



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biología Gradua / Grado en Biología

Variantes genéticas en miRNAs implicadas en la susceptibilidad a desarrollar Alzheimer

Egilea/Autor/a:
Alba Rodríguez Salvador

Zuzendariak/Director(e/a)s:
Dra. África García-Orad Carles
Dra. Idoia Martín Guerrero

© 2017, Alba Rodríguez Salvador

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
1. ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. LA ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER (AD)	4
2.1.1. Aspectos patológicos	4
2.1.2. Tipos de Alzheimer	4
2.2. GENÉTICA Y ALZHEIMER	5
2.2.1. EOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o precoz)	5
2.2.2. LOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío)	5
2.3. VARIANTES GENÉTICAS Y SUSCEPTIBILIDAD A LOAD	5
2.3.1. GWAS y LOAD	6
2.3.2. MICRO-RNAS y LOAD	8
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
3.1. HIPÓTESIS	9
3.2. OBJETIVOS	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Búsqueda sistemática	10
4.2. Selección de la muestra	10
4.3. Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs	10
4.4. Genotipado de los polimorfismos	10
4.5. Análisis estadístico	11
4.6. Análisis bioinformático	11
4.6.1. Predicción de la estructura secundaria de los miRNAs	11
5. RESULTADOS	12
5.1. BÚSQUEDA SISTEMÁTICA	12
5.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL	12
5.2.1. Características de la muestra	12
5.2.2. Resultados del genotipado	13
5.2.3. Asociación de miR-SNPs en la susceptibilidad a desarrollar LOAD	13
5.2.4. Análisis bioinformático de la estructura secundaria de los miRNAs	15
6. DISCUSIÓN	17
7. CONCLUSIÓN	20
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	20
9. BIBLIOGRAFÍA	21
9.1 Citas bibliográficas	21
9.2. Referencias online	24

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la forma más común de demencia. Se estima que en el año 2050, 1 de cada 85 personas se verá afectada por esta patología. Se clasifica en dos tipos: EOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano), cuyo componente genético es conocido pero poco frecuente y LOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío), cuyo componente genético no se ha descrito hasta la fecha y que supone la mayor parte de los casos.

Recientemente, se ha observado que un gran número de miRNAs están implicados en LOAD. Se ha sugerido que la presencia de variantes genéticas de baja penetrancia entre las que se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) dentro del miRNA podrían explicar el origen de la desregulación en los niveles de expresión del mismo.

La **hipótesis** del presente estudio es que variantes genéticas en los miRNAs pueden estar implicadas en la susceptibilidad a desarrollar LOAD.

En este trabajo, se evaluó la correlación entre 213 SNPs en 206 miRNAs y la susceptibilidad a padecer LOAD en 212 pacientes, con el **objetivo** de identificar nuevos marcadores de riesgo para la enfermedad. Se identificaron un total de 16 SNPs en 16 miRNAs asociados al riesgo a padecer LOAD. De los SNPs significativos, se observó que 3 compartían la localización 19q13.42 y otros 3 la localización 14q32.31.

Considerando los resultados obtenidos y la bibliografía consultada se proponen por primera vez como “puntos calientes” o *hot spots* de susceptibilidad a desarrollar LOAD los clústers de miRNAs 19q13.42 y 14q32.31.

En conclusión, las variantes genéticas en los miRNAs, pueden ser consideradas como nuevos marcadores para la susceptibilidad a padecer LOAD y podrían ser útiles para determinar la predisposición genética a desarrollar la enfermedad.

1. ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. It is estimated that in 2050, 1 out of every 85 people will be affected by this pathology. It is classified into two types: EOAD (early-onset Alzheimer's disease), whose genetic component is known but rare and LOAD (late-onset Alzheimer's disease), whose genetic component has not been described to date and is more frequent.

A large number of miRNAs have been observed to be involved in LOAD. It has been suggested that the presence of low penetrance genetic variants such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the miRNA might explain the origin of deregulation in the expression levels of miRNAs.

The **hypothesis** of the present study is that genetic variants in miRNAs may be implicated in susceptibility and LOAD development.

In this paper, we evaluated the correlation between 213 SNPs in 206 miRNAs and the susceptibility to LOAD in 212 patients, with the **aim** of identify new risk markers for the disease. A total of 16 SNPs were found in 16 miRNAs associated with the risk of LOAD. In reference to significant SNPs, it was observed that 3 shared the same location at 19q13.42 and other 3 the location at 14q32.31.

Considering the results obtained and the bibliography consulted, miRNAs clusters 19q13.42 and 14q32.31 are proposed for the first time as hot spots of susceptibility to develop LOAD.

In conclusion, the genetic variants in the miRNAs can be considered as new markers for the susceptibility to LOAD and it can be useful to determine the genetic predisposition to develop the disease.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER (AD)

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la forma más común de demencia en personas de avanzada edad que daña el cerebro y da lugar a deterioro de la memoria, el pensamiento y el comportamiento (Puthiyedth et al, 2016). Se estima que afecta a unos 24 a 35 millones de personas en todo el mundo (Querfurth & La Ferla, 2010) y que en el año 2050, 1 de cada 85 personas se verá afectada por esta patología (Batistela et al, 2016, Brookmeyer et al, 2007).

