATL2, HHIP, ATG3, ATPAF1, FNDC3B, RBM42, DCAF10, CDC73, DHX40, CCDC82, L2HGDH, TRAPPC13, NAA25, VCIPI1, MYO19, CHD9, NAA50, CPEB4, WDR82, CAB39L, TSPAN14, VANGL1, OBSCN, RAB6C, ANTXR1, POLR1B, PHF6, CMSS1, MCM8, GPT2, CBR4, SSH2, PNPT1, ZNF160, FMNL3, OXNAD1, UBTD2, SPECC1, ZNF561, TP53INP1, CEP41, FMNL2, OSBPL9, TMEM123, SSX2IP, UBE2J2, MSI2, PRRC1, KRT80, CREBRF, MOSPD2, ZNF384, PDE12, HNRNPA3, LNX2, ZBTB38, MMS22L, KANSL1, ZNF493, AMIGO2, PTAR1, AGRN</p>
<b>miR-125b</b>	NR3C1

**Anexo VII. Genes involucrados en las vías KEGG y GO del estadio asintomático 20s.**

<b>n</b>	<b>Término</b>	<b>Genes</b>
<b>KEGG PATHWAY</b>		
<b>1</b>	Pathways in cancer	ALK, GSK3B, CDKN1A, CXCR4, PTGS2, EGFR, IGF1R, CASP7, MYC, MAPK1, PMAIP1, FADD, RAC1, SMAD4, GSTO2, STAT1, PLEKHG5, FZD6, AXIN2, EML4, CCNA2, PLCB3, SP1, TRAF6, GNB1, CCDC6, CALM3, RAF1, CRK
<b>2</b>	Human cytomegalovirus infection	GSK3B, CDKN1A, CXCR4, TSC1, PTGS2, EGFR, TAPBP, PLCB3, SP1, MYC, GNB1, MAPK1, CALM3, FADD, RAC1, RAF1, CRK
<b>3</b>	MAPK signaling pathway	MAP3K3, PLA2G4C, EGFR, IGF1R, IRAK1, ERBB4, MYC, RASA1, TRAF6, STMN1, MKNK2, MAPK1, TAB2, RAC1, RAF1, CRK, HSPA1B, HSPA1A
<b>4</b>	Colorectal cancer	GSK3B, CDKN1A, SMAD4, MYC, PMAIP1, MAPK1, RAC1, AXIN2, RAF1, EGFR
<b>5</b>	Human immunodeficiency virus 1 infection	CXCR4, TAPBP, WEE1, CCNB1, IRAK1, TRAF6, GNB1, MAPK1, CALM3, TAB2, FADD, RAC1, RAF1, CRK, TLR2
<b>6</b>	Cellular senescence	CCNA2, PPP1CB, CDKN1A, CCNB1, MYC, VDAC2, MAPK1, TSC1, CALM3, NBN, RAF1, SIRT1
<b>7</b>	Wnt signaling pathway	GSK3B, PLCB3, SFRP1, SMAD4, TBL1XR1, MYC, FZD6, RAC1, AXIN2, SIRT1, LGR4
<b>8</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	GSK3B, SMAD4, REST, MYC, FZD6, MAPK1, LIFR, AXIN2, RAF1, IGF1R
<b>9</b>	Fc gamma R-mediated phagocytosis	ACTR2, PRKCE, PLA2G4C, MAPK1, RAC1, RAF1, CRK, ARF6
<b>10</b>	FoxO signaling pathway	CDKN1A, SMAD4, CCNB1, PDPK1, MAPK1, RAF1, SIRT1, EGFR, IGF1R
<b>11</b>	Insulin signaling pathway	PPP1CB, GSK3B, PDPK1, MKNK2, MAPK1, TSC1, CALM3, RAF1, CRK
<b>12</b>	Toll-like receptor signaling pathway	IRAK1, STAT1, TRAF6, MAPK1, TAB2, FADD, RAC1, TLR2
<b>13</b>	Ras signaling pathway	RASA1, PLA2G4C, GNB1, MAPK1, SHOC2, CALM3, RAC1, RAF1, EGFR, IGF1R, ARF6
<b>14</b>	Autophagy - animal	VMP1, PDPK1, TRAF6, ATG9A, MAPK1, TSC1, RAF1, YKT6, IGF1R
<b>15</b>	Axon guidance	GSK3B, EPHA4, PDPK1, RASA1, MAPK1, CXCR4, RAC1, RAF1, ROBO1
<b>GO BIOLOGICAL PROCESS</b>		
<b>1</b>	Defense response to virus	RAB2B, STAT1, MX2, IFIT5, IFIT1, IFIT3, IFI44L, OASL, PLSCR1, IFI27, OAS2, PMAIP1, FADD, TLR2
<b>2</b>	Protein autophosphorylation	ALK, GSK3B, MAP3K3, EPHA4, IRAK1, ERBB4, PDPK1, WNK3, MKNK2, EGFR, IGF1R
<b>3</b>	Apoptotic process	MEF2A, NCKAP1, CSRNP3, KMT2A, PRKCE, FAF1, CXCR4, RTN4, CASP7, BCLAF1, PLSCR1, IFI27, DPP8, DLC1, PMAIP1, BNIP2, MAPK1, FADD, RAF1, PPIA, OGT, TLR2
<b>4</b>	Response to virus	OAS2, MX2, STMN1, IFI44, CXCR4, IFIT1, TPT1, IFIT3, OASL



<b>5</b>	Cellular response to hypoxia	CCNA2, SFRP1, TIGAR, IRAK1, MYC, PRKCE, PMAIP1, PTGS2, SIRT1, RTN4
<b>6</b>	MAPK cascade	PPP1CB, MEF2A, MAP3K3, MYC, PRKCE, NF2, RAF1, EGFR, SH3RF1
<b>7</b>	Positive regulation of DNA repair	SMCHD1, TIGAR, EYA4, CCDC117, SIRT1, EGFR
<b>8</b>	Hippocampus development	MECP2, ALK, GSK3B, TSC1, NF2, CRK, IGF1R
<b>9</b>	Extrinsic apoptotic signaling pathway	GSK3B, SFRP1, SMAD4, IFI27, PDPK1, FADD
<b>10</b>	Negative regulation of apoptotic process	GSK3B, CDKN1A, HDAC3, SIRT1, EGFR, IFIT3, SH3RF1, IGF1R, SFRP1, ERBB4, MYC, RASA1, WNK3, BNIP2, RAF1, HSPA1B, TPT1, HSPA1A
<b>11</b>	Negative regulation of cell population proliferation	CDKN1A, SMAD4, TSC1, PTGS2, IFIT3, SFRP1, REST, ERBB4, DLC1, NF2, RAF1, COPS8, ARID2, HSPA1B, HSPA1A, TLR2
<b>12</b>	Regulation of protein stability	USP8, GNL3L, HDAC3, RNF128, SIAH3, MAPK1, NF2
<b>13</b>	Innate immune response	GBP6, RAB2B, MX2, IFIT5, OASL, CYLD, LACC1, IL1RL2, IFI27, IRAK1, OAS2, TRAF6, ANG, FADD, LGR4, TRIM23, TLR2
<b>14</b>	Regulation of cyclin-dependent serine/threonine kinase activity	CCNA2, CDKN1A, CCNB1, CCNF, GTF2H1
<b>15</b>	Regulation of apoptotic process	ALK, STAT1, TRAF6, NF2, FADD, RAF1, SIRT1, RTN4, TPT1, KPNA1
<b>GO CELULAR COMPONENT</b>		
<b>1</b>	Cytosol	DMGDH, NCKAP1, CRTC1, CCNF, IFIT5, IFIT1, IFIT3, RPL7, DOCK10, PPP1CB, STMN1, NBN, KRT6C, KPNA1, MEF2A, USP8, PRKCE, TSC1, OCRL, EML4, SFRP1, RNF128, MAP1B, KRTAP4-11, CLNS1A, VDAC2, RAF1, PPIA, CFTR, KMT2A, KLHL11, KLHL12, CAMSAP2, CCNB1, SPAST, IRAK1, DPP8, PMAIP1, FADD, SMN1, IP6K1, ECT2, ANKRD28, OSBPL8, SMAD4, ZNF260, RCC2, LSM4, CYLD, ARHGAP32, MLLT10, GNL3L, EIF2S3, DLG4, GNB1, WNK3, SPATS2L, CALM3, TAB2, NF2, COPS8, BRWD1, OGT, CC2D1B, GSK3B, SNAP25, CDKN1A, KDM5C, MTMR10, DOCK9, FAF1, AMD1, STON2, SH3RF1, LIMD2, OASL, MECP2, CASP7, SPRED1, CA1, IMPA1, NCS1, MUC13, RAC1, ACTR2, USP48, GSTO2, PDPK1, PLEKHG5, PLA2G4C, AXIN2, SIRT1, CCNA2, ZEB2, PLCB3, PLSCR1, RAP2B, OAS2, TRAF6, RASA1, ANG, CRK, RBM24, ARF6, HDAC3, STAU1, ADH1A, ERBB4, BNIP2, MAPK1, SHOC2, YKT6, MAP3K3, TIGAR, CMTM3, GK, STAT1, MX2, TNRC6C, REST, XPOT, DLC1, SERBP1, DNAJA2, CCDC6, TPT1, HSPA1B, HSPA1A
<b>2</b>	Cytoplasm	DMGDH, SAMD9L, CRTC1, CCNF, IFIT1, BZW1, IFIT3, IFI44L, RPL7, DOCK10, PPP1CB, CDH3, MYC, STMN1, SOX6, TRIM23, KPNA1, USP8, EPHA4, PRKCE, MTUS2, TSC1, OCRL, ACSL4, EML4, ACAP2,

		RNF128, RAF1, PPIA, CFTR, ARL8A, GSTCD, NEU3, CCNB1, SPAST, IRAK1, DPP8, FADD, SMN1, IP6K1, ECT2, SLC38A2, SMAD4, SIAH3, IFI44, UBE2W, EIF2S3, SP1, DLG4, GNB1, WNK3, SRPRB, SPATS2L, CCSER2, CALM3, TAB2, NF2, COPS8, GSK3B, SNAP25, KDM5C, MTMR10, PPP1R11, SYNE3, SH3RF1, OASL, ROBO1, ADAMTSL1, CASP7, ARL5B, CA1, IMPA1, PRX, NCS1, RAC1, ACTR2, TBP, GSTO2, PDPK1, PLEKHG5, CCDC117, AXIN2, SIRT1, CCNA2, PLCB3, PLSCR1, OAS2, TRAF6, RASA1, TET3, SFT2D2, CRK, ARF6, TLR2, SLC24A4, HDAC3, STAU1, CXCR4, PTGS2, EGFR, BCLAF1, SRPX2, MKNK2, BNIP2, MAPK1, SHOC2, YKT6, MAP3K3, TIGAR, TAF15, STAT1, MX2, EYA4, NAP1L1, WEE1, REST, XPOT, DLC1, SERBP1, DNAJA2, TPT1, HSPA1B, HSPA1A
<b>3</b>	Protein-containing complex	ALK, CDKN1A, B4GALT1, CXCR4, PTGS2, EGFR, IRAK1, MYC, TRPS1, TBP, STAT1, TSC1, LSM4, MLLT10, PLCB3, TRAF6, SPATS2L, CALM3, OGT, PPIA, CRK, HSPA1B, ASF1A, CFTR, HSPA1A
<b>4</b>	Nucleus	CRTC1, CCNF, RPL7, DOCK10, PPP1CB, MYC, NBN, SOX6, TRIM23, KPNA1, MEF2A, USP8, PRKCE, MTUS2, TSC1, OCRL, TBL1XR1, CLNS1A, ZNF713, VDAC2, RAD54L2, RAF1, PPIA, CFTR, KCTD15, ASF1A, KMT2A, MAZ, ZBTB3, CCNB1, SPAST, IRAK1, PMAIP1, SMN1, ZNF148, IP6K1, ECT2, SMAD4, ZNF260, PHF12, RCC2, ZBTB10, LSM4, MLLT10, LACC1, UBE2W, SP1, CALM3, NF2, COPS8, BRWD1, OGT, INTS8, ZNF652, CC2D1B, ZNF772, GSK3B, CDKN1A, KDM5C, CSRN3, PPP1R11, FAF1, MECP2, CASP7, TRPS1, ZNF280B, PRX, RAC1, ACTR2, USP48, TBP, PDPK1, ZFP91, CCDC117, AXIN2, SIRT1, CCNA2, PHF20L1, ZEB2, PLCB3, PLSCR1, TFDP2, TRAF6, TET3, LCOR, ANG, ZNF236, CRK, RBM24, HDAC3, NFIX, EGFR, BCLAF1, ERBB4, MKNK2, PLAGL2, MAPK1, SHOC2, TIGAR, TAF15, GK, STAT1, MX2, EYA4, NAP1L1, WEE1, REST, ZNF619, DLC1, SERBP1, ZNF74, ZNF579, TPT1, HSPA1B, HSPA1A
<b>5</b>	Axon	GSK3B, EPHA4, KCNB1, STAT1, PLEKHG5, ROBO1, IGF1R, ADAMTSL1, SPAST, CHL1, MAP1B, NCS1, SMN1, SLC38A2, ARL8A
<b>6</b>	Neuron projection	SNAP25, CHRNA5, STAU1, DLG4, STMN1, NF2, RAC1, STON2, SMN1, PTGS2, RTN4, ROBO1
<b>7</b>	Postsynaptic density	USP8, ARHGAP32, PDPK1, DLG4, MAP1B, NCS1, TSC1, RTN4, RPL7, KPNA1
<b>8</b>	Dendritic spine	DOCK10, EPHA4, USP8, ARHGAP32, DLG4, MAP1B, RAC1
<b>GO MOLECULAR FEATURE</b>		
<b>1</b>	Protein binding	NCKAP1, CCNF, IFIT5, IFIT1, IFIT3, RPL7, MYC, STMN1, SOX6, TRIM23, MEF2A, EPHA4, ATP6V0E1, PRKCE, MTUS2, CPT1B, EML4, SFRP1, RNF128, IFI27, MAP1B, CLNS1A, KRTAP4-11, VDAC2, CFTR, KCTD15, ASF1A, ZBTB3, FAM221B, NEU3, SPAST, TSPAN6, FADD, ZNF148, TRPM6, RAB11FIP4, ZNF260, SIAH3, RCC2, FZD6, IFI44, EXT1, CYLD, MLLT10, LACC1, WNK3, CALU, CALM3, SFXN2, FAT4, INTS8, CC2D1B, FKBP10, CDKN1A, PPP1R11, FKBP14, FAF1, STON2, IER3IP1, SH3RF1, LIMD2, ROBO1, MECP2, IMPA1, PRX, NCS1, RAC1, GSTO2, SSR3, CCDC117, SIRT1, PHF20L1, ZEB2, PLCB3, PLSCR1, RAP2B, TET3, ZNF236, HBEGF, ARF6, TLR2, NFIX, STAU1, ADH1A, CXCR4, PTGS2, EGFR, BCLAF1, SRPX2, PLAGL2, SHOC2, LDLR, MAP3K3, TIGAR, GK, STAT1, KCNB1, GTF2H1, VMP1, XPOT, DLC1, SERBP1, CCDC6, ZNF579, LGR4, HSPA1B, HSPA1A, SAMD9L, TMEM167A, CRTC1, TUSC2, FBXO28, IGF1R, DOCK10, PPP1CB, SMCHD1, NBN, ARID2, KRT6C, FAM81A, KPNA1, USP8, RAB2B, ATG9A, TSC1, OCRL, LIFR, KCTD4, RAB30, TBL1XR1, RAD54L2, RAF1, PPIA, ARL8A,

		NDUFB10, CHRNA5, KMT2A, GSTCD, MAZ, KLHL11, KLHL12, RTN4, CAMSAP2, CCNB1, IRAK1, DPP8, TNFRSF17, PMAIP1, SMN1, IP6K1, 7ECT2, SLC38A2, ANKRD28, ANKRD29, CD164, OSBPL8, SMAD4, MUC17, PHF12, ZBTB10, CYBRD1, FAM199X, LSM4, TJAP1, ARHGAP32, UBE2W, GNL3L, EIF2S3, SP1, DLG4, GNB1, TAB2, NF2, COPS8, OGT, ZNF652, ZNF772, ALK, GSK3B, SNAP25, KDM5C, CNTNAP1, DOCK9, AMD1, CTDSPL2, SYNE3, OASL, SEC61A1, CA1, CASP7, ARL5B, SPRED1, TRPS1, PHACTR2, QRFPR, ACTR2, USP48, CR2, TBP, PDPK1, PLA2G4C, TBC1D9, ZFP91, AXIN2, NAV2, TAPBP, CCNA2, FCHSD2, TFDP2, OAS2, TRAF6, RASA1, LCOR, ANG, SFT2D2, CRK, RBM24, HDAC3, CSTF2T, ERBB4, MKNK2, BNIP2, MAPK1, TAF15, CMTM3, KCNJ9, MX2, EYA4, NAP1L1, TNRC6C, WEE1, REST, DNAJA2, TPT1
<b>2</b>	Virus receptor activity	CR2, PLSCR1, CXCR4, LDLR, EGFR, HSPA1B, HSPA1A
<b>3</b>	Cadherin binding	USP8, STAT1, DOCK9, BZW1, EGFR, RTN4, PLCB3, CDH3, EIF2S3, SERBP1, FAT3, FAT4, YKT6, HSPA1A
<b>4</b>	Histone deacetylase binding	MECP2, MEF2A, HDAC3, SP1, TRAF6, LCOR, HSPA1B, HSPA1A
<b>5</b>	Enzyme binding	HDAC3, TBP, STAT1, PRKCE, AXIN2, PTGS2, SIRT1, EGFR, PLSCR1, RAC1, RAF1, HSPA1B, CFTR, HSPA1A
<b>6</b>	Transcription corepressor binding	SMAD4, HDAC3, STAT1, PHF12, LCOR
<b>7</b>	Ubiquitin protein ligase binding	GSK3B, UBE2W, CDKN1A, FAF1, FZD6, CXCR4, AXIN2, CRK, EGFR, RTN4, HSPA1B, HSPA1A
<b>8</b>	GTPase activity	GBP6, RAB2B, MX2, RAB30, ARL5B, EIF2S3, RAP2B, RASA1, GNB1, RAC1, ARL8A, TRIM23, ARF6

**Anexo VIII. Genes involucrados en las vías KEGG y GO del estadio asintomático 30s.**

<b>n</b>	<b>Termino</b>	<b>Genes</b>
<b>KEGG PATHWAY</b>		
<b>1</b>	Pathways in cancer	NOTCH2, GSK3B, CDKN1B, GSTP1, HHIP, CXCR4, PIK3R1, CBL, HIF1A, EGFR, GNA13, CCND2, CCND1, MYC, PMAIP1, FADD, RAC1, SMAD2, SMAD4, SMAD3, GSTO2, APAF1, CDKN2A, STAT1, PLEKHG5, WNT5A, STAT3, FOS, MLH1, RHOA, NFKB1, EML4, CCNA2, PLCB3, MSH2, PIK3CA, SP1, TRAF6, CDK2, GNB4, GNAS, CCDC6, KRAS, CALM3, MET, NFE2L2
<b>2</b>	Measles	GSK3B, CDKN1B, APAF1, STAT1, MX2, STAT3, PIK3R1, FOS, NFKB1, CCND2, IRAK1, PIK3CA, CCND1, IL1B, TRAF6, CDK2, TAB2, FADD, IKBKE, HSPA1A, TLR2
<b>3</b>	Colorectal cancer	SMAD2, GSK3B, SMAD4, SMAD3, PIK3R1, FOS, MLH1, RHOA, EGFR, PIK3CA, CCND1, MSH2, MYC, PMAIP1, KRAS, RAC1
<b>4</b>	Hepatitis B	SMAD4, SMAD3, APAF1, STAT1, STAT3, PIK3R1, FOS, MAPK14, YWHAZ, NFKB1, CCNA2, IRAK1, PIK3CA, MYC, TRAF6, CDK2, KRAS, TAB2, FADD, IKBKE, TLR2
<b>5</b>	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	STAT1, STAT3, PIK3R1, FOS, MAPK14, HIF1A, EGFR, NFKB1, EML4, PIK3CA, TRAF6, KRAS, TLR2
<b>6</b>	Toll-like receptor signaling pathway	STAT1, PIK3R1, FOS, MAPK14, NFKB1, IRAK1, PIK3CA, IL1B, TRAF6, TAB2, FADD, RAC1, IKBKE, TLR2
<b>7</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	SMAD2, GSK3B, SMAD1, SMAD4, SMAD3, RIF1, WNT5A, STAT3, PIK3R1, MAPK14, SMAD5, MEIS1, PIK3CA, ZIC3, MYC, KRAS
<b>8</b>	Adherens junction	RAP1B, TJP1, SMAD4, SMAD3, PDCD10, CTNND1, PTPRJ, RAC1, MET, SSX2IP, RHOA, EGFR
<b>9</b>	FoxO signaling pathway	SMAD4, GABARAPL1, CDKN1B, SMAD3, PLK1, STAT3, PIK3R1, MAPK14, EGFR, CCND2, PIK3CA, CCND1, CDK2, KRAS
<b>10</b>	Cellular senescence	SMAD2, SMAD3, CDKN2A, PIK3R1, FOXM1, MAPK14, NFKB1, CCNA2, CCND2, PIK3CA, CCND1, MYC, CDK2, KRAS, CALM3
<b>11</b>	Cell cycle	SMAD2, GSK3B, SMAD4, CDKN1B, SMAD3, CDKN2A, PLK1, YWHAZ, CCNA2, STAG2, CCND2, CCND1, TFDP2, MYC, CDK2
<b>12</b>	Ubiquitin mediated proteolysis	DET1, UBE2H, UBE2D2, UBE2D3, UBE2G1, CBL, UBE2J2, HERC4, SOCS1, TRAF6, UBA3, UBA2, TRIM32, CUL4B