Por este motivo, la enfermedad de Alzheimer representa un problema en la sociedad actual y el disponer de marcadores de riesgo será de gran utilidad en términos de diagnóstico y tratamiento (Kim et al, 2014).

2.1.1. Aspectos patológicos

La AD se asocia con la atrofia y la muerte de neuronas en regiones específicas del cerebro. Los signos neuropatológicos de la AD son: las placas seniles (NSP o “neuritic senile plaques”) y los ovillos neurofibrilares (NFT o neurofibrillary tangles) (Armstrong, 2011).

Las NSP están constituidas por péptidos β -amiloides ($A\beta$) que se generan a través de la proteólisis secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) mediante secretasas. Los NFT están compuestos por la proteína TAU hiperfosforilada, que se agrega dentro de las neuronas y que posiblemente también se libera de las mismas para propagar la patología a través del cerebro (Ben Halima et al., 2016).

En la actualidad, no existe una estrategia para prevenir o curar la AD, excepto unos pocos medicamentos que pueden mejorar las habilidades cognitivas y de la memoria. Por lo tanto, es extremadamente urgente el estudio de la patogénesis de la AD y el desarrollo de nuevas estrategias para su detección y tratamiento.

2.1.2. Tipos de Alzheimer

La AD se clasifica comúnmente en dos tipos en función de la edad a la que el paciente comience a manifestarla (Blennow et al., 2006). Estos tipos serían: EOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano) y LOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío). Además de por la edad, se distinguen por la variedad de síntomas y signos neurológicos no cognitivos, y por el grado de agresividad de su curso.

2.2. GENÉTICA Y ALZHEIMER

2.2.1. EOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o precoz)

Los análisis genéticos en pacientes que sufren EOAD han identificado mutaciones en determinados genes que tienen como resultado un aumento de la producción y la deposición de β -amiloides lo que conduce al desarrollo de la enfermedad. Los tres principales genes implicados son: (1) el gen APP que codifica la proteína precursora amiloide en el cromosoma 21, (2) el gen presenilina-1 (PSEN1) en el cromosoma 14 y (3) el gen presenilina-2 (PSEN2) en el cromosoma 1 (Kim et al, 2014). El número de mutaciones patógenas encontradas dentro de estos genes se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Genes implicados en EOAD.

Gen (Abreviación)	Locus	Proteína	Mutaciones patógenas
APP	21q21.2	Beta amiloide	25
PSEN1	14q24.3	Preselina-1	185
PSEN2	1q31-q42	Preselina-2	12

2.2.2. LOAD (Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío)

La LOAD es una enfermedad multifactorial, es decir, se origina por la suma de efectos ambientales y genéticos. Se ha sugerido que las influencias ambientales y la susceptibilidad genética individual pueden aumentar la incidencia y acelerar el inicio de la LOAD (Davinelli et al, 2014). Entre los factores no genéticos que influyen en el riesgo a padecer LOAD destaca la edad (Querfurth & LaFerla, 2010). También cabría destacar otros factores de riesgo como: hipertensión, suplementos de estrógeno, tabaquismo, accidente cerebrovascular, enfermedad cardíaca, depresión, artritis y diabetes (Davinelli et al, 2014). Por otro lado, cierto estilo de vida que incluya: ejercicio, alimentación saludable y estimulación intelectual parece disminuir el riesgo a padecer la enfermedad (Wang et al., 2002).

Puesto que los factores genéticos juegan un papel crítico en el riesgo a desarrollar la enfermedad, se está haciendo un gran esfuerzo con el fin de descubrir variantes genéticas que confieren susceptibilidad a desarrollar LOAD.

2.3. VARIANTES GENÉTICAS Y SUSCEPTIBILIDAD A LOAD

Diversos estudios han sugerido que la susceptibilidad a desarrollar LOAD se debe a pequeñas variantes comunes de baja penetrancia, es decir, variantes en genes que por sí solas contribuyen de forma débil al desarrollo de la enfermedad (Lau et al., 2013), por lo que es necesario la suma de pequeños efectos para conferir la susceptibilidad a la enfermedad. Una de las variantes genéticas comunes más frecuentes en el genoma son los cambios de un único nucleótido (SNPs) (**Figura 1**). Los SNPs están distribuidos a lo largo de todo el genoma tanto en regiones génicas como en regiones intergénicas. Se estima que en el genoma hay 15 millones de SNPs (Consortium 2010),

distribuidos con una frecuencia media de 1/300 pares de bases (pb), constituyendo el 90 % de la variación del genoma humano.

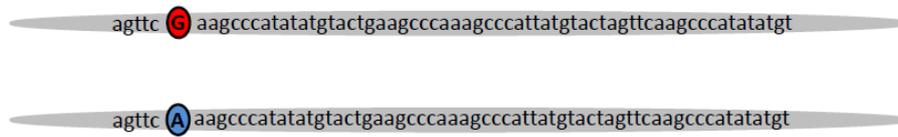


Figura 1. Ejemplo de un SNP. Dos cromosomas de un individuo con el genotipo G/A para el SNP (Bilbao, 2015).

Hasta la fecha no se ha identificado ningún gen causante de la LOAD aunque sí se han encontrado algunos genes en los que la presencia de variantes de riesgo podría ser responsable de un aumento en el riesgo a sufrir la enfermedad. Por ejemplo, el alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (APOE) ha sido reconocido como un importante factor de riesgo genético. También se han detectado variantes de riesgo que provocan un aumento en los depósitos fibrilares formados por TAU fosforilado, los cuales son una característica patológica clave en LOAD (Kim et al, 2014).

2.3.1. GWAS y LOAD

Los estudios de asociación genómica (GWAS) permiten observar variaciones genéticas del genoma humano utilizando tecnología de genotipado de alta resolución capaz de analizar millones de marcadores genéticos por paciente. Por lo tanto, evita la posibilidad de perder la identificación de importantes variantes en genes que no habían sido estudiados hasta ahora. Esto es posible debido a la disponibilidad de tagSNPs. Los tagSNPs (**Figura 2**) son SNPs capaces de etiquetar bloques de variantes, por lo que reduce el gasto y el tiempo de mapeo de las áreas del genoma asociadas con la enfermedad, ya que elimina la necesidad de estudiar cada SNP de manera individual (Moriyama et al., 2015).

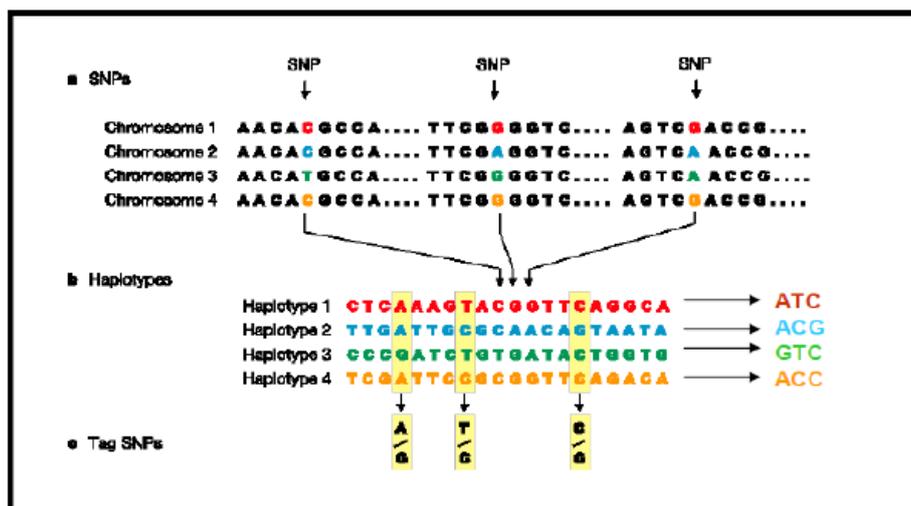


Figura 2: Ejemplo de tagSNP a) SNPs identificados en muestras de ADN de múltiples individuos. b) Los SNP adyacentes que se heredan juntos se compilan en "haplotipos". c) Detección de SNP "Tag" dentro de haplotipos que identifican únicamente aquellos haplotipos compilados. Mediante el genotipado de los tres SNP marcadores mostrados en esta figura, se puede identificar cuáles de los cuatro haplotipos mostrados aquí están presentes en cada individuo (Gutiérrez, 2016).

La mayoría de los estudios GWAS realizados hasta el momento en LOAD se han centrado en la búsqueda de variantes genéticas en regiones codificantes. Por ejemplo, una variante genética asociada al riesgo de padecer LOAD se encuentra en la región codificante del gen de la apolipoproteína E (ApoE) (Harold et al., 2009). Además, GWAS recientes también han identificado variaciones en más de 20 *loci* que contribuyen al riesgo de LOAD. En la **Tabla 2** se muestran los resultados de un estudio de asociación genómica (GWAS).

Tabla 2: Principales variantes asociadas con LOAD (Nicolas et al., 2016).

SNP	Gen	Localización	OR (95% CI)	P-valor	Ruta
rs11218343	SORL1	Intrónica	1.30 (1.22–1.39)	9.7×10^{-15}	Reciclaje APP, secreción A β
rs6733839	BIN1	Intergénica	1.22 (1.18–1.25)	6.9×10^{-44}	Tráfico APP y toxicidad Tau
rs6656401	CR1	Intrónica	1.18 (1.14–1.22)	5.7×10^{-24}	Degradación A β
rs9331896	CLU	Intrónica	1.16 (1.12–1.19)	2.8×10^{-25}	Degradación y agregación A β
rs10792832	PICALM	Intergénica	1.15 (1.12–1.18)	9.3×10^{-26}	Tráfico APP y degradación A β
rs4147929	ABCA7	Intrónica	1.15 (1.11–1.19)	1.1×10^{-15}	Tráfico APP y degradación A β
rs17125944	FERMT2	Intrónica	1.14 (1.09–1.19)	7.9×10^{-9}	Toxicidad Tau
rs7274581	CASS4	Intrónica	1.14 (1.09–1.19)	2.5×10^{-8}	–
rs983392	MS4A6A	Intergénica	1.11 (1.08–1.15)	6.1×10^{-16}	–
rs11771145	EPHA1	Intergénica	1.11 (1.08–1.15)	1.1×10^{-13}	–
rs9271192	HLA-DRB5	Intergénica	1.11 (1.08–1.15)	2.9×10^{-12}	–
rs28834970	PTK2B	Intrónica	1.10 (1.08–1.13)	7.4×10^{-14}	–
rs10948363	CD2AP	Intrónica	1.10 (1.07–1.13)	5.2×10^{-11}	Degradación A β y protección toxicidad Tau
rs1476679	ZCWPW1	Intrónica	1.10 (1.07–1.13)	5.6×10^{-10}	–
rs10498633	SLC24A4/RIN3	Intrónica	1.10 (1.07–1.13)	5.5×10^{-9}	–
rs2718058	NME8	Intergénica	1.08 (1.05–1.11)	4.8×10^{-9}	–
rs35349669	INPP5D	Intrónica	1.08 (1.05–1.11)	3.2×10^{-8}	–
rs190982	MEF2C	Intergénica	1.08 (1.05–1.11)	3.2×10^{-8}	–
rs10838725	CELF1	Intrónica	1.08 (1.05–1.11)	1.1×10^{-8}	–