13	Wnt signaling pathway	TLE4, GSK3B, SMAD4, SMAD3, CSNK1A1, CHD8, WNT5A, RHOA, VANGL1, PLCB3, SFRP1, CCND2, CCND1, MYC, RAC1
14	ErbB signaling pathway	GSK3B, CDKN1B, PIK3CA, ERBB4, MYC, KRAS, PIK3R1, CBL, PAK2, EGFR
15	Axon guidance	GSK3B, WNT5A, CXCR4, PIK3R1, SSH2, RHOA, ROBO1, PIK3CA, CDK5, CFL2, KRAS, RAC1, PAK2, MET
<b>GO BIOLOGICAL PROCESS</b>		
1	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	ZNF493, CSRNP3, CHD8, RORA, FOXM1, NR3C1, BACH1, CDC73, MECP2, ZIC3, MYC, MYBL1, ACTR2, ANXA2, ZBTB38, TCF12, WNT5A, VEZF1, FOS, TFDP2, TRAF6, IL1B, CDH13, MET, TLR2, NOTCH2, NFIX, PIK3R1, HIF1A, EGFR, BCLAF1, FADD, ZNF148, RREB1, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, ZNF384, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, STAT1, STAT3, PLEKHA5, MAPK14, SUPT5H, SMAD5, NFKB1, SMARCA4, MEIS1, SP1, CREBRF, TCF4, AGRN, NFE2L2
2	Positive regulation of DNA-templated transcription	SMARCD2, NFIX, CHD8, RORA, RSF1, FOXM1, HIF1A, EGFR, ERBB4, ZIC3, MYC, TP53INP1, TRIM24, RREB1, MYBL1, SMAD2, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, STAT1, WNT5A, STAT3, FOS, SMAD5, NFKB1, SMARCA4, CCNA2, DNAJC2, SFRP1, KANSL1, ASPH, SP1, IL1B, CDK2, TCF4, TRIM32, NFE2L2, PICALM
3	Positive regulation of miRNA transcription	NOTCH2, SMAD1, SMAD4, SMAD3, MYC, STAT3, FOS, NR3C1, HIF1A, EGFR, SMARCA4
4	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	NOTCH2, ZNF254, NFIX, RIF1, CHD8, UBE2D2, UBE2D3, FOXM1, NR3C1, PHF6, YBX3, BACH1, CDC73, MECP2, DNAJB1, SDCBP, ZFP36, CCND1, CUX1, MYC, TRPS1, ZNF148, RREB1, ZBTB18, TLE4, DR1, MORC3, SMAD4, SMAD3, STAT1, PLK1, STAT3, SUPT5H, YWHAZ, SMAD5, NFKB1, SMARCA4, IFI27, PKIA, TRAF6, CDK2, CREBRF, PHF14, BCORL1, HSPA1A
5	Negative regulation of apoptotic process	NOTCH2, GSK3B, GSTP1, HHIP, KIF14, PIK3R1, CBL, CDC73, EGFR, IFIT3, AURKA, CCND2, ERBB4, PDCD10, MYC, PAK2, PRKCI, SMAD3, PLK1, WNT5A, YWHAZ, SMAD5, NFKB1, TJP1, SFRP1, PDCD4, TMBIM6, TPT1, HSPA1A
6	Cellular response to hypoxia	TIGAR, CDKN1B, PRKCE, RORA, FOS, CBL, HIF1A, CCNA2, SFRP1, IRAK1, MYC, UBQLN1, PMAIP1, NFE2L2
7	Negative regulation of cell population proliferation	SMAD2, SMAD1, PBRM1, SMAD4, CDKN1B, SMAD3, CELF1, CDKN2A, STAT3, PTPRJ, IFIT3, CDC73, SFRP1, ASPH, ERBB4, IL1B, TP53INP1, PHF14, CDH13, SH3BP4, RAPGEF2, COPS8, HSPA1A, TLR2

<b>8</b>	Apoptotic process	NOTCH2, NCKAP1, CSRN3, UBE2D2, FAF1, UBE2D3, CXCR4, NR3C1, YBX3, AURKA, BCLAF1, PDCD10, TP53INP1, PMAIP1, DMD, FADD, PAK2, APAF1, CDKN2A, PRKCE, MAPK14, NFKB1, MARCKS, IFI27, PSME3, IL1B, PDCD4, TMBIM6, TLR2
<b>9</b>	Regulation of G2/M transition of mitotic cell cycle	CDKN2A, PKIA, CDK2, KIF14, AURKA
<b>10</b>	SMAD protein signal transduction	SMAD2, SMAD1, SMAD4, SMAD3, FOS, SMAD5
<b>11</b>	Cell division	CSNK1A1, PRKCE, PLK1, KIF14, NCAPG, TERF1, NR3C1, CKAP5, CDC73, KLHL42, AURKA, EML4, CCNA2, STAG2, CCND2, CCND1, CDK5, EPB41L2, CDK2, ATXN10, ARL8A
<b>12</b>	Positive regulation of glial cell proliferation	MECP2, PRKCI, IL1B, KRAS, EGFR
<b>13</b>	Neuron projection development	GSK3B, CDK5, RAPGEF2, PHGDH, ATXN10, RAB6A, GPM6B, CUL4B, CAMSAP2
<b>14</b>	Astrocyte differentiation	EIF2B5, STAT3, NR3C1, CUL4B
<b>15</b>	Cell migration	NCKAP1, PRKCI, RHOA, VAV2, FMNL3, FMNL2, CDH2, PIK3CA, ERBB4, ITGBL1, CDH13, ANG, RAC1, MET
<b>GO CELULAR COMPONENT</b>		
<b>1</b>	Cytosol	NCKAP1, TRIO, IFIT5, PPP2R2A, IFIT1, BACH1, IFIT3, MYLK, HERC4, TRIM24, ARFIP1, VPS36, ATG3, GABARAPL1, PRKCI, ACOT7, PRKCE, GAPVD1, EML4, RNF123, CARHSP1, SFRP1, MTAP, PDE12, PRKAR1A, CLNS1A, PSME3, PSME4, HSPA4L, NCAPG, PIK3R1, UBE2J2, HIF1A, PDCD10, EPB41L2, FADD, ARGLU1, ATP6V1C1, TBC1D8B, NAA50, ZNF260, PLK1, CYLD, MOV10, PPFIBP1, HAL, STAG2, SPATS2L, CALM3, RGL1, CDKN1B, CAB39L, FAF1, KIF14, STON2, LIMD2, MECP2, PHGDH, RAC1, IKBKE, CCT2, RAB6C, GSTO2, ANXA2, KIF22, FOS, RHOA, VAV2, GCFC2, PLCB3, ALDH5A1, IL1B, PELI1, RAPGEF2, VAMP3, GSTP1, TRAK1, HSPA13, NT5E, CUX1, STX5, DMD, MBNL3, EXOSC2, PAK2, TIGAR, CDKN2A, STAT1, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, UBE2G1, TJP1, MKLN1, OSTM1, KLHL5, XPOT, SERBP1, CCDC6, CEP41, HSPA1A, GOLT1B, UBE2D2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, LTN1, MSI2, NR3C1, ZFP36, CCND2, CCND1, TRAPPC13, KPNA5, PLS1, USP8,

		TOMM34, KCTD5, KLHL42, ALDH3A2, OBSCN, DMTF1, WDFY1, SLC27A2, RAI14, ANKRD12, GMPS, UBR4, UAP1, CAMSAP2, RAP1B, SDCBP, SOCS1, IRAK1, BTBD1, TBC1D14, PMAIP1, IP6K1, RAB6A, EIF2B5, OSBPL9, SPECC1, SMAD2, SMAD1, UBE2H, SMAD4, PNPT1, SMAD3, LSM4, SMAD5, NFKB1, COPS3, GNL3L, CDK5, CDK2, GNAS, AAK1, UBA3, GNB4, TPP2, TAB2, COPS8, EIF4G2, PICALM, NFE2L2, DDX3Y, GSK3B, SNAP25, DOCK4, DOCK9, CHD9, YBX3, CDC73, OASL, AP1G1, KYNU, CTNNBL1, ACTR2, USP48, HMGCS1, APAF1, PLEKHG5, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, PIK3CA, PCCA, TRAF6, POLR1B, ANG, RBM24, KRT80, NUFIP2, ADD3, CBL, AURKA, GNA13, DNAJB1, ERBB4, TP53INP1, FAM120A, NAA25, UBQLN1, PDLIM5, CYB5A, MX2, MAPK14, MYO19, FMNL3, FMNL2, DNAJA2, PDCD4, KRAS, ATXN10, TRIM32, TPT1, EIF3A, CUL4B
2	Nucleoplasm	RIF1, UBE2D2, CSE1L, UBE2D3, PPP2R2A, RORA, NR3C1, BACH1, CCND2, CCND1, MYC, TRIM24, PAPOLA, KPNA5, SOX6, TLE4, PRKCI, MORC3, ACOT7, ZBTB38, MTAP, DMTF1, MSH2, WDR82, CLNS1A, PSME3, PSME4, BCORL1, RAI14, NOTCH2, TSHZ3, ANKRD12, UBR4, NOLC1, UAP1, HIF1A, SDCBP, SOCS1, IRAK1, BTBD1, EPB41L2, TBC1D14, HIVEP2, RPRD1A, ZNF148, RAB11FIP2, IP6K1, ARGLU1, SPECC1, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, DR1, PHC2, CHTOP, SMAD4, SMAD3, ZNF260, PLK1, SUPT5H, LSM4, SMAD5, NFKB1, MED13L, SMARCA4, COPS3, GNL3L, STAG2, CDK5, SP1, FUBP1, CDK2, CREBRF, TPP2, UBA2, SPATS2L, CALM3, TAB2, INTS6, COPS8, RBAK, RCOR1, NFE2L2, DDX3Y, GSK3B, CDKN1B, ZNF493, MCM8, CHD9, CELF1, CHD8, FAF1, RSF1, FOXM1, PHF6, CDC73, LIMD2, OASL, MECP2, ZIC3, TRPS1, KYNU, IKBKE, MYBL1, CTNNBL1, PBRM1, USP48, TBP, NSUN5, TCF12, VEZF1, FOS, TERF1, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, GCFC2, DNAJC2, TFDP2, RP2, POLR1B, RBM24, ERGIC1, SMARCD2, NFIX, NUFIP2, SRSF1, AURKA, DNAJB1, NT5E, BCLAF1, PGRMC2, CUX1, ERBB4, TP53INP1, MKNK2, UBQLN1, DCAF10, MBNL3, EXOSC2, HNRNPA3, CDKN2A, STAT1, STAT3, PLEKHA5, MAPK14, MLH1, MKLN1, KANSL1, XPOT, NOVA1, ZNF74, RBM42, EIF3A, CUL4B, HSPA1A
3	Cytoplasm	TRIO, LPGAT1, HHIP, IFIT1, BACH1, IFIT3, MYLK, HERC4, MYC, ANPEP, SOX6, ATG3, PRKCI, ACOT7, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, EML4, RNF123, CARHSP1, PRKAR1A, PSME3, FEZ2, HSPA4L, NOLC1, NCAPG, PIK3R1, HIF1A, NEU3, PRRC1, PDCD10, FADD, RREB1, NAA50, PLK1, IFI44, MEX3C, FUBP1, PKIA, CREBRF,

		<p>SPATS2L, CALM3, CPEB4, CDKN1B, PPP1R11, CAB39L, KIF14, ROBO1, RAC1, IKBKE, GSTO2, ANXA2, STRBP, TCF12, KIF22, TERF1, VAV2, PLCB3, PELI1, RAPGEF2, L2HGDH, DBN1, TLR2, GSTP1, CXCR4, TRAK1, HSPA13, EGFR, BCLAF1, PDPR, UBTD2, DMD, MBNL3, EXOSC2, PAK2, TIGAR, CDKN2A, STAT1, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, TJP1, MKLN1, KLHL5, XPOT, SERBP1, CEP41, HSPA1A, RAB3B, SAMD9L, RIF1, CSE1L, CTNND1, MSI2, NR3C1, BZW1, IFI44L, ZFP36, PTAR1, CCND2, CCND1, CDH2, CFL2, PAPOLA, TRAPPC13, KPNA5, ANKRD13A, PLS1, TPD52, USP8, SLC30A1, KCTD5, ALDH3A2, ARL8A, UBR4, SDCBP, VCIPI1, SOCS1, IRAK1, IP6K1, EIF2B5, SMAD2, SMAD1, SMAD4, PNPT1, SMAD3, BDNF, SSH2, SMAD5, NFKB1, COPS3, CDK5, SP1, CDK2, GNAS, UBA3, PHF14, GNB4, TPP2, SRPRB, UBA2, TAB2, COPS8, NFE2L2, GSK3B, SNAP25, DOCK4, CELF1, YBX3, OASL, AP1G1, ZIC3, KYNU, ARL5A, ACTR2, TBP, HMGCS1, APAF1, PLEKHG5, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, DNAJC2, PIK3CA, RP2, TRAF6, CDH13, TMBIM6, SSX2IP, KRT80, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, AURKA, GNA13, DNAJB1, MKNK2, NAA25, UBQLN1, SH3BP4, PDLIM5, MX2, MAPK14, MYO19, FMNL3, MYO1E, MARCKS, NOVA1, DNAJA2, PDCD4, RBM42, KRAS, ATXN10, TRIM32, TPT1, EIF3A</p>
4	Nucleus	<p>BACH1, MYC, TRIM24, SOX6, VPS36, PRKCI, MECR, ZNF160, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, MTAP, CLNS1A, PSME3, PSME4, BCORL1, CCDC82, KCTD15, TSHZ3, HSPA4L, NCAPG, PIK3R1, UBE2J2, RPAP1, HIF1A, HIVEP2, ZNF148, RREB1, NAA50, ZNF384, PHC2, ZNF260, PLK1, MEX3C, MED13L, SMARCA4, MOV10, STAG2, FUBP1, PKIA, CREBRF, CALM3, INTS6, RBAK, RCOR1, CPEB4, ZNF254, DET1, CDKN1B, CSRNP3, ZNF493, PPP1R11, FAF1, KIF14, RSF1, PHF6, MECP2, RAC1, IKBKE, RAB6C, PBRM1, ANXA2, STRBP, TCF12, KIF22, FOS, TERF1, RHOA, GCFC2, PLCB3, PELI1, VGLL4, NFIX, GSTP1, AMIGO2, TRAK1, HSPA13, EGFR, BCLAF1, CUX1, DMD, MBNL3, EXOSC2, PAK2, TIGAR, CDKN2A, STAT1, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, MLH1, TJP1, CMSS1, SERBP1, ZNF74, HSPA1A, RIF1, UBE2D2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, RORA, NR3C1, ZFP36, CCND2, CCND1, PAPOLA, KPNA5, TLE4, USP8, ZNF561, MORC3, ZBTB38, TOMM34, KCTD5, DMTF1, MSH2, WDFY1, RAD54L2, NOTCH2, SDCBP, VCIPI1, IRAK1, PMAIP1, ZKSCAN5, RPRD1A, IP6K1, EIF2B5, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, UBE2H, CHTOP, SMAD4, SMAD3, SUPT5H, LSM4, SMAD5, NFKB1, COPS3, CDK5, SP1, CDK2, GNAS, UBA3, PHF14, TCF4, COPS8,</p>



		ZNF652, PICALM, NFE2L2, ZNF772, DDX3Y, GSK3B, MCM8, CELF1, CHD8, FOXM1, YBX3, CDC73, ZIC3, TRPS1, MYBL1, CTNBL1, ACTR2, USP48, TBP, APAF1, VEZF1, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, TFDP2, TRAF6, ANG, TMBIM6, SSX2IP, RBM24, SMARCD2, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, AURKA, GNA13, DNAJB1, ERBB4, TP53INP1, FAM120A, MKNK2, SH3BP4, HNRNPA3, MX2, MAPK14, MEIS1, KANSL1, NOVA1, PDCD4, RBM42, TRIM32, TPT1, CUL4B
5	Glutamatergic synapse	USP8, GSK3B, SNAP25, PRKCI, TRIO, PLXND1, WNT5A, CTNND1, PLEKHA5, PPP2R2A, MAPK14, YWHAZ, RHOA, AURKA, MECP2, RAP1B, DNAJB1, PRKAR1A, ERBB4, RAC1, PAK2, DBN1
6	Apical part of cell	SPECC1, TJP1, VCAM1, CDH2, SLC11A2, IFIT5, SLC7A11, ATP6V1C1
7	Actin cytoskeleton	ACTR2, SNAP25, IFIT5, MYO19, LIMD2, MYLK, MYO1E, MARCKS, CFL2, ZNF74, ANG, INTS6, PDLIM5, DBN1
8	Postsynapse	MECP2, MKLN1, GSK3B, SNAP25, TRIO, WNT5A, RAC1, MET, RHOA
<b>GO MOLECULAR FEATURE</b>		
1	Protein binding	NCKAP1, TRIO, HHIP, IFIT5, TXNDC12, PPP2R2A, IFIT1, BACH1, ANTXR1, IFIT3, MYLK, MYC, TRIM24, ARFIP1, SOX6, VPS36, PDK1, ATG3, GABARAPL1, PRKCI, ACOT7, ARL15, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, GAPVD1, EML4, DHX40, CARHSP1, TWSG1, SFRP1, MTAP, IFI27, MTHFD2, PRKAR1A, WDR82, CLNS1A, PSME3, PSME4, FEZ2, KCTD15, TSHZ3, NOLC1, NCAPG, PIK3R1, UBE2J2, RPAP1, HIF1A, NEU3, SGPL1, PRRC1, PDCD10, EPB41L2, HIVEP2, FADD, ZNF148, RAB11FIP2, ARGLU1, ATP6V1C1, RAB11FIP4, TBC1D8B, NAA50, PHC2, ZNF260, PLK1, IFI44, MEX3C, SMARCA4, VANGL1, CYLD, MOV10, PPFIBP1, STAG2, FUBP1, PKIA, CREBRF, CALU, CALM3, INTS6, RGL1, RBAK, RCOR1, CPEB4, DET1, TRAM1, CDKN1B, PPP1R11, CAB39L, FKBP14, FAF1, KIF14, RSF1, PTPRJ, SLC7A11, STON2, PHF6, LIMD2, ROBO1, MECP2, GLIPR1, RAC1, IKBKE, CCT2, RAB6C, PBRM1, GSTO2, ANXA2, STRBP, TCF12, LRRC40, SLC39A10, KIF22, FOS, TERF1, IL17RB, RHOA, F5, VAV2, GCFC2, PLCB3, TMEM33, IL1B, PELI1, RAPGEF2, DBN1, ERGIC1, VGLL4, VAMP3, ATPAF1, PCYOX1, TLR2, NFIX, GSTP1, ATL2, AMIGO2, CXCR4, TRAK1, HSPA13, EGFR, BCLAF1, NT5E, PGRMC2, UBTD2, STX5, DMD, MBNL3, EXOSC2, PAK2, CBR4, TIGAR, CDKN2A, STAT1, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, UBE2G1, MLH1, TJP1, MKLN1, CMSS1, OSTM1, GPAM, KLHL5, XPOT, SERBP1, CCDC6,

		CEP41, AGRN, HSPA1A, RAB3B, SAMD9L, OXNAD1, PLXND1, GOLT1B, RIF1, TMEM167A, UBE2D2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, LTN1, RORA, MSI2, NR3C1, ZFP36, CCND2, CCND1, CDH2, CFL2, PAPOLA, TRAPPC13, KPNA5, TLE4, TPD52, USP8, RAB2B, MORC3, ZBTB38, ATG9A, WNT5A, TOMM34, SLC30A1, KCTD5, KLHL42, ALDH3A2, RAB30, OBSCN, MSH2, WDFY1, RAD54L2, ARL8A, RAI14, NOTCH2, UQCRB, SEL1L, UBR4, LPL, CAMSAP2, RAP1B, TMEM123, SDCBP, SOCS1, IRAK1, BTBD1, TBC1D14, PMAIP1, ZKSCAN5, RPRD1A, IP6K1, RAB6A, EIF2B5, OSBPL9, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, UBE2H, DR1, CHTOP, SMAD4, PNPT1, SMAD3, BDNF, CYBRD1, SUPT5H, LSM4, SMAD5, LRP1B, NFKB1, COPS3, GNL3L, CDK5, SP1, CDK2, GNAS, AAK1, UBA3, PHF14, GNB4, TPP2, UBA2, TAB2, TCF4, COPS8, ZNF652, EIF4G2, PICALM, NFE2L2, ZNF772, GSK3B, SNAP25, DOCK4, MCM8, DOCK9, CELF1, CHD8, FOXM1, YBX3, CDC73, OASL, AP1G1, ZIC3, TRPS1, PHACTR2, QRFPR, CTNND1, ABCC4, ACTR2, USP48, TBP, APAF1, VEZF1, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, RCN2, PIK3CA, TFDP2, ASPH, PCCA, RP2, TRAF6, POLR1B, CDH13, ANG, DSG2, TMBIM6, MET, SSX2IP, RBM24, LUC7L2, KRT80, SMARCD2, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, MOSPD2, MFF, CBL, AURKA, GNA13, DNAJB1, GANAB, ERBB4, TP53INP1, MKNK2, NAA25, UBQLN1, SH3BP4, DCAF10, PDLIM5, CYB5A, HNRNPA3, NDUFA4, MX2, MAPK14, MYO1E, MEIS1, TSPAN14, KANSL1, NOVA1, DNAJA2, PDCD4, RBM42, KRAS, ATXN10, TRIM32, TPT1, EIF3A, BET1, CUL4B, LNX2
2	Cadherin binding	DOCK9, CTNND1, PTPRJ, CBL, BZW1, EGFR, DNAJB1, CDH2, STX5, PAK2, ARGLU1, USP8, STAT1, GAPVD1, CKAP5, YWHAZ, TJP1, PLCB3, PPFIBP1, OBSCN, FMNL2, SERBP1, CDH13, DBN1, EIF4G2, HSPA1A, PICALM
3	Ubiquitin protein ligase binding	DET1, GSK3B, CDKN1B, UBE2D2, FAF1, UBE2D3, CXCR4, UBE2J2, HIF1A, EGFR, AURKA, IKBKE, SMAD2, CCT2, SMAD1, GABARAPL1, SMAD3, UBE2G1, YWHAZ, SMAD5, PRKAR1A, TMBIM6, CUL4B, HSPA1A, NFE2L2
4	Protein kinase binding	GSK3B, CDKN1B, FAF1, KIF14, PTPRJ, FOXM1, NR3C1, HIF1A, EGFR, AURKA, ZFP36, SOCS1, CCND2, IRAK1, CCND1, CDH2, PDCD10, TBC1D14, RAC1, RAB11FIP2, PAK2, SMAD1, SMAD3, CDKN2A, PLK1, STAT3, YWHAZ, RHOA, CCNA2, CYLD, CALM3