Abreviaturas: OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza

Es interesante destacar que cuando se realiza un estudio en profundidad de la localización exacta de las variantes más estudiadas, aparece que no se encuentran en genes sino en regiones intergénicas. En esta línea, el Proyecto del Genoma Humano (HGP) reveló en 2001 que las regiones codificantes apenas representan el ~ 2% de todo el genoma (Sana et al., 2012).

Posteriormente, el proyecto ENCODE (Encyclopedia Of DNA Elements) concluyó que alrededor del 80% de nuestro genoma se transcribe como elementos que no codifican proteínas. Inicialmente fue considerado "DNA basura", sin embargo se determinó que una gran parte de las regiones codificantes no proteicas eran funcionales. Estos elementos son RNA no codificantes (ncRNA), los cuales se clasifican en función de su longitud (Consortium, 2012). Dentro de los ncRNAs, los microRNAs (miRNAs) son los más estudiados y se sabe que regulan más del 50% de nuestros genes (Sana et al., 2012).

2.3.2. MICRO-RNAS y LOAD

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de pequeños RNAs endógenos no codificantes que participan en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional por la inhibición de la transcripción o la degradación del mRNA. Los miRNA se transcriben inicialmente como pri-miRNA con una caperuza en 5' y una cola de poli-adeninas (poly-A) en 3' y se procesan en el núcleo celular por la ribonucleasa DHROSA obteniendo una estructura corta de 70 nucleótidos en forma de tallo-lazo (stem-loop) conocida como pre-miRNA, la cual se transporta al citoplasma. Estos pre-miRNA son luego procesados a miRNA maduros en el citoplasma mediante la interacción con la ribonucleasa DICER, que también inicia la formación del complejo RISC (RNA-induced silencing complex). Este complejo es el responsable del silenciamiento de genes que se observa debido a la expresión de los miRNA (**Figura 3**).

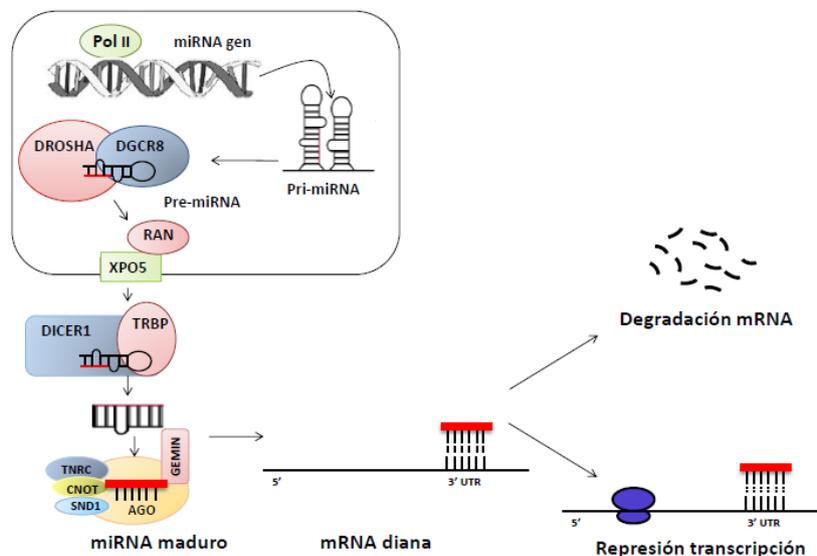


Figura 3: Biogénesis y mecanismo de acción de miRNAs (Gutiérrez, 2016).

Cada vez es mayor la evidencia de que los microRNAs (miRNAs) están implicados en la patogénesis de la LOAD (Liu et al., 2016, Zhang et al, 2016). Diversos estudios han demostrado que los niveles de expresión de miRNAs están desregulados en el cerebro de pacientes con LOAD en comparación con los controles sanos (Lau et al., 2014, Maciotta et al., 2013). Para explicar el origen de la desregulación en los niveles de expresión de miRNA se sugirió la presencia de SNPs dentro del miRNA precursor (pre-miRNA) o en el miRNA maduro (Sun et al., 2009). SNPs en los miRNA puede afectar a su estructura secundaria y por lo tanto a su función en la regulación génica.

Todavía no ha sido identificado un biomarcador económico, rápido y no invasivo para LOAD. Algunos estudios han llevado a cabo análisis para evaluar la especificidad y la sensibilidad de miRNAs en la susceptibilidad a desarrollar LOAD y en ellos se ha observado una desregulación de miRNAs en los pacientes con la enfermedad. Es por este motivo por lo que variantes genéticas en miRNAs podrían convertirse en biomarcadores potenciales para la evaluación de LOAD (Kim et al., 2014).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

En relación con lo anterior y considerando que:

- (1) No se han encontrado mutaciones causales en LOAD.
- (2) Las variantes de riesgo asociadas a LOAD se encuentran en regiones no codificantes o intergénicas.
- (3) Los ARN no codificantes representan una parte importante del genoma y regulan la expresión de genes que pueden estar implicados en LOAD.
- (4) Los niveles de expresión de miRNAs se encuentran desregulados en la LOAD y, por tanto, podrían estar implicados en el riesgo a desarrollar la enfermedad.
- (5) La desregulación de miRNAs puede ser debido a la presencia de SNPs en los miRNAs.

La **hipótesis** de este trabajo es que las **variantes genéticas en los miRNAs pueden estar implicadas en la susceptibilidad a desarrollar LOAD.**

3.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es detectar variantes genéticas en miRNAs asociados a aumentar el riesgo de padecer LOAD. Con este fin, los objetivos específicos del proyecto son los siguientes:

1. Llevar a cabo una revisión sistemática.
2. Recolectar una amplia muestra de pacientes que padecen LOAD.
3. Seleccionar todos los SNPs en pre-miRNAs descritos en las bases de datos con un MAF (Frecuencia Alélica Mínima) superior a 0,01.

4. Determinar el genotipo de los pacientes.
5. Definir la asociación de dichos SNPs con la susceptibilidad a padecer LOAD mediante un estudio caso-control.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Búsqueda sistemática

Se realizó una búsqueda sistemática para identificar miRNAs desregulados en LOAD mediante la base de datos Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Se utilizaron las palabras claves “(mir OR microrna OR miRNA) AND alzheimer”. Los artículos obtenidos en la búsqueda fueron revisados uno a uno y se seleccionaron aquellos que estudiaban la expresión de miRNAs en pacientes con LOAD mediante estudios de caso-control. Los artículos descartados se clasificaron en función de su motivo de exclusión: no ser estudios caso-control, no estar en inglés, estudiar otras enfermedades, no estudiar la desregulación de miRNAs, no ser estudios realizados en humanos, revisiones y/o metanálisis.

4.2. Selección de la muestra

La muestra tuvo un tamaño total de 433 individuos españoles, 212 de los cuales fueron pacientes con LOAD (casos) y 221 eran individuos sanos (controles).

4.3. Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs

Se seleccionaron todos los SNPs en pre-miRNAs que estuvieran descritos en las bases de datos con una MAF superior al 1 % ($MAF \geq 0,01$) en poblaciones europeas/caucásicas hasta mayo de 2014. Se decidió incluir todos los miRNAs, ya que cada miRNA puede regular un amplio rango de genes y por lo tanto cualquiera podría estar implicado en la regulación de los genes que afectan al riesgo de padecer LOAD. La selección de SNPs se realizó utilizando la base de datos miRNA SNIPer (www.integratomics-time.com/miRNA-SNIPer/) y la base de datos dbSNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). En total se incluyeron 213 SNPs en 206 pre-miRNAs.

4.4. Genotipado de los polimorfismos

El DNA (acrónimo del inglés de *Deoxyribonucleic acids*) genómico fue extraído de muestras de sangre periférica de pacientes con LOAD. El DNA fue cuantificado utilizando PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Por cada muestra fueron genotipados 400 ng de DNA utilizando el GoldenGate Genotyping Assay con la tecnología Veracode de acuerdo con el protocolo de Illumina (**Figura 4**). Esta plataforma permite un ensayo múltiple de PCR, lo que significa que es posible procesar un gran número de SNPs de manera simultánea. Para la interpretación de los datos del genotipado, se empleó el software GenomeStudio.