<b>5</b>	Enzyme binding	NOTCH2, ATG3, CYB5A, TBP, MCM8, STAT1, PRKCE, MLH1, SUPT5H, MAPK14, PHF6, HIF1A, EGFR, ZFP36, TSPAN14, PCCA, CCND1, TMBIM6, RAC1, SLC27A2, CTNNBL1, LUC7L2, RCOR1, HSPA1A
<b>6</b>	Protein domain specific binding	SNAP25, PLXND1, FAF1, WNT5A, YWHAZ, HIF1A, TJP1, MECP2, CCNA2, TFDP2, PRKAR1A, IL1B, TRPS1, CDK2, ARFIP1, RAB6A, NFE2L2
<b>7</b>	Actin filament binding	ACTR2, ADD3, ANTXR1, MYO19, EGFR, LIMD2, FMNL3, MYO1E, MARCKS, FMNL2, CFL2, DMD, DBN1, PLS1
<b>8</b>	Myosin binding	SNAP25, DMD, TRAK1, TRIM32, RHOA

**Anexo IX. Genes involucrados en las vías KEGG y GO del estadio presintomático 40s.**

<b>n</b>	<b>Termino</b>	<b>Genes</b>
<b>KEGG PATHWAY</b>		
<b>1</b>	Pathways in cancer	ALK, GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, HHIP, IGF1R, CASP7, CCND2, CCND1, MYC, ITGAV, RAC1, APAF1, PLEKHG5, WNT5A, FOS, AXIN2, RHOA, EML4, CCNA2, PIK3CA, MSH2, TRAF3, TRAF6, RAF1, IL6ST, SOS1, MET, CRK, PTGER4, NOTCH2, CXCR4, PIK3R1, CBL, PTGS2, HIF1A, EGFR, GNA13, MAPK9, MAPK1, PMAIP1, FADD, SMAD2, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, STAT1, FZD6, STAT3, MLH1, NFKB1, SP1, GNB1, CDK2, GNB4, GNAS, CCDC6, MDM2, KRAS, NFE2L2
<b>2</b>	Measles	GSK3B, CDKN1B, PIK3R1, MAPK9, CCND2, IRAK1, CCND1, FADD, IKBKE, APAF1, STAT1, MX2, HSPA6, STAT3, FOS, NFKB1, PIK3CA, OAS2, TRAF3, TRAF6, IL1B, CDK2, TAB2, TLR4, HSPA1B, HSPA1A, TLR2
<b>3</b>	Hepatitis C	YWHAЕ, GSK3B, CDKN1A, PPP2R2A, PIK3R1, IFIT1, EGFR, CCND1, MYC, MAPK1, FADD, IKBKE, LDLR, APAF1, STAT1, MX2, STAT3, YWHAZ, NFKB1, PIK3CA, OAS2, TRAF3, TRAF6, PSME3, CDK2, KRAS, RAF1, SOS1
<b>4</b>	FoxO signaling pathway	CDKN1A, CDKN1B, FBXO25, PIK3R1, EGFR, IGF1R, MAPK9, CCNB1, CCND2, CCND1, MAPK1, GABARAPL1, SMAD4, SMAD3, PDPK1, PLK1, STAT3, MAPK14, SIRT1, PIK3CA, CDK2, MDM2, KRAS, RAF1, SOS1
<b>5</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	GSK3B, RIF1, PIK3R1, IGF1R, ZIC3, MYC, MAPK1, SMAD2, SMAD1, SMAD4, SMAD3, FZD6, WNT5A, STAT3, LIFR, AXIN2, MAPK14, KLF4, SMAD5, REST, MEIS1, PIK3CA, KRAS, RAF1, IL6ST, BMPR1A
<b>6</b>	Cellular senescence	LIN54, CDKN1A, PIK3R1, FOXM1, PPP1CB, PPP3CB, CCNB1, CCND2, CCND1, MYC, MAPK1, NBN, SMAD2, SMAD3, CDKN2A, TSC1, MAPK14, SIRT1, NFKB1, CCNA2, PIK3CA, CDK2, MDM2, VDAC2, KRAS, RAF1
<b>7</b>	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	ALK, MAP3K3, STAT1, STAT3, PIK3R1, FOS, MAPK14, HIF1A, EGFR, NFKB1, EML4, PPP3CB, PIK3CA, TRAF6, MAPK1, KRAS, RAF1, TLR4, TLR2
<b>8</b>	ErbB signaling pathway	GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, PIK3R1, CBL, EGFR, MAPK9, PIK3CA, ERBB4, MYC, MAPK1, KRAS, RAF1, SOS1, PAK2, CRK, HBEGF
<b>9</b>	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	SMAD2, SMAD4, CDKN1B, VCAM1, SMAD3, STAT1, PRKCE, STAT3, PIK3R1, MAPK14, NFKB1, MAPK9, PIK3CA, CCND1, IL1B, MAPK1, KRAS, RAC1
<b>10</b>	Toll-like receptor signaling pathway	STAT1, PIK3R1, FOS, MAPK14, NFKB1, MAPK9, IRAK1, PIK3CA, TRAF3, IL1B, TRAF6, MAPK1, TAB2, FADD, RAC1, IKBKE, TLR4, TLR2
<b>11</b>	Axon guidance	GSK3B, EPHA4, PDPK1, WNT5A, CXCR4, PIK3R1, SSH2, RHOA, ROBO1, ABLIM1, PPP3CB, PIK3CA, CDK5, RASA1, CFL2, MAPK1, KRAS, RAC1, RAF1, PAK2, MET, NEO1, PLXNA4
<b>12</b>	MicroRNAs in cancer	NOTCH2, CDKN1A, CDKN1B, PIK3R1, PTGS2, EGFR, SOCS1, CCND2, CCND1, MYC, STMN1, MAPK1, TP63, CDKN2A, PRKCE, RDX, STAT3, HMGA2, SIRT1, RHOA, NFKB1, ZEB2, MARCKS, MMP16, PIK3CA, MDM2, PDCD4, KRAS, RAF1, SOS1, MET, CRK
<b>13</b>	Focal adhesion	GSK3B, PDPK1, PIK3R1, PARVB, RHOA, EGFR, VAV2, IGF1R, MYLK, RAP1B, PPP1CB, MAPK9, CCND2, PIK3CA, CCND1, MAPK1, ITGAV, RAC1, RAF1, SOS1, PAK2, MET, CRK

14	Alzheimer disease	GSK3B, UQCRB, NDUFB10, LPL, PIK3R1, PTGS2, RTN4, MAPK9, CASP7, PPP3CB, KIF5B, MAPK1, FADD, COX8C, APAF1, NDUFA4, CSNK1A1, FZD6, SLC11A2, WNT5A, SLC39A10, AXIN2, SLC39A14, NFKB1, PIK3CA, CDK5, IL1B, VDAC2, KRAS, RAF1
15	Tight junction	ACTR2, PRKCI, PRKCE, RDX, PPP2R2A, YBX3, RHOA, TJAP1, TJP1, MAPK9, CTTN, CCND1, RAPGEF2, NF2, RAC1, CFTR
<b>GO BIOLOGICAL PROCESS</b>		
1	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	ZNF493, CRTC1, CHD8, RORA, FOXM1, NR3C1, HOXA13, BACH1, CDC73, PAGR1, MECP2, PPP3CB, ZIC3, MYC, MYBL1, TP63, MEF2A, ACTR2, MYOCD, ANXA2, ZBTB38, TCF12, WNT5A, SOX11, VEZF1, FOS, SIRT1, PLSCR1, ZEB2, TFDP2, TBL1XR1, TRAF6, IL1B, TET3, CDH13, RAF1, MET, TLR4, TLR2, NOTCH2, GTF2A1, HDAC3, NFIX, TMF1, KMT2A, PIK3R1, ZNF24, RNF4, HIF1A, EGFR, BCLAF1, PLAGL2, FADD, ZNF148, ZNF224, RREB1, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, ZNF384, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, BCL11A, STAT1, STAT3, PLEKHA5, HMGA2, MAPK14, SUPT5H, KLF4, SMAD5, NFKB1, SMARCA4, MLLT10, REST, MEIS1, SP1, CCPG1, CREBRF, REL, TCF4, AGRN, OGT, BMPR1A, NFE2L2
2	Positive regulation of DNA-templated transcription	CHD8, RSF1, RORA, FOXM1, PPP3CB, ZIC3, MYC, TRIM24, MYBL1, TP63, MEF2A, MYOCD, WNT5A, FOS, CCNA2, DNAJC2, SFRP1, ASPH, TBL1XR1, IL1B, SMARCD2, NFIX, KMT2A, MAZ, RNF4, HIF1A, EGFR, SERTAD3, ERBB4, TP53INP1, RREB1, ATF7IP, SMAD2, SMAD4, TAF15, SMAD3, CDKN2A, PTGES2, STAT1, STAT3, HMGA2, GTF2H1, KLF4, SMAD5, NFKB1, GATAD2B, SMARCA4, PER2, REST, PHF5A, KANSL1, SP1, CDK2, TCF4, OGT, TRIM32, NFE2L2, PICALM
3	Negative regulation of gene expression	DDX3Y, NOTCH2, GSK3B, CDKN1A, TMF1, CELF1, HIF1A, AURKA, ROBO1, MECP2, PDCD10, TP53INP1, ZNF148, LDLR, SMAD2, SMAD3, FBXW7, SFMBT2, SLC35C2, STAT3, ATP2B4, SOX11, KLF4, SIRT1, SMAD5, NFKB1, SFRP1, REST, PIK3CA, PRKAR1A, REL, RCOR1, BMPR1A, PICALM
4	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	ZNF254, KDM5C, RIF1, UBE2D2, CHD8, UBE2D3, FOXM1, NR3C1, BACH1, PHF6, YBX3, CDC73, MECP2, ZFP36, CCND1, MYC, TRPS1, TP63, TLE4, MEF2A, MYOCD, MORC3, SOX11, YWHAZ, SIRT1, ZEB2, IFI27, TBL1XR1, TRAF6, LCOR, BCORL1, NOTCH2, HDAC3, NFIX, MAZ, DNAJB1, SDCBP, CUX1, ZNF148, ZNF224, RREB1, ATF7IP, ZBTB18, DR1, SMAD4, SMAD3, BCL11A, STAT1, PHF12, PLK1, STAT3, ZBTB10, HMGA2, SUPT5H, KLF4, SMAD5, NFKB1, GATAD2B, SMARCA4, PER2, REST, PKIA, CDK2, CREBRF, PHF14, MDM2, OGT, CC2D1B, HSPA1A
5	Positive regulation of miRNA transcription	NOTCH2, SMAD1, MYOCD, SMAD4, SMAD3, STAT3, FOS, KLF4, NR3C1, HIF1A, EGFR, SMARCA4, MYC, BMPR1A
6	Positive regulation of gene expression	GSK3B, SLC24A4, CELF1, MAZ, HIF1A, ROBO1, MAPK9, CDH3, PDCD10, MYC, TP53INP1, TRIM24, SLC38A2, IKBKE, LDLR, MEF2A, SMAD2, SMAD1, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, BCL11A, RDX, TCF12, WNT5A, STAT3, HMGA2, SOX11, MAPK14, KLF4, REST, PLSCR1, SP1, IL1B, FUBP1, MDM2, KRAS, TLR4, HSPA1B, BMPR1A, HSPA1A, NFE2L2, TLR2
7	Hippocampus development	YWHAZ, ALK, EIF2B5, GSK3B, KIF14, ATP2B4, TSC1, IGF1R, MECP2, CDK5, ZIC3, NEFL, NF2, CRK
8	Apoptotic process	NOTCH2, NCKAP1, KMT2A, UBE2D2, FAF1, UBE2D3, CXCR4, NR3C1, YBX3, RTN4, AURKA, FXR1, CASP7, BCLAF1, RNF216, DPP8, ZMAT3, PDCD10, TP53INP1, BNIP2, MAPK1, PMAIP1, DMD, FADD,

		PAK2, TP63, MEF2A, APAF1, CDKN2A, PRKCE, MAPK14, NFKB1, PLSCR1, MARCKS, IFI27, TRAF3, PSME3, DLC1, IL1B, MDM2, PDCD4, TMBIM6, RAF1, OGT, PPIA, TLR2
9	Regulation of protein stability	ATF7IP, USP8, HDAC3, CDKN2A, SIAH3, USP28, YWHAZ, AURKA, GNL3L, RNF128, ASPH, LAMP2, TRIM24, MAPK1, NF2
10	Cellular response to hypoxia	TIGAR, CDKN1B, PRKCE, RORA, FOS, CBL, PTGS2, HIF1A, SIRT1, RTN4, CCNA2, SFRP1, IRAK1, MYC, MDM2, UBQLN1, PMAIP1, CPEB2, NFE2L2
11	Negative regulation of cell population proliferation	CDKN1A, CDKN1B, CELF1, PTPRJ, PTGS2, CDC73, IFIT3, ERBB4, TP53INP1, SH3BP4, ARID2, SMAD2, SMAD1, MYOCD, PBRM1, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, STAT3, TSC1, KLF4, SFRP1, REST, ASPH, DLC1, IL1B, PHF14, RAPGEF2, CDH13, NF2, RAF1, COPS8, HSPA1B, HSPA1A, TLR2
12	Olfactory bulb development	EXT1, MECP2, ZIC3, KIF14, FUT1
13	Negative regulation of stress fiber assembly	TJP1, DLC1, STMN1, PIK3R1, PAK2, MET
14	Stress-induced premature senescence	CDKN1A, MAPK14, SIRT1
15	Cellular response to stress	MAPK9, REL, MAPK1, MAPK14, NFKB1
<b>GO CELULAR COMPONENT</b>		
1	Cytosol	DMGDH, NCKAP1, TRIO, CCNF, IFIT5, PPP2R2A, IFIT1, BACH1, IFIT3, MYLK, RPL7, GOLGA3, HERC4, RASSF2, STMN1, TRIM24, ARFIP1, TNS3, VPS36, MEF2A, ATG3, GABARAPL1, PRKCI, ACOT7, SFMBT2, PRKCE, GAPVD1, EML4, RNF123, CARHSP1, SFRP1, MTAP, XRN1, RNF128, PDE12, PRKAR1A, MAP1B, KRTAP4-11, PSME3, PSME4, VDACC2, CFTR, PI4K2A, HSPA4L, NCAPG, C9ORF78, PIK3R1, UBE2J2, HIF1A, FXR1, SPAST, RNF216, PDCD10, EPB41L2, FADD, ARGLU1, ATP6V1C1, TBC1D8B, NAA50, BCL11A, ZNF260, RCC2, SURF4, PLK1, MYO5A, PARVB, MOV10, MLLT10, UCK2, PPFIBP1, HAL, STAG2, WNK3, REL, SPATS2L, RGL1, CC2D1B, CDKN1A, SMG1, MTMR10, CDKN1B, CAB39L, FAF1, KIF14, STON2, SH3RF1, LIMD2, MECP2, PPP3CB, IMPA1, NCS1, NEFL, MUC13, PHGDH, RAC1, IKBKE, CCT2, RAB6C, ANXA2, KIF22, FOS, SIRT1, DUSP6, RHOA, VAV2, GCFC2, ZEB2, PLSCR1, ALDH5A1, RAP2B, CTTN, CNBP1R1, IL1B, PELI1, RAPGEF2, STK40, VAMP3, ARF6, TMF1, STAU1, ADH1A, TRAK1, HSPA13, NT5E, CUX1, STX5, DMD, SHOC2, MBNL3, ANKRD50, EXOSC2, YKT6, PAK2, MAP3K3, TIGAR, GK, PLEKHA1, CDKN2A, STAT1, PTGES2, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, UBE2G1, PEX13, PER2, TJP1, MKLN1, OSTM1, KLHL5, ABI2, DLC1, SERBP1, CCDC6, CEP41, HSPA1B, HSPA1A, GOLT1B, ICE2, CRTCL1, UBE2D2, GEMIN2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, LTN1, MSI2, NR3C1, DOCK10, PPP1CB, ZFP36, CCND2, CCND1, KIF5B, NBN, TRAPPC13, KPNA5, KRT6C, PLS1, KPNA1, USP8, MYLIP, FBXW7, TOMM34, TSC1, OCRL, KCTD5, KLHL42, ALDH3A2, TMEM134, OBSCN, DMTF1, WDFY1, RAF1, SLC27A2, PPIA, RAI14, DDX6, KMT2A, CABP4, ANKRD12, GMPS, UBR4, KLHL11, UAP1, KLHL12, CAMSAP2, RAP1B, ATXN3, SDCBP, ORC4, CCNB1, SOCS1, IRAK1, BTBD1, DPP8, TBC1D14, PMAIP1, SMN1, RAB6A, ECT2, EVI5, EIF2B5, OSBPL9, ANKRD28, SPECC1, SMAD2, MOAP1, OSBPL8, SMAD1, UBE2H, ACBD5, SMAD4, PNPT1, SMAD3, HSPA6, LSM4, SMAD5, NFKB1, CNOT4, ARHGAP32, COPS3, GNL3L, EIF2S3, CDK5, DLG4, GNB1, CDK2, MDM2, GNAS, AAK1, UBA3, GNB4, TPP2, TAB2, NF2, COPS8, BRWD1, OGT, EIF4G2, PICALM,

		NFE2L2, YWHAE, DDX3Y, GSK3B, SNAP25, DOCK4, KDM5C, CHD9, AMD1, YBX3, CDC73, OASL, CA1, CASP7, SPRED1, AP1G1, KYNU, ITGAV, CTNNBL1, ACTR2, USP48, HMGCS1, DST, APAF1, PDPK1, PLEKHG5, PLA2G4C, AXIN2, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, PIK3CA, PCCA, TRAF3, OAS2, TRAF6, POLR1B, RASA1, SOS1, CRK, GTF2A1, KRT80, HDAC3, NUFIP2, TULP4, ADD3, CBL, AURKA, GNA13, FBXL20, DNAJB1, MAPK9, ERBB4, TP53INP1, FAM120A, NAA25, UBQLN1, BNIP2, MAPK1, PDLIM5, ABCF1, ATF7IP, CYB5A, CMTM3, MX2, KLF4, USP28, MAPK14, MYO19, TNRC6C, FMNL3, REST, FMNL2, USH1G, PDCD4, KRAS, ATXN10, PIK3AP1, TRIM32, EIF3A, TNRC6B, OTUD3, CUL4B
2	Nucleoplasm	PPP2R2A, BACH1, GOLGA3, RASSF2, MYC, TRIM24, SOX6, TP63, MEF2A, PRKCI, ACOT7, RBFOX2, SCAF11, SLC35C2, SFMBT2, SOX11, MTAP, WDR82, PSME3, PSME4, BCORL1, ASF1A, PAXIP1, TSHZ3, NOLC1, C9ORF78, ZNF24, HIF1A, SPAST, RNF216, EPB41L2, HIVEP2, ZNF148, RAB11FIP2, ARGLU1, PHC2, BCL11A, ZNF260, SIAH3, PLK1, MED13L, SMARCA4, SMU1, MLLT10, STAG2, FUBP1, CREBRF, REL, SPATS2L, INTS6, RBAK, INTS8, RCOR1, CC2D1B, LIN54, SETD5, CDKN1A, SMG1, CDKN1B, ZNF493, FAF1, RSF1, PHF6, LIMD2, MECP2, PPP3CB, REV3L, IKBKE, PBRM1, NSUN5, TCF12, FOS, TERF1, SIRT1, DUSP6, PHF20L1, GCFC2, ZEB2, PLSCR1, ERGIC1, STK40, NFIX, ADH1A, BCLAF1, NT5E, PGRMC2, CUX1, UBN2, SHOC2, MBNL3, ZNF224, EXOSC2, PLEKHA1, CDKN2A, STAT1, STAT3, PLEKHA5, GTF2H1, MLH1, GATAD2B, MPP7, PER2, MKLN1, PHF5A, ABI2, HSPA1B, HSPA1A, RIF1, ICE2, CRTC1, UBE2D2, GEMIN2, CSE1L, UBE2D3, RORA, NR3C1, HOXA13, DOCK10, PPP1CB, CCND2, CCND1, PAPOLA, NBN, KPNA5, ARID2, KPNA1, TLE4, GEN1, MORC3, FBXW7, ZBTB38, SLC30A5, DMTF1, MSH2, TBL1XR1, RAI14, NOTCH2, KMT2A, MAZ, ANKRD12, UBR4, UAP1, ATXN3, SDCBP, ORC4, CCNB1, SOCS1, IRAK1, BTBD1, ZMAT3, TBC1D14, RPRD1A, SMN1, ECT2, KLHDC10, ANKRD28, ZBTB18, SPECC1, SMAD2, SMAD1, DR1, ACBD5, CHTOP, SMAD4, SMAD3, PHF12, ZBTB10, HMGA2, SUPT5H, LSM4, SMAD5, NFKB1, ARHGAP32, COPS3, UBE2W, IBTK, GNL3L, CDK5, SPI, CDK2, MDM2, TPP2, UBA2, TAB2, COPS8, BRWD1, OGT, NFE2L2, DDX3Y, GSK3B, KDM5C, MCM8, CHD9, CELF1, CHD8, CTDSPL2, FOXM1, CDC73, OASL, PAGR1, CASP7, SPRED1, ZIC3, TRPS1, KYNU, NEO1, MYBL1, CTNNBL1, USP48, TBP, DST, PLA2G4C, ZFP91, VEZF1, NAV2, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, TFDP2, OAS2, RP2, POLR1B, LCOR, GTF2A1, SMARCD2, HDAC3, NUFIP2, SRSF1, RNF38, CSTF2T, RNF4, AURKA, DNAJB1, MAPK9, ERBB4, TP53INP1, UBQLN1, MAPK1, DCAF10, ABCF1, ATF7IP, HNRNPA3, TAF15, RPRD2, KLF4, USP28, MAPK14, TNRC6C, WEE1, REST, KANSL1, NOVA1, RBM42, EIF3A, TNRC6B, CUL4B
3	Cytoplasm	DMGDH, TRIO, LPGAT1, HHIP, CCNF, IFIT1, BACH1, IFIT3, MYLK, RPL7, HERC4, RASSF2, MYC, ANPEP, STMN1, SOX6, TP63, TRIM23, ATG3, EPHA4, PRKCI, ACOT7, RBFOX2, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, ACSL4, EML4, FLG2, RNF123, CARHSP1, RNF128, PRKAR1A, PSME3, FEZ2, CFTR, HSPA4L, NOLC1, NCAPG, PIK3R1, HIF1A, FXR1, SPAST, PRRC1, PDCD10, FADD, RREB1, NAA50, TMEM50A, BCL11A, SIAH3, PLK1, RDX, MYO5A, IFI44, PARVB, MEX3C, SMU1, UCK2, FUBP1, PKIA, WNK3, CREBRF, REL, CCSER2, SPATS2L, TECPR2, CPEB2, CPEB4, SMG1, MTMR10, CDKN1B, PPP1R11, CAB39L, KIF14, SH3RF1, ROBO1, ADAMTSL1, PPP3CB, IMPA1, PRX, NCS1, NEFL, RAC1, IKBKE, ANXA2, STRBP, TCF12, KIF22, CCDC117, TERF1, SIRT1, DUSP6, VAV2, PLSCR1, CTTN, CNEPIR1,

		TET3, PELI1, RAPGEF2, L2HGDH, TLR4, DBN1, ARF6, TLR2, STAU1, CXCR4, PTGS2, TRAK1, HSPA13, EGFR, PBLD, BCLAF1, SRPX2, PDPR, UBTD2, DMD, SHOC2, MBNL3, EXOSC2, YKT6, PAK2, MAP3K3, TIGAR, ANKIB1, PLEKHA1, CDKN2A, STAT1, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, PER2, TJP1, MKLN1, KLHL5, ABI2, DLC1, SERBP1, CEP41, HSPA1B, HSPA1A, RAB3B, SAMD9L, RIF1, CRTCL1, CSE1L, CTNND1, FBXO25, MSI2, NR3C1, IFI44L, DOCK10, PPP1CB, ZFP36, PTAR1, CCND2, CDH3, CCND1, SESN3, CDH2, CFL2, KIF5B, PAPOLA, TRAPPC13, KPNA5, ANKRD13A, PLS1, KPNA1, TPD52, USP8, FBXW7, TSC1, SLC30A1, OCRL, KCTD5, ALDH3A2, ACAP2, RAF1, PPIA, ARL8A, XPR1, DDX6, CABP4, GSTCD, UBR4, ATXN3, SDCBP, VCIPI1, ODF2L, CCNB1, SOCS1, IRAK1, DPP8, CASKIN1, SMN1, ECT2, SLC38A2, KLHDC10, EIF2B5, SMAD2, MOAPI, UVRAG, SMAD1, ACBD5, SMAD4, PNPT1, SMAD3, BDNF, HSPA6, BTBD9, SSH2, SMAD5, NFKB1, COPS3, UBE2W, IBTK, EIF2S3, CDK5, SPI, DLG4, GNB1, CDK2, MDM2, GNAS, UBA3, PHF14, GNB4, TPP2, SRPRB, UBA2, TAB2, NF2, COPS8, NFE2L2, YWHAE, GSK3B, SNAP25, DOCK4, KDM5C, CELF1, YBX3, SYNE3, OASL, CA1, CASP7, ARL5B, AP1G1, ZIC3, KYNU, METTL16, ARL5A, ACTR2, TBP, HMGCS1, DST, APAF1, PDPK1, PLEKHG5, HUNK, AXIN2, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, DNAJC2, PIK3CA, TRAF3, OAS2, RP2, TRAF6, RASA1, CDH13, TMBIM6, SFT2D2, SOS1, CRK, SSSX2IP, KRT80, SLC24A4, HDAC3, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, TULP4, RNF4, AURKA, GNA13, FBXL20, DNAJB1, MAPK9, ABLIM1, NAA25, UBQLN1, DNAJB9, SH3BP4, BNIP2, MAPK1, PDLIM5, ABCF1, TAF15, MX2, EYA4, NAP1L1, MAPK14, MYO19, SHCBP1, FMNL3, MYO1E, WEE1, REST, MARCKS, NOVA1, PDCD4, RBM42, KRAS, ATXN10, TRIM32, EIF3A, OTUD3
4	Nucleus	CCNF, BACH1, RPL7, RASSF2, MYC, TRIM24, SOX6, VPS36, TP63, TRIM23, MEF2A, PRKCI, MECP, RBFOX2, ZNF160, SFMBT2, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, SOX11, FLG2, MTAP, XRN1, PSME3, PSME4, ZNF713, VDAC2, BCORL1, CCDC82, CFTR, KCTD15, ASF1A, PAXIP1, TSHZ3, HSPA4L, NCAPG, C9ORF78, PIK3R1, UBE2J2, ZNF24, RPAP1, HIF1A, ZBTB3, FXR1, SPAST, RNF216, HIVEP2, ZNF148, RREB1, NAA50, ZNF384, PHC2, BCL11A, ZNF260, RCC2, PLK1, MEX3C, MED13L, SMARCA4, SMU1, MOV10, MLLT10, LACC1, STAG2, FUBP1, PKIA, CREBRF, REL, INTS6, RBAK, CPEB2, INTS8, RCOR1, CC2D1B, CPEB4, ZNF254, LIN54, DET1, SETD5, CDKN1A, SMG1, CDKN1B, ZNF493, PPP1R11, FAF1, KIF14, RSF1, PHF6, MECP2, EPM2AIP1, ZNF280B, PRX, REV3L, RAC1, IKBKE, ZNF486, RAB6C, PBRM1, ANXA2, STRBP, TCF12, KIF22, CCDC117, FOS, TERF1, SIRT1, RHOA, PHF20L1, GCFC2, ZEB2, PLSCR1, CNP1R1, TET3, PELI1, ZNF236, VGLL4, NFIX, TMF1, AMIGO2, TRAK1, HSPA13, EGFR, BCLAF1, SERTAD3, CUX1, UBN2, PLAGL2, DMD, SHOC2, MBNL3, ZNF224, ANKRD50, EXOSC2, PAK2, TIGAR, ZNF460, GK, CDKN2A, STAT1, PTGS2, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, MLH1, GATAD2B, PER2, TJP1, CMSS1, PHF5A, ABI2, DLC1, SERBP1, ZNF579, HSPA1B, HSPA1A, RIF1, CRTCL1, UBE2D2, GEMIN2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, FBXO25, RORA, NR3C1, HOXA13, DOCK10, PPP1CB, ZFP36, CCND2, CCND1, SESN3, PAPOLA, NBN, KPNA5, KPNA1, TLE4, USP8, ZNF561, MORC3, FBXW7, ZBTB38, TOMM34, WRNIP1, TSC1, OCRL, KCTD5, RSNB1, DMTF1, MSH2, TBL1XR1, WDFY1, ZNF678, RAF1, PPIA, NOTCH2, DDX6, KMT2A, MAZ, ATXN3, SDCBP, VCIPI1, ORC4, CCNB1, IRAK1, PMAIP1, ZKSCAN5, RPRD1A, SMN1, ECT2, EVI5, EIF2B5, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, UBE2H, CHTOP, SMAD4, SMAD3, PHF12, HSPA6, ZBTB10, HMGA2, SUPT5H, LSM4, SMAD5,



		NFKB1, CNOT4, COPS3, UBE2W, CDK5, SP1, CDK2, MDM2, GNAS, UBA3, PHF14, TCF4, NF2, COPS8, BRWD1, OGT, ZNF652, PICALM, NFE2L2, YWHAE, DDX3Y, GSK3B, KDM5C, MCM8, CELF1, CHD8, FOXM1, YBX3, CDC73, PAGR1, CASP7, ZIC3, TRPS1, METTL16, MYBL1, CTNBL1, ACTR2, USP48, MYOCD, TBP, DST, APAF1, PDPK1, ZFP91, VEZF1, AXIN2, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, TFDP2, TRAF6, LCOR, TMBIM6, CRK, SSX2IP, SLFN5, GTF2A1, SMARCD2, HDAC3, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, RNF38, RNF4, AURKA, GNA13, DNAJB1, MAPK9, ERBB4, TP53INP1, FAM120A, SH3BP4, MAPK1, ATF7IP, HNRNPA3, TAF15, MX2, EYA4, NAP1L1, USP28, MAPK14, MEIS1, WEE1, REST, ZNF619, KANSL1, NOVA1, PDCD4, RBM42, TRIM32, OTUD3, CUL4B
5	Postsynaptic density	USP8, PDPK1, PLEKHA5, TSC1, ADD3, RTN4, AURKA, RPL7, FXR1, DNAJB1, ARHGAP32, CDH2, CDK5, DLG4, MAP1B, NCS1, PDLIM5, CPEB2, PAK2, EIF3A, DBN1, CPEB4, KPNA1
6	Neuron projection	SNAP25, CHRNA5, STAU1, STON2, PTGS2, RTN4, AURKA, ROBO1, FXR1, CDH2, KIF5B, STMN1, SMN1, RAC1, MYO5A, CDK5, DLG4, RGS9BP, RAPGEF2, CDH13, NF2, CPEB2, PI4K2A, CPEB4, VAMP3
7	Dendritic spine	USP8, EPHA4, CTNND1, RHOA, DOCK10, FXR1, DNAJB1, ARHGAP32, CTTN, ABI2, DLG4, MAP1B, RAC1, CPEB2, CPEB4
8	Axon	GSK3B, EPHA4, PLXND1, DST, KCNB1, BDNF, STAT1, PLEKHG5, SLC7A11, ROBO1, IGF1R, ADAMTSL1, FXR1, SPAST, CDK5, CHL1, MAP1B, FEZ2, NCS1, NEFL, SMN1, SLC38A2, ARL8A, EIF4G2
<b>GO MOLECULAR FEATURE</b>		
1	Protein binding	NCKAP1, TRIO, BACH1, MYLK, RPL7, MYC, STMN1, VPS36, MEF2A, ATG3, GABARAPL1, PRKCI, ACOT7, RBFOX2, PRKCE, GAPVD1, EML4, MTAP, RNF128, PRKAR1A, WDR82, MTHFD2, MAP1B, KRTAP4-11, PSME3, FEZ2, PSME4, PI4K2A, ASF1A, NOLC1, NCAPG, C9ORF78, ZNF24, HIF1A, FAM221B, RNF216, EPB41L2, ZNF148, GPIHBP1, NAA50, PHC2, ZNF260, EDEM1, FZD6, PLK1, RDX, MEX3C, PRRC2B, VANGL1, MOV10, MLLT10, PPFIBP1, PKIA, REL, SFXN2, FAT4, CPEB4, LIN54, CDKN1A, SMG1, CDKN1B, STON2, PHF6, MECP2, IMPA1, NEFL, IKBKE, ANXA2, SSR3, TCF12, LRRC40, SLC39A10, FOS, TERF1, SIRT1, DUSP6, F5, PHF20L1, GCFC2, PLSCR1, ZEB2, TMEM33, TET3, PELI1, RAPGEF2, ZNF236, ERGIC1, CCDC90B, VAMP3, PCYOX1, ARF6, HBEGF, NFIX, TMF1, STAU1, ATL2, PTGS2, HSPA13, EGFR, BCLAF1, SRPX2, PLAGL2, STX5, DMD, MBNL3, ZNF224, ANKRD50, LDLR, TIGAR, ANKIB1, ZNF460, GK, CDKN2A, CSNK1A1, STAT1, KCNB1, AGL, STAT3, GTF2H1, GATAD2B, LETM1, MKLN1, PHF5A, OSTM1, ABI2, SERBP1, CCDC6, ZNF579, CEP41, AGRN, LGR4, HSPA1B, HSPA1A, RAB3B, OXNAD1, PLXND1, RIF1, TMEM167A, TUSC2, UBE2D2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, FBXO28, LTN1, RORA, MSI2, PPP1CB, ZFP36, SMCHD1, SESN3, CDH2, FADS6, CFL2, LAMP2, PAPOLA, NBN, KPNA5, KPNA1, TLE4, TPD52, MYLIP, USP8, RAB2B, FBXW7, ZBTB38, RAB30, OBSCN, RALGAPB, MSH2, IL6ST, ARL8A, NOTCH2, KMT2A, UQCRB, MAZ, UBR4, RAP1B, ATXN3, ORC4, SOCS1, BTBD1, TNFRSF17, ZKSCAN5, SMN1, RAB6A, SLC38A2, EVI5, OSBPL9, ZBTB18, EIF2B5, ANKRD28, ANKRD29, OSBPL8, UVRAG, CD164, MOAP1, CHTOP, DR1, BDNF, ZBTB10, CYBRD1, B3GALT5, LSM4, NFKB1, CNOT4, COPS3, GNL3L, CNIH1, CDK5, SP1, CDK2, MDM2, AAK1, TPP2, NF2, COPS8, OGT, ZNF652, EIF4G2, NFE2L2, ALK, SNAP25, CNTNAP1, CELF1,

		<p>MCM8, AMD1, FOXM1, SYNE3, CDC73, PAGR1, ARL5B, AP1G1, PHACTR2, ITGAV, NEO1, CTNBL1, ACTR2, CR2, APAF1, DST, ZFP91, VEZF1, DNAJC2, MMS22L, PIK3CA, ASPH, TFDP2, PCCA, TRAF3, RP2, TRAF6, POLR1B, LCOR, DSG2, TMBIM6, SFT2D2, SOS1, MET, CRK, SSX2IP, GTF2A1, SMARCD2, HDAC3, NUFIP2, LUZP1, SRSF1, RNF38, MFF, FBXL20, DNAJB1, GANAB, ABLIM1, HECTD1, TP53INP1, UBQLN1, DNAJB9, SH3BP4, DCAF10, CYB5A, HNRNPA3, NDUFA4, KCNJ9, KLF4, TNRC6C, MYO1E, TSPAN14, USH1G, NOVA1, PDCD4, ATXN10, PIK3AP1, TRIM32, EIF3A, BET1, CUL4B, TNRC6B, HHIP, CCNF, IFIT5, PPP2R2A, TXNDC12, IFIT1, ANTXR1, IFIT3, GOLGA3, RASSF2, TRIM24, ARFIP1, SOX6, TNS3, TP63, PDK1, TRIM23, EPHA4, ATP6V0E1, ARL15, SCAF11, SFMBT2, SLC11A2, MTUS2, CPT1B, DHX40, CARHSP1, THAP6, SFRP1, TWSG1, XRN1, IFI27, VDAC2, CFTR, KCTD15, PPP1R37, PAXIP1, TSHZ3, PIK3R1, RPAP1, UBE2J2, ZBTB3, FXR1, SGPL1, PRRC1, SPAST, PDCD10, TSPAN6, HIVEP2, FADD, RAB11FIP2, TRPM6, ARGLU1, ATP6V1C1, TBC1D8B, TMEM50A, SIAH3, RCC2, SURF4, IFI44, MYO5A, PARVB, SMARCA4, EXT1, SMU1, LACC1, STAG2, FUBP1, WNK3, CREBRF, CALU, INTS6, RBAK, RGL1, INTS8, TECPR2, RCOR1, CC2D1B, FKBP10, DET1, TRAM1, PPP1R11, CAB39L, FAF1, KIF14, MIA3, RSF1, PTPRJ, SLC7A11, IER3IP1, SH3RF1, LIMD2, ROBO1, EPM2AIP1, PPP3CB, GLIPR1, SPTLC1, PRX, NCS1, REV3L, RAC1, CCT2, RAB6C, PBRM1, STRBP, KIF22, CCDC117, IL17RB, RHOA, VAV2, RAP2B, CTTN, IL1B, CNEP1R1, RHOJ, TLR4, VGLL4, DBN1, STK40, ATPAF1, TLR2, PTGER4, ADH1A, AMIGO2, CXCR4, TRAK1, PBLD, SERTAD3, NT5E, PGRMC2, UBTD2, SHOC2, EXOSC2, PAK2, CBR4, MAP3K3, PLEKHA1, PTGES2, PLEKHA5, UBE2G1, RSRC2, MLH1, PEX13, MPP7, PER2, VMP1, TJP1, CMSS1, GPAM, KLHL5, DLC1, SAMD9L, GOLT1B, ICE2, CRTCI, GEMIN2, NR3C1, IGF1R, DOCK10, CCND2, CCND1, KIF5B, TRAPPC13, ARID2, KRT6C, FAM81A, MORC3, SLC30A5, ATG9A, WNT5A, TOMM34, TSC1, WRNIP1, SLC30A1, OCRL, LIFR, KCTD4, KCTD5, KLHL42, ALDH3A2, TMEM134, TBL1XR1, RPL7L1, WDFY1, RAF1, PPIA, RAI14, DDX6, CHRNA5, NDUFB10, GSTCD, SEL1L, KLHL11, LPL, KLHL12, RTN4, CAMSAP2, TMEM123, SDCBP, CCNB1, IRAK1, DPP8, ZMAT3, CASKIN1, TBC1D14, PMAIP1, RPRD1A, ECT2, KLHDC10, SMAD2, SMAD1, UBE2H, SMAD4, PNPT1, SMAD3, MUC17, PHF12, HSPA6, HMGA2, KLHL23, FAM199X, SUPT5H, SMAD5, LRP1B, TJAP1, ARHGAP32, UBE2W, EIF2S3, CCPG1, DLG4, GNB1, PHF14, GNAS, UBA3, GNB4, UBA2, TAB2, TCF4, PICALM, BMPR1A, YWHAE, GSK3B, KDM5C, DOCK4, CHD8, CTDSPL2, YBX3, OASL, SEC61A1, CA1, CASP7, SPRED1, ZIC3, TRPS1, ABCC4, USP48, MYOCD, TBP, PDPK1, PLA2G4C, HUNK, TBC1D9, AXIN2, NAV2, YWHAZ, CKAP5, TAPBP, CCNA2, FCHSD2, RCN2, OAS2, RASA1, CDH13, LUC7L2, KRT80, MOSPD2, CSTF2T, CBL, RNF4, AURKA, GNA13, MAPK9, ERBB4, SPOCK2, NAA25, MAPK1, BNIP2, PDLIM5, ABCF1, ATF7IP, TAF15, CMTM3, MX2, EYA4, ATP2B4, NAP1L1, USP28, MAPK14, SHCBP1, MEIS1, WEE1, REST, KANSL1, RBM42, KRAS, LNX2, OTUD3</p>
2	Ubiquitin protein ligase binding	<p>YWHAZ, DET1, GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, UBE2D2, FAF1, UBE2D3, CXCR4, UBE2J2, HIF1A, EGFR, RTN4, AURKA, ATXN3, IKBKE, SMAD2, CCT2, MOAP1, SMAD1, GABARAPL1, SMAD3, FBXW7, FZD6, HSPA6, UBE2G1, AXIN2, YWHAZ, SMAD5, UBE2W, ABI2, PRKAR1A, TRAF3, MDM2, TMBIM6, CRK, HSPA1B, CUL4B, HSPA1A, NFE2L2</p>

<b>3</b>	Cadherin binding	YWHAE, DDX6, CTNND1, PTPRJ, CBL, EGFR, RTN4, DNAJB1, GOLGA3, CDH3, CDH2, KIF5B, STX5, PAK2, NEO1, YKT6, ARGLU1, USP8, STAT1, RDX, GAPVD1, CKAP5, YWHAZ, MPP7, TJP1, PPFIBP1, OBSCN, FMNL2, EIF2S3, CTTN, SERBP1, CDH13, FAT3, FAT4, DBN1, EIF4G2, HSPA1A, PICALM
<b>4</b>	Enzyme binding	YWHAE, NOTCH2, HDAC3, MCM8, PTGS2, PHF6, HIF1A, EGFR, PPP3CB, ZFP36, CCND1, LAMP2, RAC1, CTNBL1, ATG3, CYB5A, TBP, STAT1, PRKCE, HSPA6, AXIN2, MLH1, MAPK14, SUPT5H, SIRT1, TSPAN14, PLSCR1, PCCA, TRAF3, MDM2, TM6IM6, RAF1, SLC27A2, RCOR1, HSPA1B, LUC7L2, CFTR, HSPA1A
<b>5</b>	Protein domain specific binding	YWHAE, SNAP25, DDX6, PLXND1, FAF1, HIF1A, MECP2, TRPS1, LAMP2, NEFL, ARFIP1, RAB6A, TP63, RCC2, WNT5A, YWHAZ, MPP7, TJP1, CCNA2, RAP2B, TFDP2, PRKAR1A, IL1B, CDK2, MDM2, CRK, NFE2L2
<b>6</b>	Protein kinase binding	GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, FAF1, KIF14, PTPRJ, FOXM1, NR3C1, HIF1A, EGFR, AURKA, PPP1CB, SPRED1, ZFP36, CCNB1, SOCS1, CCND2, IRAK1, CCND1, CDH2, PDCD10, TBC1D14, RAC1, RAB11FIP2, PAK2, MEF2A, SMAD1, SMAD3, CDKN2A, BCL11A, RCC2, PLK1, STAT3, ATP2B4, AXIN2, YWHAZ, RHOA, CCNA2, IBTK, DLG4, TRAF3, RHOJ
<b>7</b>	p53 binding	GSK3B, CDK5, CDKN2A, CHD8, PSME3, MDM2, TRIM24, HIF1A, SIRT1, TP63, SMARCA4
<b>8</b>	Heat shock protein binding	ZFP36, IRAK1, APAF1, FAF1, HSPA6, TOMM34, HSPA13, HSPA1B, HSPA1A