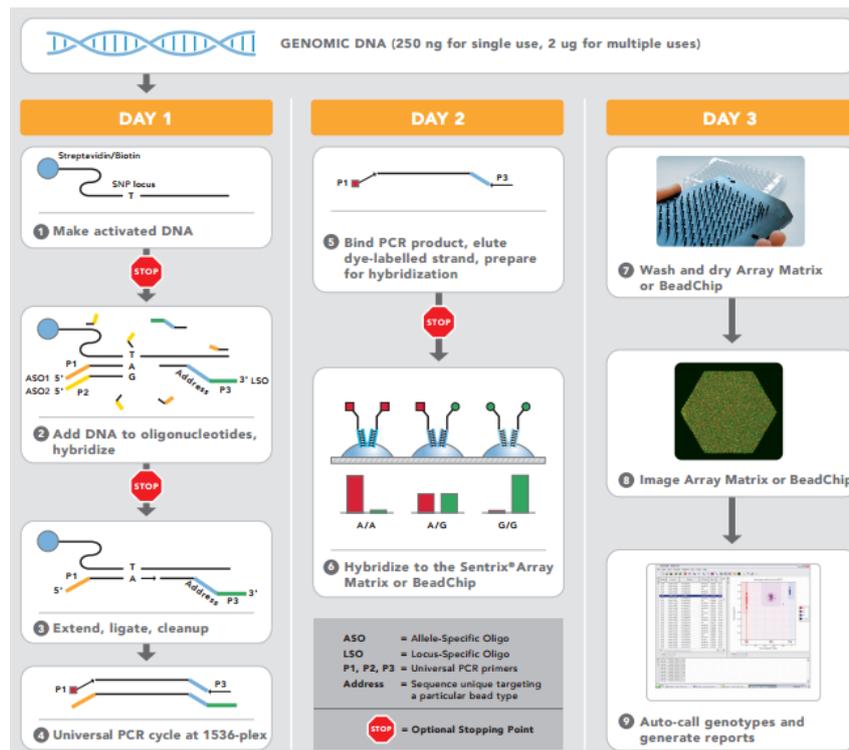


Figura 4: Visión general del ensayo GoldenGate® (<http://www.illumina.com/technology.ilmn>) retrieved: June 12th, 2014).

4.5. Análisis estadístico

Mediante el test de chi-cuadrado (χ^2) o el test exacto de Fisher se evaluó la asociación entre los polimorfismos y el riesgo a padecer LOAD. La medida de asociación del efecto se estimó mediante el odds-ratio (OR) a partir de una regresión logística univariante, con un intervalo de confianza (CI) del 95%. Se seleccionaron los modelos genéticos más significativos entre los test codominante, dominante y recesivo, para determinar la significancia estadística de cada SNP.

Los P-valores menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (versión v.3.2.1). Para identificar cualquier desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) de la población control, se utilizó un test de χ^2 .

4.6. Análisis bioinformático

4.6.1. Predicción de la estructura secundaria de los miRNAs

Se utilizó la base de datos Bioguo (<http://bioguo.org> retrieved: May 20th, 2014) (Release 2.0: July 2013) (Gong et al., 2012) para predecir la estructura secundaria más estable de los miRNAs que mostraban SNPs significativos.

5. RESULTADOS

5.1. BÚSQUEDA SISTEMÁTICA

Se realizó una búsqueda sistemática con el fin de identificar miRNAs desregulados en LOAD. La búsqueda fue actualizada por última vez el 20 de junio del 2017 en la base de datos Pubmed. Se utilizaron las palabras clave “(mir OR micromrna OR miRNA) AND Alzheimer” y dio como resultado 409 artículos. De esos 409, 331 fueron descartados y 78 fueron incluidos. De los 78 artículos incluidos, 71 estudiaron la desregulación de miRNAs en pacientes con LOAD en estudios de caso control y tan solo 7 artículos estudiaron variantes genéticas en LOAD. La **Figura 5** representa el proceso de selección de artículos.

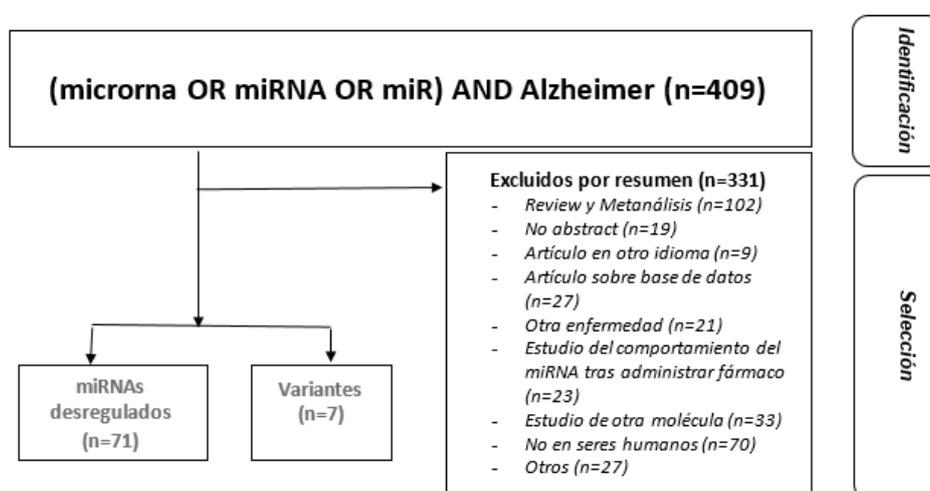


Figura 5. Flow chart que indica el proceso de inclusión y exclusión de artículos. De los 409 seleccionados inicialmente, 71 artículos estudian la desregulación de miRNAs en pacientes con LOAD en estudios de caso control y 7 artículos estudian variantes genéticas.

5.2. ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO-CONTROL

5.2.1. Características de la muestra

La población de estudio incluyó un total de 433 muestras de DNA de individuos españoles, 212 pacientes con LOAD y 221 controles sanos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características de la población de estudio.