**Anexo X. Genes involucrados en las vías KEGG y GO de los miRNAs DE.**

<b>n</b>	<b>Termino</b>	<b>Genes</b>
<b>KEGG PATHWAY</b>		
<b>1</b>	Pathways in cancer	ALK, GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, HHIP, IGF1R, CASP7, CCND2, CCND1, MYC, ITGAV, RAC1, APAF1, GSTO2, PLEKHG5, WNT5A, FOS, AXIN2, RHOA, EML4, CCNA2, PLCB3, PIK3CA, MSH2, TRAF3, TRAF6, RAF1, IL6ST, SOS1, MET, CRK, PTGER4, NOTCH2, CXCR4, PIK3R1, CBL, PTGS2, HIF1A, EGFR, GNA13, MAPK9, MAPK1, PMAIP1, FADD, SMAD2, SMAD4, SMAD3, CDKN2A, STAT1, FZD6, STAT3, MLH1, NFKB1, SP1, GNB1, CDK2, GNB4, GNAS, CCDC6, MDM2, KRAS, CALM3, NFE2L2
<b>2</b>	Colorectal cancer	SMAD2, GSK3B, CDKN1A, SMAD4, SMAD3, PIK3R1, FOS, AXIN2, MLH1, RHOA, EGFR, MAPK9, PIK3CA, CCND1, MSH2, MYC, PMAIP1, MAPK1, KRAS, RAC1, RAF1, SOS1
<b>3</b>	Measles	GSK3B, CDKN1B, PIK3R1, MAPK9, CCND2, IRAK1, CCND1, FADD, IKBKE, APAF1, STAT1, MX2, HSPA6, STAT3, FOS, NFKB1, PIK3CA, OAS2, TRAF3, TRAF6, IL1B, CDK2, TAB2, TLR4, HSPA1B, HSPA1A, TLR2
<b>4</b>	Human cytomegalovirus infection	PTGER4, GSK3B, CDKN1A, CXCR4, PIK3R1, PTGS2, EGFR, GNA13, PPP3CB, CCND1, MYC, MAPK1, ITGAV, FADD, RAC1, CDKN2A, STAT3, TSC1, MAPK14, RHOA, NFKB1, TAPBP, PLCB3, PIK3CA, SP1, IL1B, GNB1, GNB4, GNAS, MDM2, KRAS, CALM3, RAF1, SOS1, CRK
<b>5</b>	Proteoglycans in cancer	CDKN1A, PIK3R1, CBL, HIF1A, EGFR, IGF1R, PPP1CB, CCND1, ERBB4, MYC, MAPK1, ITGAV, RAC1, SMAD2, PDPK1, FZD6, RDX, WNT5A, STAT3, MAPK14, RHOA, VAV2, CTTN, PIK3CA, MDM2, PDCD4, KRAS, RAF1, SOS1, MET, TLR4, HBEGF, TLR2
<b>6</b>	FoxO signaling pathway	CDKN1A, CDKN1B, FBXO25, PIK3R1, EGFR, IGF1R, MAPK9, CCNB1, CCND2, CCND1, MAPK1, GABARAPL1, SMAD4, SMAD3, PDPK1, PLK1, STAT3, MAPK14, SIRT1, PIK3CA, CDK2, MDM2, KRAS, RAF1, SOS1
<b>7</b>	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	GSK3B, RIF1, PIK3R1, IGF1R, ZIC3, MYC, MAPK1, SMAD2, SMAD1, SMAD4, SMAD3, FZD6, WNT5A, STAT3, LIFR, AXIN2, MAPK14, KLF4, SMAD5, REST, MEIS1, PIK3CA, KRAS, RAF1, IL6ST, BMPR1A

<b>8</b>	Cellular senescence	LIN54, CDKN1A, PIK3R1, FOXM1, PPP1CB, PPP3CB, CCNB1, CCND2, CCND1, MYC, MAPK1, NBN, SMAD2, SMAD3, CDKN2A, TSC1, MAPK14, SIRT1, NFKB1, CCNA2, PIK3CA, CDK2, MDM2, VDAC2, KRAS, CALM3, RAF1
<b>9</b>	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	ALK, MAP3K3, STAT1, STAT3, PIK3R1, FOS, MAPK14, HIF1A, EGFR, NFKB1, EML4, PPP3CB, PIK3CA, TRAF6, MAPK1, KRAS, RAF1, TLR4, TLR2
<b>10</b>	MAPK signaling pathway	EGFR, IGF1R, RAP1B, MAPK9, PPP3CB, IRAK1, ERBB4, MYC, STMN1, MKNK2, MAPK1, RAC1, PAK2, MAP3K3, BDNF, PLA2G4C, HSPA6, FOS, MAPK14, NFKB1, DUSP6, TRAF6, IL1B, RASA1, RAPGEF2, KRAS, TAB2, RAF1, SOS1, MET, CRK, HSPA1B, HSPA1A
<b>11</b>	Toll-like receptor signaling pathway	STAT1, PIK3R1, FOS, MAPK14, NFKB1, MAPK9, IRAK1, PIK3CA, TRAF3, IL1B, TRAF6, MAPK1, TAB2, FADD, RAC1, IKBKE, TLR4, TLR2
<b>12</b>	Cell cycle	YWHAE, SMAD2, GSK3B, CDKN1A, SMAD4, CDKN1B, SMAD3, CDKN2A, PLK1, YWHAZ, CCNA2, ORC4, WEE1, CCNB1, STAG2, CCND2, CCND1, TFDP2, MYC, CDK2, MDM2
<b>13</b>	Axon guidance	GSK3B, EPHA4, PDPK1, WNT5A, CXCR4, PIK3R1, SSH2, RHOA, ROBO1, ABLIM1, PPP3CB, PIK3CA, CDK5, RASA1, CFL2, MAPK1, KRAS, RAC1, RAF1, PAK2, MET, NEO1, PLXNA4
<b>14</b>	MicroRNAs in cancer	NOTCH2, CDKN1A, CDKN1B, PIK3R1, PTGS2, EGFR, SOCS1, CCND2, CCND1, MYC, STMN1, MAPK1, TP63, CDKN2A, PRKCE, RDX, STAT3, HMGA2, SIRT1, RHOA, NFKB1, ZEB2, MARCKS, MMP16, PIK3CA, MDM2, PDCD4, KRAS, RAF1, SOS1, MET, CRK
<b>15</b>	Wnt signaling pathway	TLE4, GSK3B, SMAD4, SMAD3, CSNK1A1, CHD8, FZD6, WNT5A, AXIN2, SIRT1, RHOA, VANGL1, MAPK9, PLCB3, SFRP1, PPP3CB, CCND2, CCND1, TBL1XR1, MYC, RAC1, LGR4
<b>GO BIOLOGICAL PROCESS</b>		
<b>1</b>	Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	ZNF493, CSRNP3, CRTIC1, CHD8, RORA, FOXM1, NR3C1, HOXA13, BACH1, CDC73, PAGR1, MECP2, PPP3CB, ZIC3, MYC, MYBL1, TP63, MEF2A, ACTR2, MYOCD, ANXA2, ZBTB38, TCF12, WNT5A, SOX11, VEZF1, FOS, SIRT1, PLSCR1, ZEB2, TFDP2, TBL1XR1, TRAF6, IL1B, TET3, CDH13, RAF1, MET, TLR4, TLR2, NOTCH2, GTF2A1, HDAC3, NFIX, TMF1, KMT2A, PIK3R1, ZNF24, RNF4, HIF1A, EGFR, BCLAF1, PLAGL2, FADD, ZNF148, ZNF224, RREB1, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, ZNF384,

		SMAD4, SMAD3, CDKN2A, BCL11A, STAT1, STAT3, PLEKHA5, HMGA2, MAPK14, SUPT5H, KLF4, SMAD5, NFKB1, SMARCA4, MLLT10, REST, MEIS1, SP1, CCPG1, CREBRF, REL, TCF4, AGRN, OGT, BMPR1A, NFE2L2
2	Positive regulation of DNA-templated transcription	CHD8, RSF1, RORA, FOXM1, PPP3CB, ZIC3, MYC, TRIM24, MYBL1, TP63, MEF2A, MYOCD, WNT5A, FOS, CCNA2, DNAJC2, SFRP1, ASPH, TBL1XR1, IL1B, SMARCD2, NFIX, KMT2A, MAZ, RNF4, HIF1A, EGFR, SERTAD3, ERBB4, TP53INP1, RREB1, ATF7IP, SMAD2, SMAD4, TAF15, SMAD3, CDKN2A, PTGES2, STAT1, STAT3, HMGA2, GTF2H1, KLF4, SMAD5, NFKB1, GATAD2B, SMARCA4, PER2, REST, PHF5A, KANSL1, SP1, CDK2, TCF4, OGT, TRIM32, NFE2L2, PICALM
3	Negative regulation of gene expression	DDX3Y, NOTCH2, GSK3B, CDKN1A, TMF1, CELF1, HIF1A, AURKA, ROBO1, MECP2, PDCD10, TP53INP1, ZNF148, LDLR, SMAD2, SMAD3, FBXW7, SFMBT2, SLC35C2, STAT3, ATP2B4, SOX11, KLF4, SIRT1, SMAD5, NFKB1, SFRP1, REST, PIK3CA, PRKAR1A, REL, RCOR1, BMPR1A, PICALM
4	Positive regulation of miRNA transcription	NOTCH2, SMAD1, MYOCD, SMAD4, SMAD3, STAT3, FOS, KLF4, NR3C1, HIF1A, EGFR, SMARCA4, MYC, BMPR1A
5	Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	ZNF254, KDM5C, RIF1, UBE2D2, CHD8, UBE2D3, FOXM1, NR3C1, BACH1, PHF6, YBX3, CDC73, MECP2, ZFP36, CCND1, MYC, TRPS1, TP63, TLE4, MEF2A, MYOCD, MORC3, SOX11, YWHAZ, SIRT1, ZEB2, IFI27, TBL1XR1, TRAF6, LCOR, BCORL1, NOTCH2, HDAC3, NFIX, MAZ, DNAJB1, SDCBP, CUX1, ZNF148, ZNF224, RREB1, ATF7IP, ZBTB18, DR1, SMAD4, SMAD3, BCL11A, STAT1, PHF12, PLK1, STAT3, ZBTB10, HMGA2, SUPT5H, KLF4, SMAD5, NFKB1, GATAD2B, SMARCA4, PER2, REST, PKIA, CDK2, CREBRF, PHF14, MDM2, OGT, CC2D1B, HSPA1A
6	Apoptotic process	NOTCH2, NCKAP1, CSRNP3, KMT2A, UBE2D2, FAF1, UBE2D3, CXCR4, NR3C1, YBX3, RTN4, AURKA, FXR1, CASP7, BCLAF1, RNF216, DPP8, ZMAT3, PDCD10, TP53INP1, BNIP2, MAPK1, PMAIP1, DMD, FADD, PAK2, TP63, MEF2A, APAF1, CDKN2A, PRKCE, MAPK14, NFKB1, PLSCR1, MARCKS, IFI27, TRAF3, PSME3, DLC1, IL1B, MDM2, PDCD4, TMBIM6, RAF1, OGT, PPIA, TLR2
7	Negative regulation of apoptotic process	NOTCH2, GSK3B, CDKN1A, HDAC3, HHIP, KIF14, PIK3R1, CBL, CDC73, SH3RF1, EGFR, IFIT3, AURKA, IGF1R, CCND2, ERBB4, PDCD10, MYC, BNIP2, PAK2, PRKCI, SMAD3, PLK1, WNT5A, HMGA2, YWHAZ, SIRT1, SMAD5, NFKB1, TJP1, SFRP1,

		RASA1, WNK3, MDM2, PDCD4, TMBIM6, RAF1, IL6ST, TPT1, STK40, HSPA1B, HSPA1A
8	Cellular response to hypoxia	TIGAR, CDKN1B, PRKCE, RORA, FOS, CBL, PTGS2, SIRT1, HIF1A, RTN4, CCNA2, SFRP1, IRAK1, MYC, MDM2, UBQLN1, PMAIP1, CPEB2, NFE2L2
9	Positive regulation of Notch signaling pathway	LFNG, PRKCI, TSPAN14, PDCD10, SLC35C2, STAT3, AAK1, IL6ST, TP63, ROBO1
10	MAPK cascade	YWHAE, MEF2A, SMAD1, MAP3K3, PRKCE, EGFR, DUSP6, SH3RF1, PPP1CB, ZFP36, MYC, RAPGEF2, KRAS, NF2, RAF1
11	Negative regulation of neuron apoptotic process	PRKCI, PLXND1, BDNF, KIF14, SIRT1, HIF1A, MECP2, PIK3CA, CCND1, MSH2, CHL1, RASA1, KRAS, IL6ST, CPEB2, CPEB4
12	Negative regulation of cell growth	CDKN1A, SMAD4, CDKN1B, SMAD3, CDKN2A, PTPRJ, RTN4, SMARCA4, SFRP1, SERTAD3, SH3BP4, HSPA1B, VGLL4, HSPA1A
13	Neuron migration	YWHAE, CXCR4, PEX13, RHOA, SH3RF1, ABI2, CDK5, CHL1, MAP1B, RAPGEF2, RAC1, NEO1, CRK
14	Neuron projection morphogenesis	NCKAP1, UGT8, WEE1, CNTNAP1, TRIO, CTTN, BDNF, EGFR, DBN1
15	Cellular response to mechanical stimulus	PTGER4, APAF1, IL1B, FADD, PTGS2, SLC38A2, TLR4, EGFR, NFKB1, IGF1R
<b>GO CELULAR COMPONENT</b>		
1	Cytosol	DMGDH, NCKAP1, TRIO, CCNF, IFIT5, PPP2R2A, IFIT1, BACH1, IFIT3, MYLK, RPL7, GOLGA3, HERC4, RASSF2, STMN1, TRIM24, ARFIP1, TNS3, VPS36, MEF2A, ATG3, GABARAPL1, PRKCI, ACOT7, SFMBT2, PRKCE, GAPVD1, EML4, RNF123, CARHSP1, SFRP1, MTAP, XRN1, RNF128, PDE12, PRKAR1A, MAP1B, CLNS1A, KRTAP4-11, PSME3, PSME4, VDAC2, CFTR, PI4K2A, HSPA4L, NCAPG, C9ORF78, PIK3R1, UBE2J2, HIF1A, FXR1, SPAST, RNF216, PDCD10, EPB41L2, FADD, ARGLU1, ATP6V1C1, TBC1D8B, NAA50, BCL11A, ZNF260, RCC2, SURF4, PLK1, MYO5A, PARVB, CYLD, MOV10, MLLT10, UCK2, PPFIBP1, HAL, STAG2, WNK3, REL, SPATS2L, CALM3, RGL1, CC2D1B, CDKN1A, SMG1, MTMR10, CDKN1B, CAB39L, FAF1, KIF14, STON2, SH3RF1, LIMD2, MECP2, PPP3CB, IMPA1, NCS1, NEFL, MUC13, PHGDH, RAC1, IKBKE, CCT2, RAB6C, GSTO2, ANXA2, KIF22, FOS, SIRT1, DUSP6, RHOA, VAV2, GCFC2, ZEB2, PLCB3, PLSCR1, ALDH5A1, RAP2B, CTTN, CNEP1R1,

		<p>IL1B, PELI1, RAPGEF2, STK40, VAMP3, ARF6, TMF1, STAU1, ADH1A, TRAK1, HSPA13, NT5E, CUX1, STX5, DMD, SHOC2, MBNL3, ANKRD50, EXOSC2, YKT6, PAK2, MAP3K3, TIGAR, GK, PLEKHA1, CDKN2A, STAT1, PTGES2, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, UBE2G1, PEX13, PER2, TJP1, MKLN1, OSTM1, KLHL5, ABI2, XPOT, DLC1, SERBP1, CCDC6, CEP41, HSPA1B, HSPA1A, GOLT1B, ICE2, CRTCC1, UBE2D2, GEMIN2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, LTN1, MSI2, NR3C1, DOCK10, PPP1CB, ZFP36, CCND2, CCND1, KIF5B, NBN, TRAPPC13, KPNA5, KRT6C, PLS1, KPNA1, USP8, MYLIP, FBXW7, TOMM34, TSC1, OCRL, KCTD5, KLHL42, ALDH3A2, TMEM134, OBSCN, DMTF1, WDFY1, RAF1, SLC27A2, PPIA, RAI14, DDX6, KMT2A, CABP4, ANKRD12, GMPS, UBR4, KLHL11, UAP1, KLHL12, CAMSAP2, RAP1B, ATXN3, SDCBP, ORC4, CCNB1, SOCS1, IRAK1, BTBD1, DPP8, TBC1D14, PMAIP1, SMN1, IP6K1, RAB6A, ECT2, EVI5, EIF2B5, OSBPL9, ANKRD28, SPECC1, SMAD2, MOAP1, OSBPL8, SMAD1, UBE2H, ACBD5, SMAD4, PNPT1, SMAD3, HSPA6, LSM4, SMAD5, NFKB1, CNOT4, ARHGAP32, COPS3, GNL3L, EIF2S3, CDK5, DLG4, GNB1, CDK2, MDM2, GNAS, AAK1, UBA3, GNB4, TPP2, TAB2, NF2, COPS8, BRWD1, OGT, EIF4G2, PICALM, NFE2L2, YWHAZ, DDX3Y, GSK3B, SNAP25, DOCK4, KDM5C, DOCK9, CHD9, AMD1, YBX3, CDC73, OASL, CA1, CASP7, SPRED1, AP1G1, KYNU, ITGAV, CTNNB1, ACTR2, USP48, HMGCS1, DST, APAF1, PDPK1, PLEKHG5, PLA2G4C, AXIN2, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, PIK3CA, PCCA, TRAF3, OAS2, TRAF6, POLR1B, RASA1, ANG, SOS1, CRK, RBM24, GTF2A1, KRT80, HDAC3, NUFIP2, TULP4, ADD3, CBL, AURKA, GNA13, FBXL20, DNAJB1, MAPK9, ERBB4, TP53INP1, FAM120A, NAA25, UBQLN1, BNIP2, MAPK1, PDLIM5, ABCF1, ATF7IP, CYB5A, CMTM3, MX2, KLF4, USP28, MAPK14, MYO19, TNRC6C, FMNL3, REST, FMNL2, USH1G, DNAJA2, PDCD4, KRAS, ATXN10, PIK3AP1, TRIM32, TPT1, EIF3A, TNRC6B, OTUD3, CUL4B</p>
2	Nucleoplasm	<p>PPP2R2A, BACH1, GOLGA3, RASSF2, MYC, TRIM24, SOX6, TP63, MEF2A, PRKCI, ACOT7, RBFOX2, SCAF11, SLC35C2, SFMBT2, SOX11, MTAP, WDR82, CLNS1A, PSME3, PSME4, BCORL1, ASF1A, PAXIP1, TSHZ3, NOLC1, C9ORF78, ZNF24, HIF1A, SPAST, RNF216, EPB41L2, HIVEP2, ZNF148, RAB11FIP2, ARGLU1, PHC2, BCL11A, ZNF260, SIAH3, PLK1, MED13L, SMARCA4, SMU1, MLLT10, STAG2, FUBP1, CREBRF, REL, SPATS2L, CALM3, INTS6, RBAK, INTS8, RCOR1, CC2D1B, LIN54,</p>



		<p>SETD5, CDKN1A, SMG1, CDKN1B, ZNF493, FAF1, RSF1, PHF6, LIMD2, MECP2, PPP3CB, REV3L, IKBKE, PBRM1, NSUN5, TCF12, FOS, TERF1, SIRT1, DUSP6, PHF20L1, GCFC2, ZEB2, PLSCR1, ERGIC1, STK40, NFIX, ADH1A, BCLAF1, NT5E, PGRMC2, CUX1, UBN2, SHOC2, MBNL3, ZNF224, EXOSC2, PLEKHA1, CDKN2A, STAT1, STAT3, PLEKHA5, GTF2H1, MLH1, GATAD2B, MPP7, PER2, MKLN1, PHF5A, ABI2, XPOT, ZNF74, HSPA1B, HSPA1A, RIF1, ICE2, CRT1, UBE2D2, GEMIN2, CSE1L, UBE2D3, RORA, NR3C1, HOXA13, DOCK10, PPP1CB, CCND2, CCND1, PAPOLA, NBN, KPNA5, ARID2, KPNA1, TLE4, GEN1, MORC3, FBXW7, ZBTB38, SLC30A5, DMTF1, MSH2, TBL1XR1, RAI14, NOTCH2, KMT2A, MAZ, ANKRD12, UBR4, UAP1, ATXN3, SDCBP, ORC4, CCNB1, SOCS1, IRAK1, BTBD1, ZMAT3, TBC1D14, RPRD1A, SMN1, IP6K1, ECT2, KLHDC10, ANKRD28, ZBTB18, SPECC1, SMAD2, SMAD1, DR1, ACBD5, CHTOP, SMAD4, SMAD3, PHF12, ZBTB10, HMGA2, SUPT5H, LSM4, SMAD5, NFKB1, ARHGAP32, COPS3, UBE2W, IBTK, GNL3L, CDK5, SP1, CDK2, MDM2, TPP2, UBA2, TAB2, COPS8, BRWD1, OGT, NFE2L2, DDX3Y, GSK3B, KDM5C, MCM8, CHD9, CELF1, CHD8, CTDSPL2, FOXM1, CDC73, OASL, PAGR1, CASP7, SPRED1, ZIC3, TRPS1, KYNU, NEO1, MYBL1, CTNNB1, USP48, TBP, DST, PLA2G4C, ZFP91, VEZF1, NAV2, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, TFDP2, OAS2, RP2, POLR1B, LCOR, RBM24, GTF2A1, SMARCD2, HDAC3, NUFIP2, SRSF1, RNF38, CSTF2T, RNF4, AURKA, DNAJB1, MAPK9, ERBB4, TP53INP1, MKNK2, UBQLN1, MAPK1, DCAF10, ABCF1, ATF7IP, HNRNPA3, TAF15, RPRD2, KLF4, USP28, MAPK14, TNRC6C, WEE1, REST, KANSL1, NOVA1, RBM42, EIF3A, TNRC6B, CUL4B</p>
3	Cytoplasm	<p>DMGDH, TRIO, LPGAT1, HHIP, CCNF, IFIT1, BACH1, IFIT3, MYLK, RPL7, HERC4, RASSF2, MYC, ANPEP, STMN1, SOX6, TP63, TRIM23, ATG3, EPHA4, PRKCI, ACOT7, RBFOX2, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, ACSL4, EML4, FLG2, RNF123, CARHSP1, RNF128, PRKAR1A, PSME3, FEZ2, CFTR, HSPA4L, NOLC1, NCAPG, PIK3R1, HIF1A, FXR1, NEU3, SPAST, PRR1, PDCD10, FADD, RREB1, NAA50, TMEM50A, BCL11A, SIAH3, PLK1, RDX, MYO5A, IFI44, PARVB, MEX3C, SMU1, UCK2, FUBP1, PKIA, WNK3, CREBRF, REL, CCSER2, SPATS2L, CALM3, TECPR2, CPEB2, CPEB4, SMG1, MTMR10, CDKN1B, PPP1R11, CAB39L, KIF14, SH3RF1, ROBO1, ADAMTSL1, PPP3CB, IMPA1, PRX, NCS1, NEFL, RAC1, IKBKE, GSTO2, ANXA2, STRBP, TCF12,</p>

		<p>KIF22, CCDC117, TERF1, SIRT1, DUSP6, VAV2, PLCB3, PLSCR1, CTTN, CNEP1R1, TET3, PELI1, RAPGEF2, L2HGDH, TLR4, DBN1, ARF6, TLR2, STAU1, CXCR4, PTGS2, TRAK1, HSPA13, EGFR, PBLD, BCLAF1, SRPX2, PDPR, UBTD2, DMD, SHOC2, MBNL3, EXOSC2, YKT6, PAK2, MAP3K3, TIGAR, ANKIB1, PLEKHA1, CDKN2A, STAT1, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, PER2, TJP1, MKLN1, KLHL5, ABI2, XPOT, DLC1, SERBP1, CEP41, HSPA1B, HSPA1A, RAB3B, SAMD9L, RIF1, CRTCL1, CSE1L, CTNND1, FBXO25, MSI2, NR3C1, BZW1, IFI44L, DOCK10, PPP1CB, ZFP36, PTAR1, CCND2, CDH3, CCND1, SESN3, CDH2, CFL2, KIF5B, PAPOLA, TRAPPC13, KPNA5, ANKRD13A, PLS1, KPNA1, TPD52, USP8, FBXW7, TSC1, SLC30A1, OCRL, KCTD5, ALDH3A2, ACAP2, RAF1, PPIA, ARL8A, XPR1, DDX6, CABP4, GSTCD, UBR4, ATXN3, SDCBP, VCP1P1, ODF2L, CCNB1, SOCS1, IRAK1, DPP8, CASKIN1, SMN1, IP6K1, ECT2, SLC38A2, KLHDC10, EIF2B5, SMAD2, MOAP1, UVRAG, SMAD1, ACBD5, SMAD4, PNPT1, SMAD3, BDNF, HSPA6, BTBD9, SSH2, SMAD5, NFKB1, COPS3, UBE2W, IBTK, EIF2S3, CDK5, SP1, DLG4, GNB1, CDK2, MDM2, GNAS, UBA3, PHF14, GNB4, TPP2, SRPRB, UBA2, TAB2, NF2, COPS8, NFE2L2, YWHAE, GSK3B, SNAP25, DOCK4, KDM5C, CELF1, YBX3, SYNE3, OASL, CA1, CASP7, ARL5B, AP1G1, ZIC3, KYNU, METTL16, ARL5A, ACTR2, TBP, HMGCS1, DST, APAF1, PDPK1, PLEKHG5, HUNK, AXIN2, CKAP5, YWHAZ, CCNA2, DNAJC2, PIK3CA, TRAF3, OAS2, RP2, TRAF6, RASA1, CDH13, TMBIM6, SFT2D2, SOS1, CRK, SSX2IP, KRT80, SLC24A4, HDAC3, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, TULP4, RNF4, AURKA, GNA13, FBXL20, DNAJB1, MAPK9, ABLIM1, MKNK2, NAA25, UBQLN1, DNAJB9, SH3BP4, BNIP2, MAPK1, PDLIM5, ABCF1, TAF15, MX2, EYA4, NAP1L1, MAPK14, MYO19, SHCBP1, FMNL3, MYO1E, WEE1, REST, MARCKS, NOVA1, DNAJA2, PDCD4, RBM42, KRAS, ATXN10, TRIM32, TPT1, EIF3A, OTUD3</p>
4	Nucleus	<p>CCNF, BACH1, RPL7, RASSF2, MYC, TRIM24, SOX6, VPS36, TP63, TRIM23, MEF2A, PRKCI, MECR, RBFOX2, ZNF160, SFMBT2, PRKCE, SLC11A2, MTUS2, SOX11, FLG2, MTAP, XRN1, CLNS1A, PSME3, PSME4, ZNF713, VDAC2, BCORL1, CCDC82, CFTR, KCTD15, ASF1A, PAXIP1, TSHZ3, HSPA4L, NCAPG, C9ORF78, PIK3R1, UBE2J2, ZNF24, RPAP1, HIF1A, ZBTB3, FXR1, SPAST, RNF216, HIVEP2, ZNF148, RREB1, NAA50, ZNF384, PHC2, BCL11A, ZNF260, RCC2, PLK1, MEX3C, MED13L, SMARCA4, SMU1, MOV10, MLLT10, LACC1, STAG2, FUBP1, PKIA, CREBRF, REL, CALM3,</p>

		<p>INTS6, RBAK, CPEB2, INTS8, RCOR1, CC2D1B, CPEB4, ZNF254, LIN54, DET1, SETD5, CDKN1A, SMG1, CDKN1B, CSRN3, ZNF493, PPP1R11, FAF1, KIF14, RSF1, PHF6, MECP2, EPM2AIP1, ZNF280B, PRX, REV3L, RAC1, IKBKE, ZNF486, RAB6C, PBRM1, ANXA2, STRBP, TCF12, KIF22, CCDC117, FOS, TERF1, SIRT1, RHOA, PHF20L1, GCFC2, ZEB2, PLCB3, PLSCR1, CNEP1R1, TET3, PELI1, ZNF236, VGLL4, NFIX, TMF1, AMIGO2, TRAK1, HSPA13, EGFR, BCLAF1, SERTAD3, CUX1, UBN2, PLAGL2, DMD, SHOC2, MBNL3, ZNF224, ANKRD50, EXOSC2, PAK2, TIGAR, ZNF460, GK, CDKN2A, STAT1, PTGES2, CSNK1A1, AGL, STAT3, PLEKHA5, MLH1, GATAD2B, PER2, TJP1, CMSS1, PHF5A, ABI2, DLC1, SERBP1, ZNF74, ZNF579, HSPA1B, HSPA1A, RIF1, CRTCL, UBE2D2, GEMIN2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, FBXO25, RORA, NR3C1, HOXA13, DOCK10, PPP1CB, ZFP36, CCND2, CCND1, SESN3, PAPOLA, NBN, KPNA5, KPNA1, TLE4, USP8, ZNF561, MORC3, FBXW7, ZBTB38, TOMM34, WRNIP1, TSC1, OCRL, KCTD5, RSN1, DMTF1, MSH2, TBL1XR1, WDFY1, ZNF678, RAD54L2, RAF1, PPIA, NOTCH2, DDX6, KMT2A, MAZ, ATXN3, SDCBP, VCPIP1, ORC4, CCNB1, IRAK1, PMAIP1, ZKSCAN5, RPRD1A, SMN1, IP6K1, ECT2, EVI5, EIF2B5, ZBTB18, SMAD2, SMAD1, UBE2H, CHTOP, SMAD4, SMAD3, PHF12, HSPA6, ZBTB10, HMGA2, SUPT5H, LSM4, SMAD5, NFKB1, CNOT4, COPS3, UBE2W, CDK5, SP1, CDK2, MDM2, GNAS, UBA3, PHF14, TCF4, NF2, COPS8, BRWD1, OGT, ZNF652, PICALM, NFE2L2, ZNF772, YWHAE, DDX3Y, GSK3B, KDM5C, MCM8, CELF1, CHD8, FOXM1, YBX3, CDC73, PAGR1, CASP7, ZIC3, TRPS1, METTL16, MYBL1, CTNBL1, ACTR2, USP48, MYOCD, TBP, DST, APAF1, PDPK1, ZFP91, VEZF1, AXIN2, YWHAZ, CCNA2, MMS22L, DNAJC2, TFDP2, TRAF6, LCOR, ANG, TMBIM6, CRK, SSX2IP, RBM24, SLFN5, GTF2A1, SMARCD2, HDAC3, LUZP1, NUFIP2, SRSF1, RNF38, RNF4, AURKA, GNA13, DNAJB1, MAPK9, ERBB4, TP53INP1, FAM120A, MKNK2, SH3BP4, MAPK1, ATF7IP, HNRNPA3, TAF15, MX2, EYA4, NAP1L1, USP28, MAPK14, MEIS1, WEE1, REST, ZNF619, KANSL1, NOVA1, PDCD4, RBM42, TRIM32, TPT1, OTUD3, CUL4B</p>
5	Glutamatergic synapse	<p>SNAP25, GSK3B, CNTNAP1, TRIO, PLXND1, STAU1, CTNND1, PPP2R2A, RTN4, AURKA, DOCK10, RAP1B, FXR1, FBXL20, MECP2, DNAJB1, PPP3CB, ERBB4, RAC1, PAK2, FAM81A, KPNA1, USP8, EPHA4, PRKCI, WNT5A, PLEKHA5, ATP2B4, MAPK14, BTBD9, YWHAZ, RHOA, PRKAR1A, DLG4, OGT, DBN1, ARF6</p>

6	Postsynaptic density	USP8, PDPK1, PLEKHA5, TSC1, ADD3, RTN4, AURKA, RPL7, FXR1, DNAJB1, ARHGAP32, CDH2, CDK5, DLG4, MAP1B, NCS1, PDLIM5, CPEB2, PAK2, EIF3A, DBN1, CPEB4, KPNA1
7	Midbody	USP8, UVRAG, ANXA2, RCC2, PLK1, RDX, CTNND1, KIF14, SHCBP1, RHOA, AURKA, EML4, CYLD, SPAST, ATXN10, ECT2, ARL8A, RAB11FIP4, ARF6
8	Neuron projection	SNAP25, CHRNA5, STAU1, STON2, PTGS2, RTN4, AURKA, ROBO1, FXR1, CDH2, KIF5B, STMN1, SMN1, RAC1, MYO5A, CDK5, DLG4, RGS9BP, RAPGEF2, CDH13, NF2, CPEB2, PI4K2A, CPEB4, VAMP3
<b>GO MOLECULAR FEATURE</b>		
1	Protein binding	NCKAP1, TRIO, BACH1, MYLK, RPL7, MYC, STMN1, VPS36, MEF2A, ATG3, GABARAPL1, PRKCI, ACOT7, RBFOX2, PRKCE, GAPVD1, EML4, MTAP, RNF128, PRKAR1A, WDR82, MTHFD2, MAP1B, CLNS1A, KRTAP4-11, PSME3, FEZ2, PSME4, PI4K2A, ASF1A, NOLC1, NCAPG, C9ORF78, ZNF24, HIF1A, FAM221B, RNF216, EPB41L2, ZNF148, GPIHBP1, NAA50, PHC2, ZNF260, EDEM1, FZD6, PLK1, RDX, MEX3C, PRRC2B, VANGL1, MOV10, CYLD, MLLT10, PPFIBP1, PKIA, REL, SFXN2, FAT4, CPEB4, LIN54, CDKN1A, SMG1, CDKN1B, STON2, PHF6, MECP2, IMPA1, NEFL, IKBKE, ANXA2, GSTO2, SSR3, TCF12, LRRC40, SLC39A10, FOS, TERF1, SIRT1, DUSP6, F5, PHF20L1, GCFC2, PLCB3, PLSCR1, ZEB2, TMEM33, TET3, PELI1, RAPGEF2, ZNF236, ERGIC1, CCDC90B, VAMP3, PCYOX1, ARF6, HBEGF, NFIX, TMF1, STAU1, ATL2, PTGS2, HSPA13, EGFR, BCLAF1, SRPX2, PLAGL2, STX5, DMD, MBNL3, ZNF224, ANKRD50, LDLR, TIGAR, ANKIB1, ZNF460, GK, CDKN2A, CSNK1A1, STAT1, KCNB1, AGL, STAT3, GTF2H1, GATAD2B, LETM1, MKLN1, PHF5A, OSTM1, ABI2, SERBP1, CCDC6, ZNF579, CEP41, AGRN, LGR4, HSPA1B, HSPA1A, RAB3B, OXNAD1, PLXND1, RIF1, TMEM167A, TUSC2, UBE2D2, CSE1L, UBE2D3, CTNND1, FBXO28, LTN1, RORA, MSI2, PPP1CB, ZFP36, SMCHD1, SESN3, CDH2, FADS6, CFL2, LAMP2, PAPOLA, NBN, KPNA5, KPNA1, TLE4, TPD52, MYLIP, USP8, RAB2B, FBXW7, ZBTB38, RAB30, OBSCN, RALGAPB, MSH2, RAD54L2, IL6ST, ARL8A, NOTCH2, KMT2A, UQCRB, MAZ, UBR4, RAP1B, ATXN3, ORC4, SOCS1, BTBD1, TNFRSF17, ZKSCAN5, SMN1, IP6K1, RAB6A, SLC38A2, EVI5, OSBPL9, ZBTB18, EIF2B5, ANKRD28, ANKRD29, OSBPL8, UVRAG, CD164, MOAP1, CHTOP, DR1, BDNF, ZBTB10, CYBRD1, B3GALT5, LSM4, NFKB1, CNOT4, COPS3, GNL3L,

CNIH1, CDK5, SP1, CDK2, MDM2, AAK1, TPP2, NF2, COPS8, OGT, ZNF652, EIF4G2, ZNF772, NFE2L2, ALK, SNAP25, CNTNAP1, CELF1, MCM8, AMD1, FOXM1, SYNE3, CDC73, PAGR1, ARL5B, AP1G1, PHACTR2, ITGAV, NEO1, CTNBL1, ACTR2, CR2, APAF1, DST, ZFP91, VEZF1, DNAJC2, MMS22L, PIK3CA, ASPH, TFDP2, PCCA, TRAF3, RP2, TRAF6, POLR1B, LCOR, ANG, DSG2, TMBIM6, SFT2D2, SOS1, MET, CRK, SSX2IP, GTF2A1, SMARCD2, HDAC3, NUFIP2, LUZP1, SRSF1, RNF38, MFF, FBXL20, DNAJB1, GANAB, ABLIM1, HECTD1, TP53INP1, UBQLN1, DNAJB9, SH3BP4, DCAF10, CYB5A, HNRNPA3, NDUFA4, KCNJ9, KLF4, TNRC6C, MYO1E, TSPAN14, USH1G, NOVA1, DNAJA2, PDCD4, ATXN10, PIK3AP1, TRIM32, TPT1, EIF3A, BET1, CUL4B, TNRC6B, HHIP, CCNF, IFIT5, PPP2R2A, TXNDC12, IFIT1, ANTXR1, IFIT3, GOLGA3, RASSF2, TRIM24, ARFIP1, SOX6, TNS3, TP63, PDK1, TRIM23, EPHA4, ATP6V0E1, ARL15, SCAF11, SFMBT2, SLC11A2, MTUS2, CPT1B, DHX40, CARHSP1, THAP6, SFRP1, TWSG1, XRN1, IFI27, VDAC2, CFTR, KCTD15, PPP1R37, PAXIP1, TSHZ3, PIK3R1, RPAP1, UBE2J2, ZBTB3, FXR1, NEU3, SGPL1, PRRC1, SPAST, PDCD10, TSPAN6, HIVEP2, FADD, RAB11FIP2, TRPM6, ARGLU1, RAB11FIP4, ATP6V1C1, TBC1D8B, TMEM50A, SIAH3, RCC2, SURF4, IFI44, MYO5A, PARVB, SMARCA4, EXT1, SMU1, LACC1, STAG2, FUBP1, WNK3, CREBRF, CALU, CALM3, INTS6, RBAK, RGL1, INTS8, TECPR2, RCOR1, CC2D1B, FKBP10, DET1, TRAM1, PPP1R11, CAB39L, FKBP14, FAF1, KIF14, MIA3, RSF1, PTPRJ, SLC7A11, IER3IP1, SH3RF1, LIMD2, ROBO1, EPM2AIP1, PPP3CB, GLIPR1, SPTLC1, PRX, NCS1, REV3L, RAC1, CCT2, RAB6C, PBRM1, STRBP, KIF22, CCDC117, IL17RB, RHOA, VAV2, RAP2B, CTTN, IL1B, CNEP1R1, RHOJ, TLR4, VGLL4, DBN1, STK40, ATPAF1, TLR2, PTGER4, ADH1A, AMIGO2, CXCR4, TRAK1, PBLD, SERTAD3, NT5E, PGRMC2, UBTD2, SHOC2, EXOSC2, PAK2, CBR4, MAP3K3, PLEKHA1, PTGES2, PLEKHA5, UBE2G1, RSRC2, MLH1, PEX13, MPP7, PER2, VMP1, TJP1, CMSS1, GPAM, KLHL5, XPOT, DLC1, SAMD9L, GOLT1B, ICE2, CRT1, GEMIN2, NR3C1, IGF1R, DOCK10, CCND2, CCND1, KIF5B, TRAPPC13, ARID2, KRT6C, FAM81A, MORC3, SLC30A5, ATG9A, WNT5A, TOMM34, TSC1, WRNIP1, SLC30A1, OCRL, LIFR, KCTD4, KCTD5, KLHL42, ALDH3A2, TMEM134, TBL1XR1, RPL7L1, WDFY1, RAF1, PPIA, RAI14, DDX6, CHRNA5, NDUFB10, GSTCD, SEL1L, KLHL11, LPL, KLHL12, RTN4, CAMSAP2, TMEM123, SDCBP, CCNB1, IRAK1, DPP8, ZMAT3, CASKIN1, TBC1D14,

		PMAIP1, RPRD1A, ECT2, KLHDC10, SMAD2, SMAD1, UBE2H, SMAD4, PNPT1, SMAD3, MUC17, PHF12, HSPA6, HMGA2, KLHL23, FAM199X, SUPT5H, SMAD5, LRP1B, TJAP1, ARHGAP32, UBE2W, EIF2S3, CCPG1, DLG4, GNB1, PHF14, GNAS, UBA3, GNB4, UBA2, TAB2, TCF4, PICALM, BMPR1A, YWHAЕ, GSK3B, KDM5C, DOCK4, DOCK9, CHD8, CTDSPL2, YBX3, OASL, SEC61A1, CA1, CASP7, SPRED1, ZIC3, TRPS1, QRFPR, ABCC4, USP48, MYOCD, TBP, PDPK1, PLA2G4C, HUNK, TBC1D9, AXIN2, NAV2, YWHAZ, CKAP5, TAPBP, CCNA2, FCHSD2, RCN2, OAS2, RASA1, CDH13, RBM24, LUC7L2, KRT80, MOSPD2, CSTF2T, CBL, RNF4, AURKA, GNA13, MAPK9, ERBB4, SPOCK2, MKNK2, NAA25, MAPK1, BNIP2, PDLIM5, ABCF1, ATF7IP, TAF15, CMTM3, MX2, EYA4, ATP2B4, NAP1L1, USP28, MAPK14, SHCBP1, MEIS1, WEE1, REST, KANSL1, RBM42, KRAS, LNX2, OTUD3
2	Ubiquitin protein ligase binding	YWHAЕ, DET1, GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, UBE2D2, FAF1, UBE2D3, CXCR4, UBE2J2, HIF1A, EGFR, RTN4, AURKA, ATXN3, IKBKE, SMAD2, CCT2, MOAP1, SMAD1, GABARAPL1, SMAD3, FBXW7, FZD6, HSPA6, UBE2G1, AXIN2, YWHAZ, SMAD5, UBE2W, ABI2, PRKAR1A, TRAF3, MDM2, TMBIM6, CRK, HSPA1B, CUL4B, HSPA1A, NFE2L2
3	Cadherin binding	YWHAЕ, DDX6, DOCK9, CTNND1, PTPRJ, CBL, BZW1, EGFR, RTN4, DNAJB1, GOLGA3, CDH3, CDH2, KIF5B, STX5, PAK2, NEO1, YKT6, ARGLU1, USP8, STAT1, RDX, GAPVD1, CKAP5, YWHAZ, MPP7, TJP1, PLCB3, PPFIBP1, OBSCN, FMNL2, EIF2S3, CTTN, SERBP1, CDH13, FAT3, FAT4, DBN1, EIF4G2, HSPA1A, PICALM
4	Enzyme binding	YWHAЕ, NOTCH2, HDAC3, MCM8, PTGS2, PHF6, HIF1A, EGFR, PPP3CB, ZFP36, CCND1, LAMP2, RAC1, CTNNBL1, ATG3, CYB5A, TBP, STAT1, PRKCE, HSPA6, AXIN2, MLH1, MAPK14, SUPT5H, SIRT1, TSPAN14, PLSCR1, PCCA, TRAF3, MDM2, TMBIM6, RAF1, SLC27A2, RCOR1, HSPA1B, LUC7L2, CFTR, HSPA1A
5	Protein domain specific binding	YWHAЕ, SNAP25, DDX6, PLXND1, FAF1, HIF1A, MECP2, TRPS1, LAMP2, NEFL, ARFIP1, RAB6A, TP63, RCC2, WNT5A, YWHAZ, MPP7, TJP1, CCNA2, RAP2B, TFDP2, PRKAR1A, IL1B, CDK2, MDM2, CRK, NFE2L2
6	Protein kinase binding	GSK3B, CDKN1A, CDKN1B, FAF1, KIF14, PTPRJ, FOXM1, NR3C1, HIF1A, EGFR, AURKA, PPP1CB, SPRED1, ZFP36, CCNB1, SOCS1, CCND2, IRAK1, CCND1, CDH2, PDCD10, TBC1D14, RAC1, RAB11FIP2, PAK2, MEF2A, SMAD1, SMAD3, CDKN2A,