	Pacientes EA > 65 años	Controles
Nº individuos	212	221
Edad media	78,7 ± 6.40	75,8 ± 18.5
Sexo		
Mujeres, n (%)	145 (68,39)	132 (59,73)
Hombres, n (%)	67 (31,61)	89 (40,27)

5.2.2. Resultados del genotipado

De los 213 SNPs analizados, se eliminaron aquellos que presentaron un porcentaje de genotipado < 80%, los SNPs monomórficos y aquellos que se desviaron del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles. Finalmente, un total de 158 SNPs (74,18%) fueron incluidos en el análisis de asociación.

5.2.3. Asociación de miR-SNPs en la susceptibilidad a desarrollar LOAD

Del total de SNPs, se encontraron 16 SNPs significativos (p-valor < 0,05) en 16 miRNAs asociados con el riesgo a padecer LOAD (**Tabla 4**).

Tabla 4: Polimorfismos en miRNAs asociados con el riesgo a desarrollar LOAD.

SNP	microRNA	Genotipo	N (%) Controles	N (%) Casos	OR (IC 95%)	P-valor
			(N=221)	(N=212)		
rs74704964 pre-miRNA	hsa-mir-518d 19q13.42	CC	207 (95,4)	186 (88,2)	Codominant	0,0056
		CT	10 (4,6)	25 (11,8)	1	
		TT	0 (0,0)	0 (0,0)	2,78 (1,3-5,95)	
rs71363366 pre-miRNA	hsa-mir-1283-2 19q13.42	CC	207 (95,0)	185 (87,7)	Codominant	0,0066
		CG	11 (5,0)	26 (12,3)	1	
		GG	0 (0,0)	0 (0,0)	2,64 (1,27-5,5)	
rs11983381 pre-miRNA	hsa-mir-4653 7q22.1	AA	163 (73,8)	132 (63,5)	Log ad.	0,0066
		AG	56 (25,3)	67 (32,2)	1,66 (1,15-2,40)	
		GG	2 (0,9)	9 (4,3)		
rs10934682 pre-miRNA	hsa-mir-544b 3q21.2	TT	162 (73,3)	130 (62,2)	Log ad.	0,0074
		GT	56 (25,3)	71 (34,0)	1,64 (1,14-2,37)	
		GG	3 (1,4)	8 (3,8)		
rs4809383 pre-miRNA	hsa-mir-941-1 20q13.33	CC	160 (73,4)	174 (82,9)	Codominant	0,0079
		CT	58 (26,6)	34 (16,2)	1	
		TT	0 (0,0)	2 (1,0)	0,54 (0,34-0,87)	
rs243080 pre-miRNA	hsa-mir-4432 2p16.1	CC	65 (29,5)	76 (36,5)	Codominant	0,0207
		CT	116 (52,7)	82 (39,4)	1	
		TT	39 (17,7)	50 (24,0)	0,60 (0,39-0,93)	
rs72996752 in_mature	hsa-mir-4999 19p13.2	AA	136 (62,1)	108 (52,7)	Log ad.	0,0230
		AG	73 (33,3)	79(38,5)	1,43 (1,05-1,96)	
		GG	10 (4,6)	18 (8,8)		
rs7522956 pre-miRNA	hsa-mir-4742 1q42.11	AA	135 (61,4)	115 (54,8)	Recessive	0,0274
		AC	75 (34,1)	74 (35,2)	1	
		CC	10 (4,5)	21 (10,0)	2,33 (1,07-5,08)	
rs6726779 pre-miRNA	hsa-mir-4431 2p16.2	TT	86 (38,9)	75 (36,2)	Recessive	0,0287
		CT	110 (49,8)	93 (44,9)	1	
		CC	25 (11,3)	39 (18,8)	1,82 (1,06-3,13)	
rs112328520 pre-miRNA	hsa-mir-520g 19q13.42	CC	187 (85,4)	194 (91,9)	Codominant	0,0311
		CT	32 (14,6)	17 (8,1)	1	
		TT	0 (0,0)	0 (0,0)	0,51 (0,28-0,95)	
rs1683709 pre-miRNA	hsa-mir-3612 12q24.32	CC	141 (63,8)	132 (62,6)	Recessive	0,0314
		CT	74 (33,5)	64 (30,3)	1	
		TT	6 (2,7)	15 (7,1)	2,74 (1,04-7,21)	
rs266435 in_mature	hsa-mir-4804 5q13.2	CC	174 (79,1)	152 (73,4)	Recessive	0,0329
		CG	43 (19,5)	45 (21,7)	1	
		GG	3 (1,4)	10 (4,8)	3,67 (1,00-13,53)	
rs61992671 in_mature	hsa-mir-412 14q32.31	GG	73 (33,2)	59 (23,9)	Dominant	0,0336
		AG	98 (44,5)	112 (53,6)	1	
		AA	49 (22,3)	47 (22,5)	1,58 (1,03-2,41)	
rs12894467 pre-miRNA	hsa-mir-300 14q32.31	CC	98 (44,5)	77 (37,4)	Log ad.	0,0360
		CT	102 (46,4)	97 (47,1)	1,36 (1,02-1,81)	
		TT	20 (9,1)	32 (15,5)		
rs68035463 pre-miRNA	hsa-mir-3144 6q22.31	CC	148 (67,3)	124 (59,3)	Log ad.	0,0435
		AC	67 (30,5)	74 (35,4)	1,42 (1,01-1,99)	
		AA	5 (2,3)	11 (5,3)		
rs56103835 pre-miRNA	hsa-mir-323b 14q32.31	TT	157 (71,0)	133 (63,6)	Log ad.	0,0457
		CT	58 (26,2)	63 (30,1)	1,41 (1,00-1,97)	
		CC	6 (2,7)	13 (6,2)		