		BCL11A, RCC2, PLK1, STAT3, ATP2B4, AXIN2, YWHAZ, RHOA, CCNA2, CYLD, IBTK, DLG4, TRAF3, RHOJ, CALM3
7	RNA binding	DMGDH, DDX3Y, YWHAE, RBM28, SMG1, CELF1, IFIT5, MSI2, NR3C1, IFIT1, PHF6, YBX3, BZW1, OASL, RPL7, MECP2, CASP7, ZFP36, CDH2, PAPOLA, METTL16, MORC3, RBFOX2, ANXA2, NSUN5, SCAF11, STRBP, FNDC3B, YWHAZ, DHX40, DNAJC2, XRN1, RPL7L1, CLNS1A, PPIA, LUC7L2, DDX6, NUFIP2, STAU1, SRSF1, MAZ, NOLC1, CSTF2T, RTN4, FXR1, GANAB, BCLAF1, ZMAT3, FAM120A, SMN1, MBNL3, EXOSC2, ABCF1, HNRNPA3, CHTOP, PNPT1, TAF15, CDKN2A, RCC2, RDX, MYO5A, NAP1L1, RSRC2, SUPT5H, LSM4, MEX3C, PRRC2B, SMARCA4, TNRC6C, CNOT4, MOV10, GNL3L, CMSS1, PHF5A, NOVA1, FUBP1, SERBP1, ZNF74, PDCD4, SPATS2L, RBM42, ZNF579, CPEB2, TRIM32, TPT1, EIF4G2, EIF3A, HSPA1B, CPEB4, TNRC6B, HSPA1A
8	ATP binding	DDX3Y, ALK, GSK3B, SMG1, TRIO, MCM8, CHD9, UBE2D2, CHD8, UBE2D3, KIF14, IGF1R, MYLK, SMCHD1, KIF5B, PAPOLA, IKBKE, PDK1, ABCC4, CCT2, ACTR2, EPHA4, PRKCI, APAF1, PDPK1, PRKCE, HUNK, ACSL4, WRNIP1, NAV2, KIF22, DHX40, OBSCN, PIK3CA, MSH2, PCCA, OAS2, RAD54L2, RAF1, MET, SLC27A2, CFTR, PI4K2A, STK40, SLFN5, DDX6, HSPA4L, GMPS, NOLC1, UBE2J2, HSPA13, EGFR, AURKA, ORC4, MAPK9, SPAST, IRAK1, ERBB4, MKNK2, MAPK1, IP6K1, TRPM6, PAK2, ABCF1, MAP3K3, UBE2H, GK, CSNK1A1, PLK1, HSPA6, ATP2B4, MYO5A, UBE2G1, MAPK14, MLH1, MYO19, SMARCA4, MYO1E, UBE2W, MOV10, WEE1, UCK2, CDK5, DNAJA2, WNK3, CDK2, AAK1, UBA3, UBA2, KRAS, HSPA1B, BMPR1A, HSPA1A

**Anexo XI. Vías moleculares de los miRNAs.**

miRNA	VIAS MOLECULARES			
	DAVID (KEGG Pathways)	<i>P value</i>	mirPath	<i>P value</i>
miR-4521	Cellular senescence	0.035206912	Mucin type O-Glycan biosynthesis Glioma One carbon pool by folate Lysine degradation Non-small cell lung cancer Terpenoid backbone biosynthesis Pancreatic cancer Melanoma Chronic myeloid leukemia	1.26E-09 0.0015212 0.02470283 0.04787567 0.04787567 0.04856354 0.04856354 0.04856354 0.04856354
miR-3142	Phosphatidylinositol signaling system Long-term potentiation Renin secretion	0.008763185 0.094232062 0.096914595		
miR-32-5p	Viral carcinogenesis Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells Human papillomavirus infection Pathways in cancer	0.009257159 0.020417459 0.04515967 0.062928018	FoxO signaling pathway Regulation of actin cytoskeleton  ErbB signaling pathway Cell cycle Chronic myeloid leukemia Bacterial invasion of epithelial cells Longevity regulating pathway Colorectal cancer Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells Autophagy - animal	0.00147819 0.00147819  0.00216568 0.00216568 0.00244613 0.00244613 0.00352441 0.00479022 0.00479022 0.00483901
miR-147b-5p	Butanoate metabolism Metabolic pathways Measles	0.006099613 0.031165357 4.95103E-07	Adherens junction Toll-like receptor signaling pathway	0.02298771 0.00555195



miR-146a-5p	Hepatitis B	1.45475E-06	Leishmaniasis	0.00697676
	Toll-like receptor signaling pathway	2.13676E-06	NF-kappa B signaling pathway	0.00937455
	Epstein-Barr virus infection	6.27651E-06	ErbB signaling pathway	0.02669604
	Pathways in cancer	1.12502E-05	Cell cycle	0.03348779
	Toxoplasmosis	4.38192E-05	Measles	0.04774071
	Human immunodeficiency virus 1 infection	9.78509E-05	One carbon pool by folate	0.04988457
	Leishmaniasis	0.000159027	Toll-like receptor signaling pathway	0.00555195
	Coronavirus disease - COVID-19	0.000180026	Leishmaniasis	0.00697676
	Hepatitis C	0.000240342	NF-kappa B signaling pathway	0.00937455
miR-1178-3p	Proteoglycans in cancer	0.001210771		
	Lipid and atherosclerosis	0.001496246		
	Toxoplasmosis	0.002173348		
	Measles	0.004111927		
	MAPK signaling pathway	0.004926383		
	Hepatitis B	0.006413022		
	Acute myeloid leukemia	0.011142103		
	Prolactin signaling pathway	0.012102735		
	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	0.018985246		
Th17 cell differentiation	0.026698542			
miR-4540	Class I peroxisomal membrane protein import			0.026726838
	Translocation of SLC2A4 (GLUT4) to the plasma membrane			0.093129494
*Análisis mediante DAVID (Reactome)				
miR-4668-5p	Hippo signaling pathway	0.000193927		
	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.001509486		
	Insulin resistance	0.006377478		
	AMPK signaling pathway	0.008698085		
	Breast cancer	0.014670292		
	Endometrial cancer	0.01798706		

	Hepatocellular carcinoma	0.021169026		
	Wnt signaling pathway	0.022495866		
	PPAR signaling pathway	0.02887974		
	Transcriptional misregulation in cancer	0.029412105		
miR-132-3p	ErbB signaling pathway	9.01512E-05	FoxO signaling pathway	0.00134
	Non-small cell lung cancer	0.000391674	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	0.00138
	Bladder cancer	0.000401471	Salmonella infection	0.00572
	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	0.001023292	Neurotrophin signaling pathway	0.00614
	GnRH signaling pathway	0.001186153	Mannose type O-glycan biosynthesis	0.00877
	Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.001499245	Autophagy - animal	0.0108
	Endometrial cancer	0.001605552	Colorectal cancer	0.0152
	Oxytocin signaling pathway	0.002031319	Apoptosis - multiple species	0.0153
	Cushing syndrome	0.002098897	Hepatitis B	0.0206
	Cellular senescence	0.002239151	mTOR signaling pathway	0.0206
miR-155-5p	Hepatitis C	3.31E-06	Colorectal cancer	5.7577E-08
	Pathways in cancer	1.21E-05	Pathways in cancer	7.90137E-07
	Apoptosis	3.63E-05	Hepatocellular carcinoma	1.1922E-06
	Colorectal cancer	4.47E-05	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	2.37738E-06
	Pancreatic cancer	4.43E-05	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3.85926E-06
	Ubiquitin mediated proteolysis	4.62E-05	Gastric cancer	6.24026E-06
	Prolactin signaling pathway	2.03E-05	Pancreatic cancer	7.53152E-06
	Hepatitis B	0.000133098	Human cytomegalovirus infection	1.17957E-05
	Viral carcinogenesis	0.000125025	Endocrine resistance	1.21619E-05
	Hippo signaling pathway	0.000123093	Hepatitis C	1.22613E-05
miR-125b-1-3p	Focal adhesion	8.739E-06		
	Endocytosis	2.1243E-05		
	Cellular senescence	2.3029E-05		

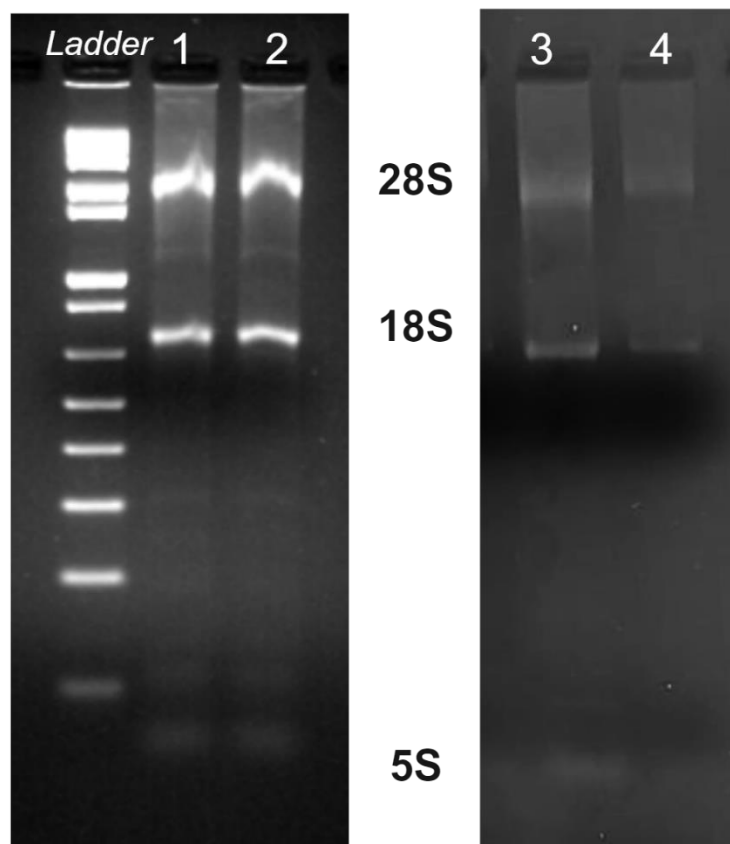
Chronic myeloid leukemia	2.459E-05	
Adherens junction	5.6383E-05	
Polycomb repressive complex	8.2333E-05	
Cell cycle	0.00015355	
Insulin signaling pathway	0.00015827	
Ubiquitin mediated proteolysis	0.00026559	
Alzheimer disease	0.00041784	
* Se consideró TarBase $\cap$ miRWalk para el análisis en DAVID		

### Anexo XII. Cuantificación y pureza de la extracción de RNA de células de rata

N	Muestra	Cuantificación	Relación	
			260/280	260/230
1	Tg A	485.5	1.77	2.25
2	Tg B	578.4	1.96	2.25
3	WT A	1080.6	1.99	2.20
4	WT B	1055.9	2.06	1.52

Tg: Rata transgénica TgF344-AD (14 m), WT: Rata *wild type* (6 m).

### Anexo XIII. Geles de integridad de RNA para células de rata.



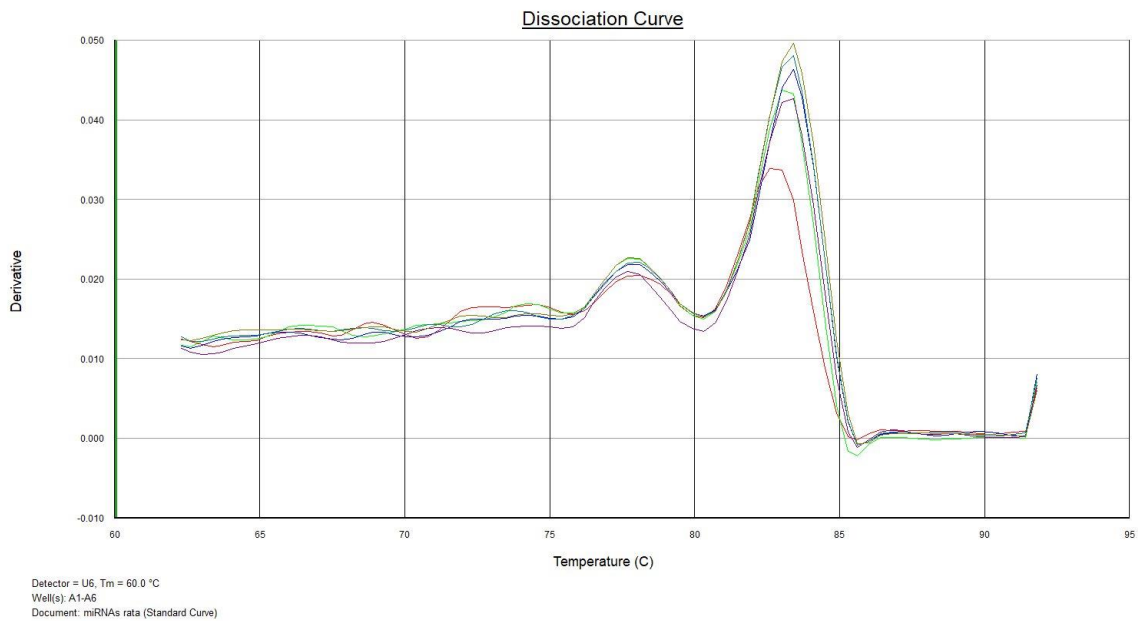
Gel de agarosa desnaturalizante 3%. *Ladder* 1kb DNA Ladder New England Biolabs

**Anexo XIV. Relative Fold Change de los miRNAs en ratas**

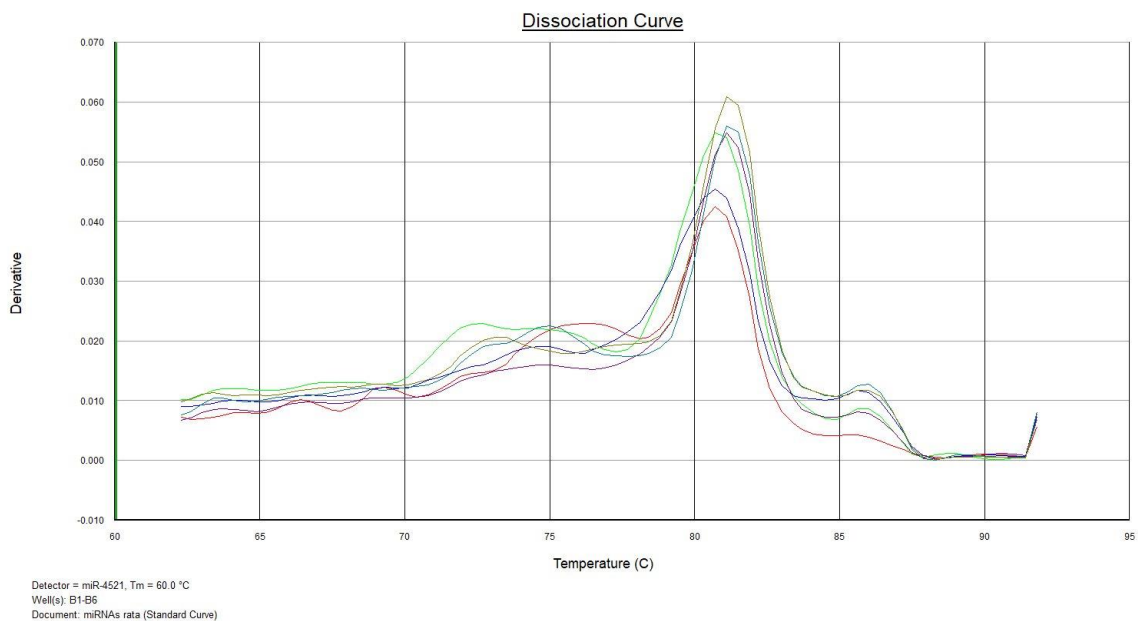
miRNA	WT			TgF344-AD			<i>p-value</i>
	2 <sup>-ΔΔCt</sup>	SD	N	2 <sup>-ΔΔCt</sup>	SD	N	
<b>miR-4521</b>	1	0.27	2	2.13	0.14	2	0.0344
<b>miR-32</b>	1	0.16	2	2.68	0.09	2	0.006
<b>miR-3142</b>	1	0.18	2	2.41	0.53	2	ns
<b>miR-147b</b>	1	0.23	2	1.52	0.14	3	0.0475
<b>miR-146a</b>	1	0.24	2	42.85	0.19	3	<0.0001
<b>miR-130b</b>	1	0.09	2	0.50	0.22	2	ns
<b>miR-1178</b>	1	0.23	2	7.22	0.70	2	0.0069
<b>miR-4668</b>	1	0.01	2	2.04	0.04	2	0.0008
<b>miR-4540</b>	1	0.00	2	186.84	0.17	2	<0.0001
<b>miR-132</b>	1	0.80	2	2.05	0.13	3	<0.0001
<b>miR-155</b>	1	1.11	2	8.49	0.18	3	0.0011
<b>miR-125b1</b>	1	0.87	2	17.76	0.23	2	ns
<b>miR-9</b>	1	0.01	2	5.34	0.08	4	<0.0001

## Anexo XV. Curvas de disociación de qPCR de células de rata

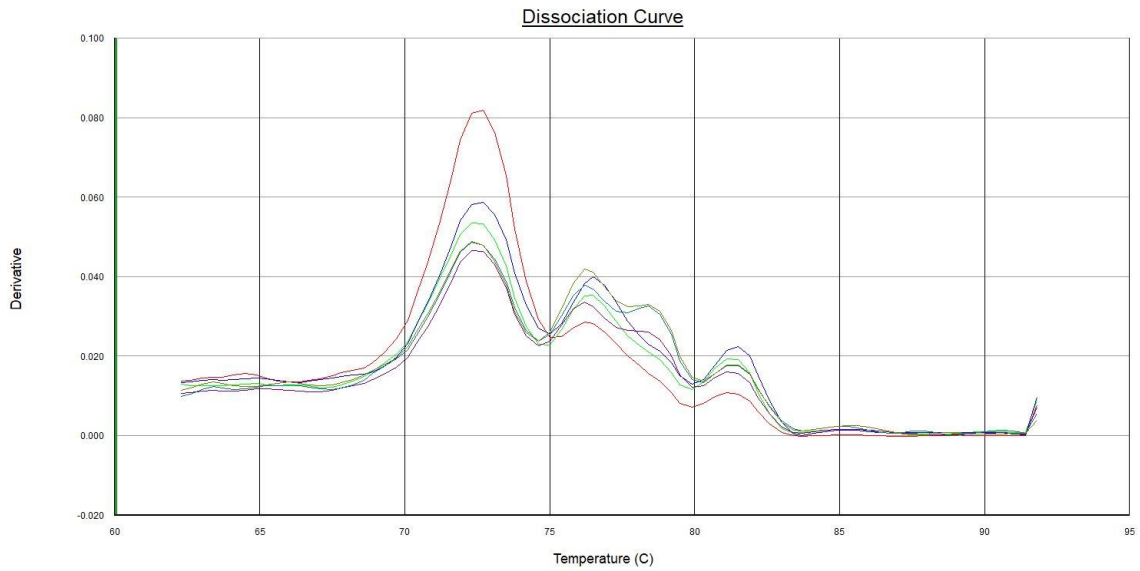
### U6



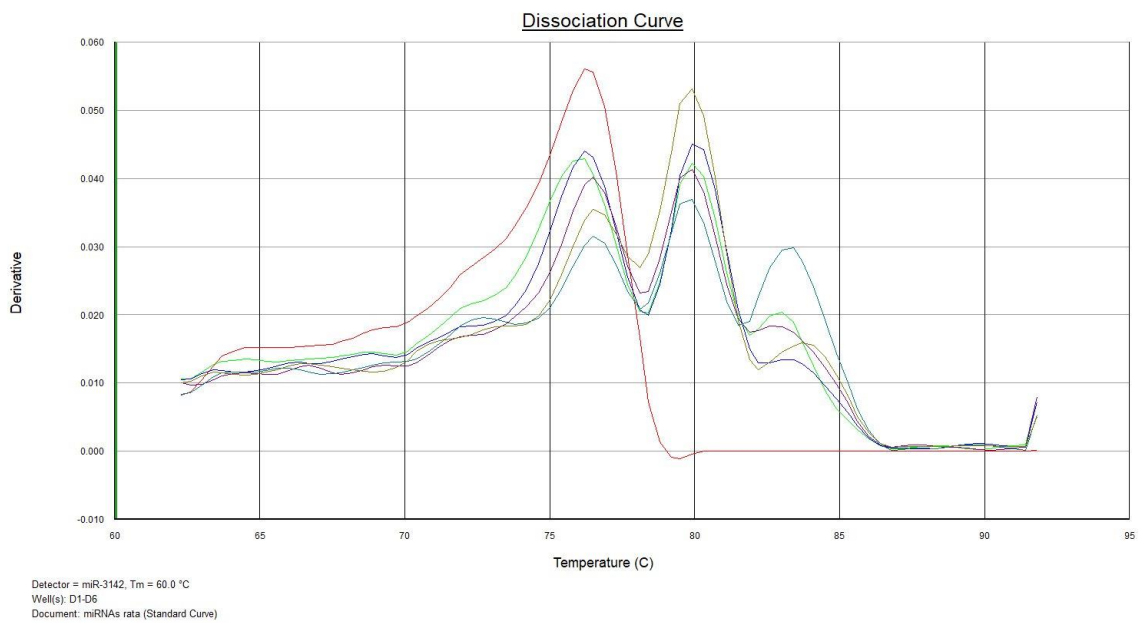
### miR-4521



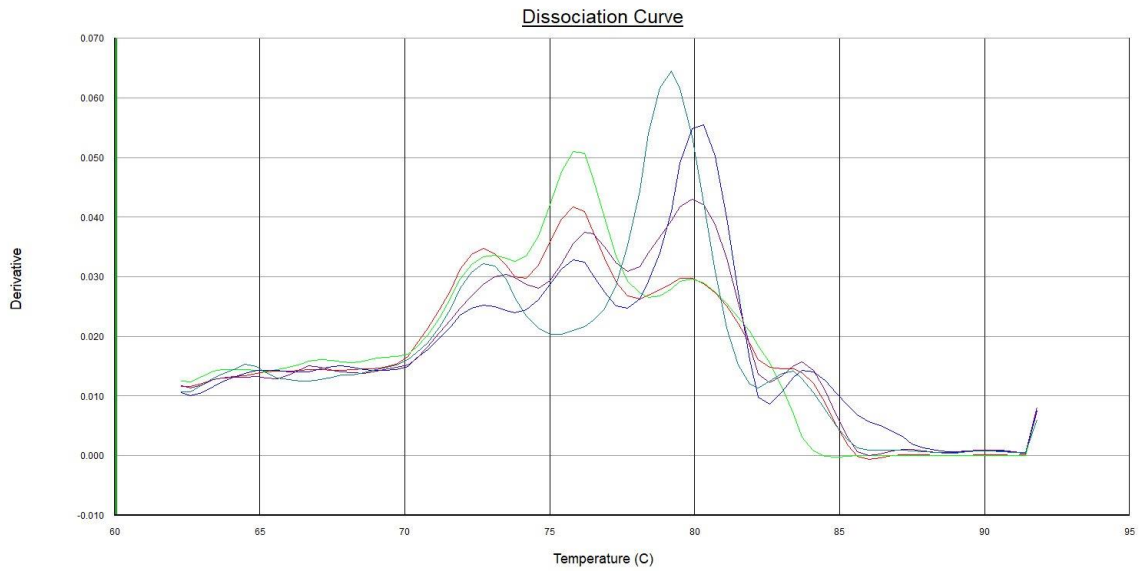
## miR-32



## miR-3142

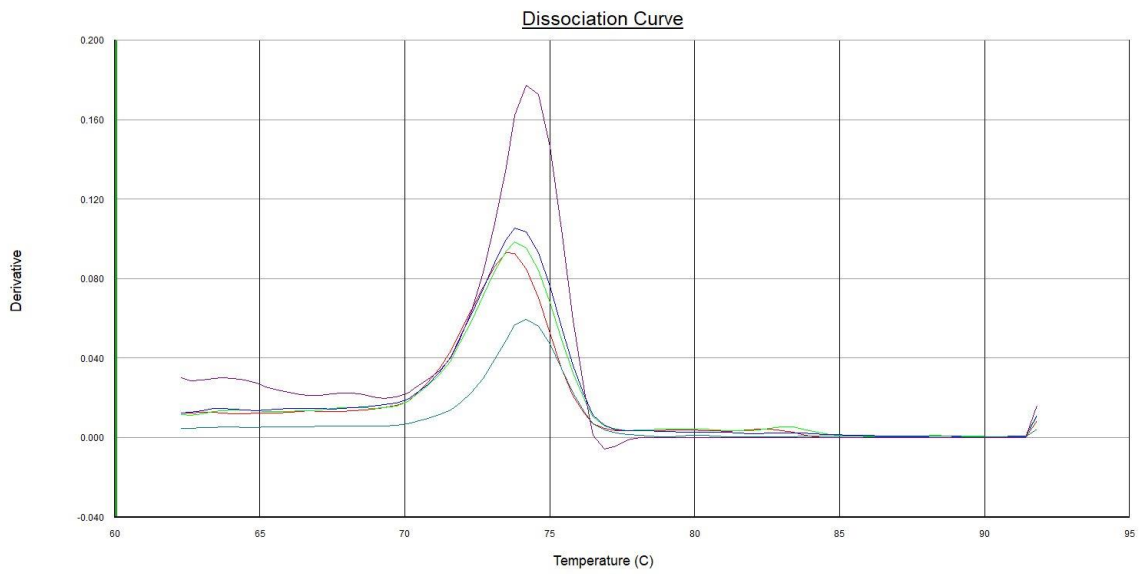


## miR-147b



Detector = miR-147b-5p, Tm = 60.0 °C  
Well(s): E1-E5  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

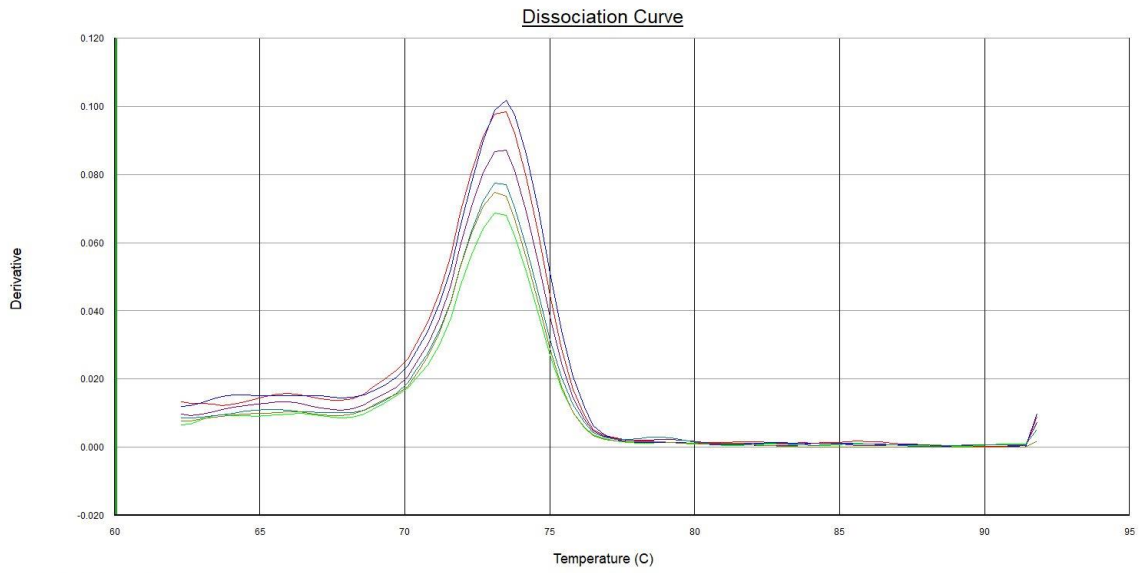
## miR-146a



Detector = miR-146a, Tm = 60.0 °C  
Well(s): F1-F5  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

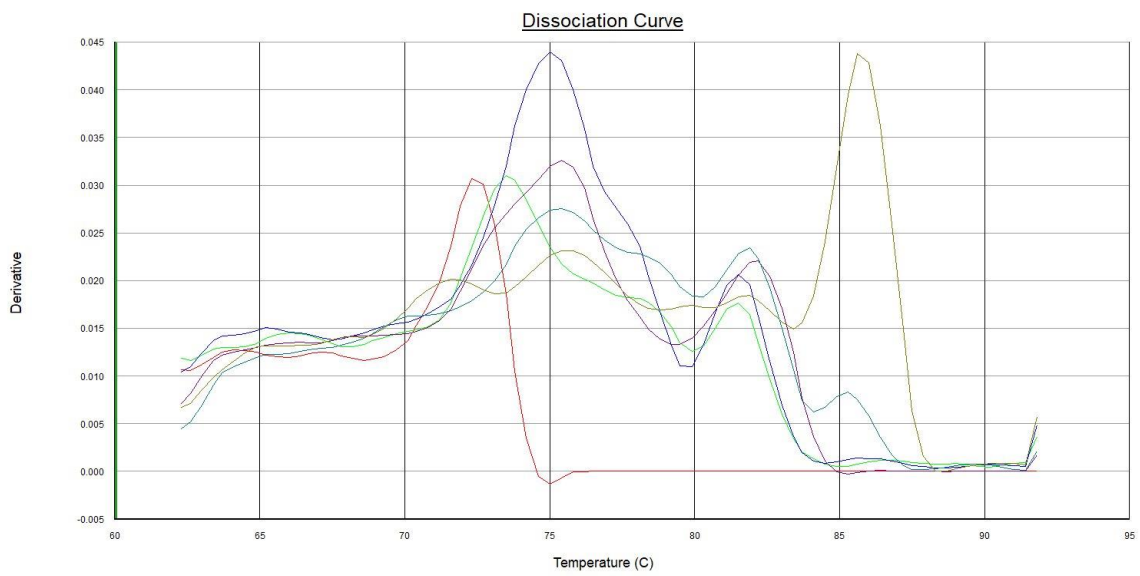


## miR-130b



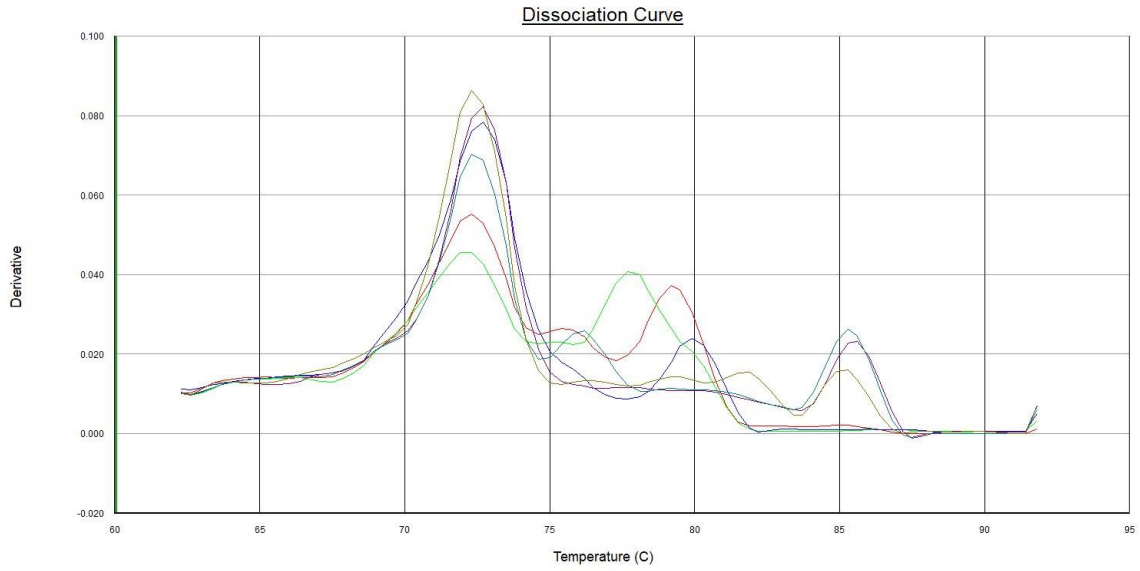
Detector = miR-130-5p, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A1-A6,B1-B6,C1-C6,D1-D6,E1-E6,F1-F6,G1-G6,H1-H6  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

## miR-1178



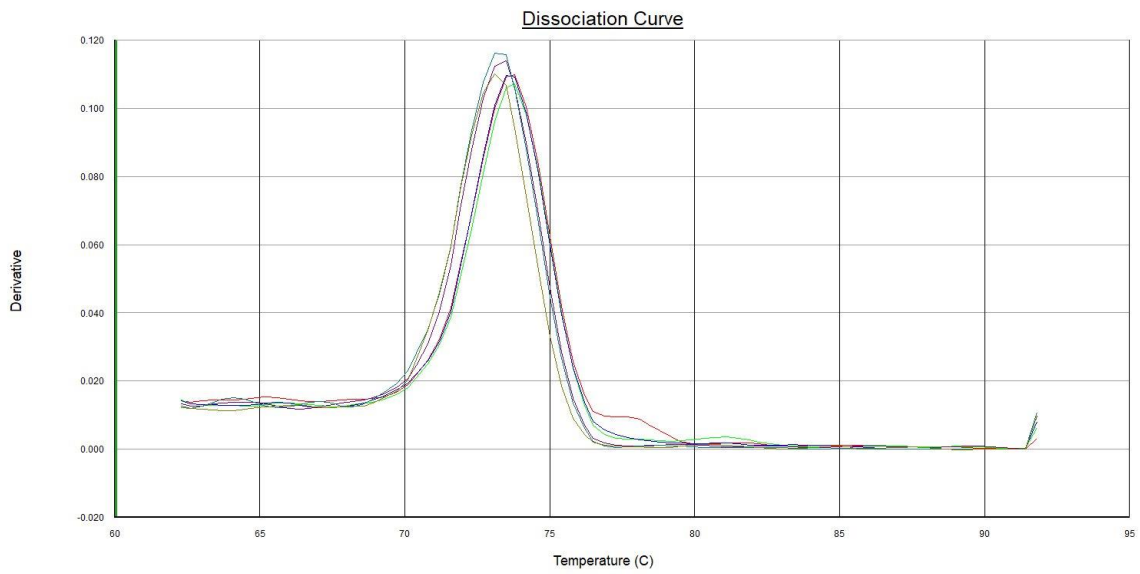
Detector = miR-1178, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A1-A6,B1-B6,C1-C6,D1-D6,E1-E6,F1-F6,G1-G6,H1-H6  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

# miR-4668



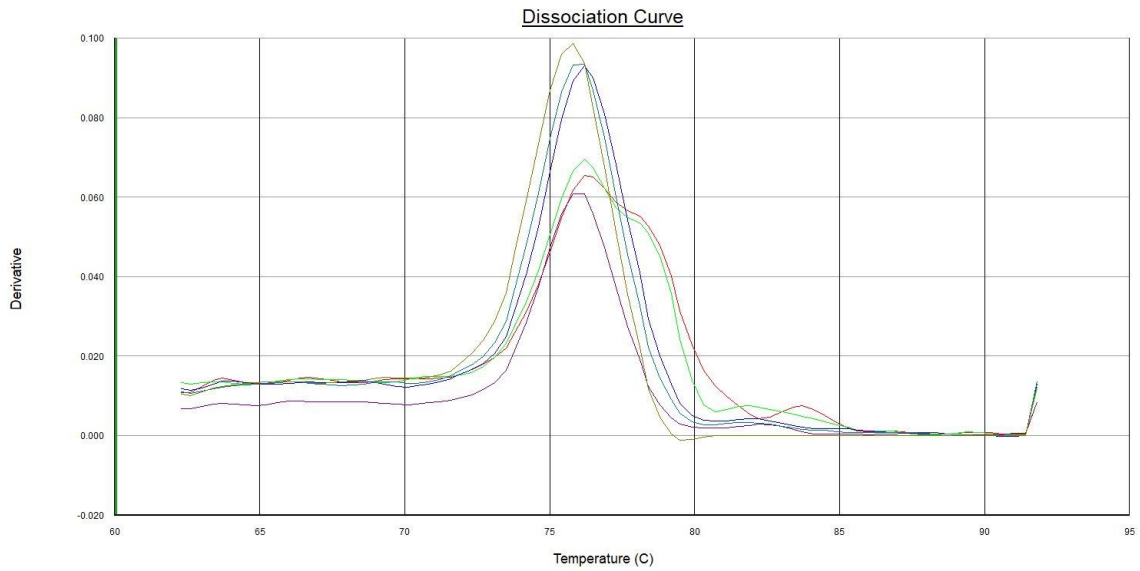
Detector = miR-4668, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A7-A12,B7-B12,C7-C12,D7-D12,E7-E12,F7-F12  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

# miR-4540



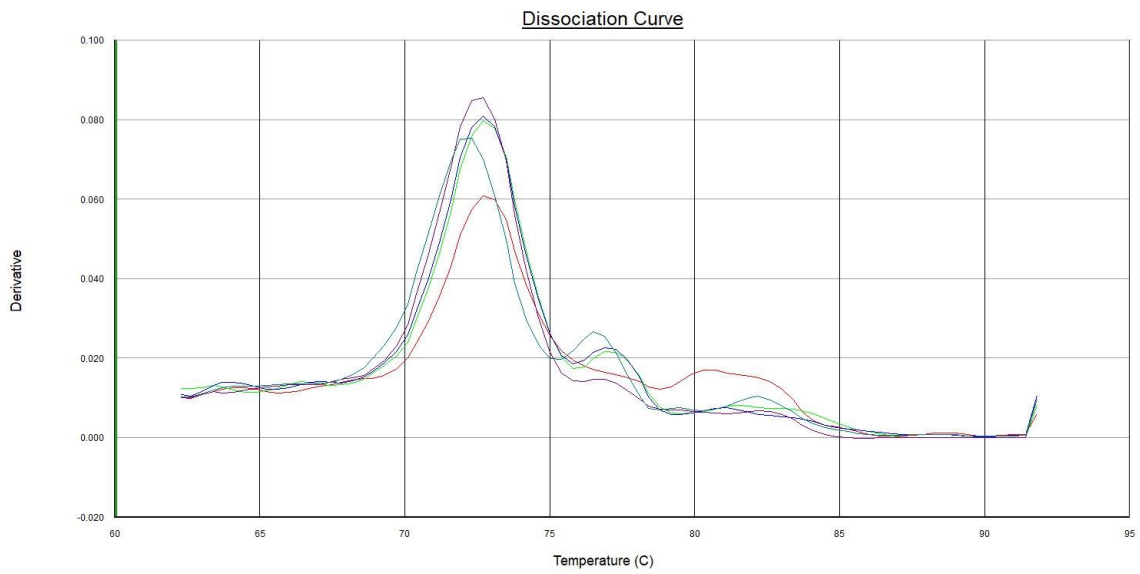
Detector = miR-4540, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A7-A12,B7-B12,C7-C12,D7-D12,E7-E12,F7-F12  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

## miR-132



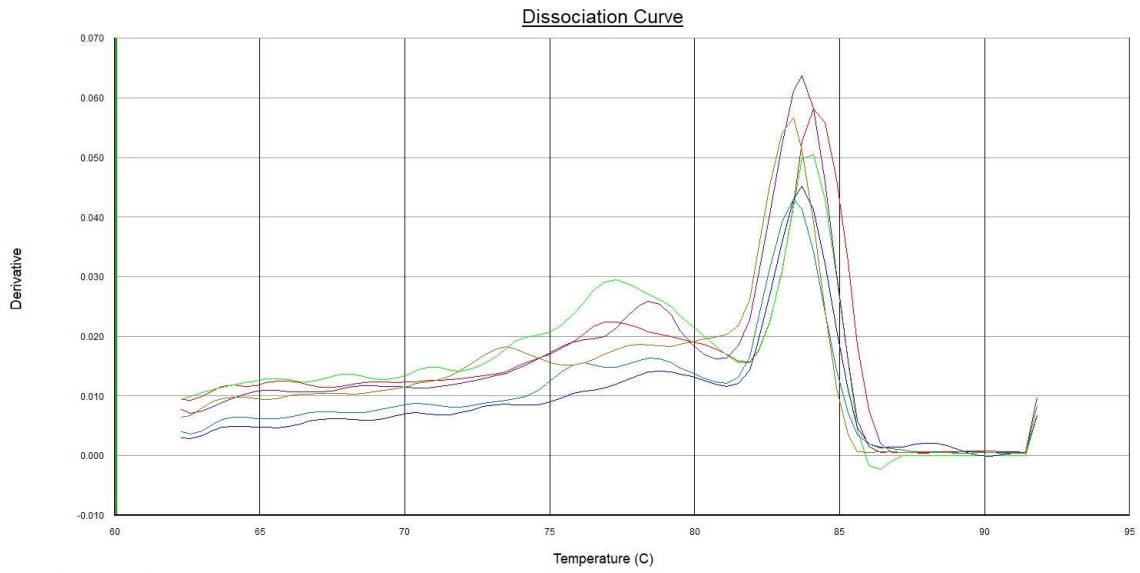
Detector = miR-132, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A7-A12,B7-B12,C7-C12,D7-D12,E7-E12,F7-F12  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

## miR-155



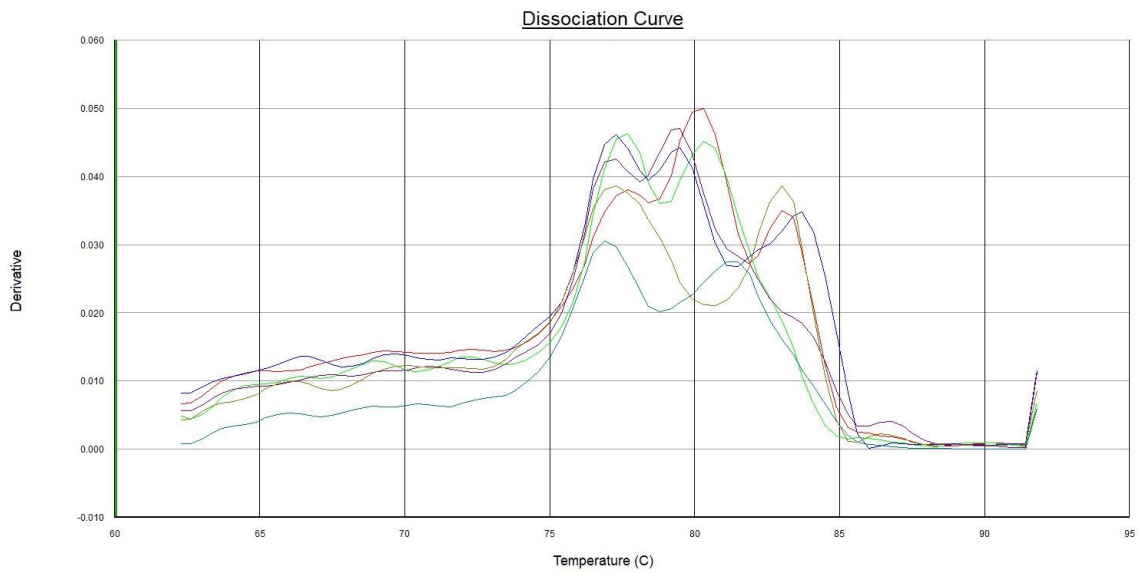
Detector = miR-155, Tm = 60.0 °C  
Well(s): D8-D12  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

# miR-125b-1



Detector = miR-125b-1, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A7-A12,B7-B12,C7-C12,D7-D12,E7-E12,F7-F12  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

# miR-9



Detector = miR-9, Tm = 60.0 °C  
Well(s): A7-A12,B7-B12,C7-C12,D7-D12,E7-E12,F7-F12  
Document: miRNAs rata (Standard Curve)

# Anexo XVI. KEGG Pathways- Alzheimer's Disease.