Abreviaturas: OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confianza

Entre los resultados cabe destacar que tres SNP significativos se encontraron localizados en la región **19q13.42**. El SNP más significativo fue **rs74704964** en el **mir-518d** bajo el modelo codominante (CT vs. CC) donde el genotipo CT incrementó 2,78 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 1,3-5,95; P= 0,0056). El segundo SNP más significativo fue **rs71363366** en el **mir-1283-2** bajo el modelo codominante (CG vs. CC+GG) donde el genotipo CG incrementó 2,64 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 1,27-5,5; P= 0,0066). En la misma región se encuentra también el SNPs **rs112328520** en el **mir-520g** el cual fue también significativo bajo el modelo codominante (CT vs. CC) donde el genotipo CT disminuyó 0,51 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 0,28-0,95; P= 0,0311).

Se pueden destacar también otros tres SNPs significativos que comparten la misma localización en la región **14q32.31**, fueron los SNPs **rs61992671**, **rs12894467** y **rs56103835** en **mir-412**, **mir-300** y **mir-323b** respectivamente. En el primero de ellos, **rs61992671**, bajo el modelo dominante (GG vs. AG+AA) el genotipo AG incrementó 1,58 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 1,03-2,41; P= 0,0336). Los otros dos, bajo el modelo aditivo incrementaron también el riesgo a desarrollar LOAD. En el caso de **rs12894467** (CC vs. CT vs. TT) los genotipos CT y TT incrementaron el riesgo 1,36 veces y en **rs56103835** (TT vs. CT vs. TT) los genotipos CT y CC incrementaron el riesgo 1,41 veces (rs12894467: 95% CI: 1,02-1,81; P= 0,0360; rs56103835: 95% CI: 1,00-1,97; P= 0,0457).

A continuación se realizó una revisión de los miRNAs presentes en las regiones **19q13.42** y **14q32.31** y su relación con LOAD descrita en la literatura (**Tablas 5 y 6**).

Tabla 5: miRNAs desregulados en el clúster 19q13.42 en pacientes con LOAD.

ID	Localización	Alteración	Tejido	Ref.
hsa-mir-512	intrón	DOWN	-	(Mezache et al, 2015)
hsa-mir-1323	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-498	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-515	Intergénica	UP	CM	(Shipper et al., 2007)*
hsa-mir-526	Intergénica	UP	CSF	(Cogswell et al., 2008)
hsa-mir-525	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-523	Intergénica	UP	CM	(Shipper et al., 2007)*
hsa-mir-524	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-517	Intergénica	UP	CSF	(Cogswell et al., 2008), (Lau et al., 2013), (Leidinger et al., 2013), (Shipper et al., 2007)
hsa-mir-521	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-520g	Intergénica	UP	CSF	(Cogswell et al., 2008), (Leidinger et al., 2013), (Ruberti et al., 2010), (Shipper et al., 2007)
hsa-mir-518	Intergénica	UP	CSF/CM	(Cogswell et al., 2008), (Weinberg et al., 2015), (Shipper et al., 2007)*
hsa-mir-522	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-519	Intergénica	UP	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-527	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-516	Intergénica	UP	CF,IT/C, HC, CB	(Weinberg et al., 2015), (Mallik et al., 2011)
hsa-mir-1283	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-371	Exón	UP	CM	(Shipper et al., 2007)
hsa-mir-372	Exón	-	-	-
hsa-mir-373	Intergénica	UP	CM	(Shipper et al., 2007)*

Abreviaturas: CM: células mononucleares de sangre humana, CSF: fluido cerebroespinal, CF: cortex frontal, TI: temporal inferior, C: cortex, HC: hipocampo, CB: cerebelo. En negrita los miRNAs en los que se encuentran los SNPs que dieron resultados significativos.

(*): Expresión de miRNAs en células mononucleares de sangre humana de personas de avanzada edad.

Tabla 6: miRNAs desregulados en el clúster 14q32.31 en pacientes con LOAD.

ID	Localización	Alteración	Tejido	Ref.
hsa-mir-379	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-411	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-299	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-380	Exón	UP	CSF	(Cogswell et al., 2008)
hsa-mir-1197	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-323a	Intergénica	UP	CM/CSF/HeLa	(Leidinger et al., 2013), (Burgos et al., 2014), (Lau et al., 2013), (Delay et al., 2011)
hsa-mir-758	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-329	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013), (Burgos et al., 2014)
hsa-mir-494	Intergénica	UP	CSF	(Cogswell et al., 2008)
hsa-mir-1193	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-543	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-495	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013), (Burgos et al., 2014)
hsa-mir-654	Intergénica	UP	CM	(Leidinger et al., 2013)
hsa-mir-376	Intergénica	DOWN	HC	(Schonrock et al., 2010)
hsa-mir-300	Intergénica	DOWN	-	(Zhao et al., 2014)
hsa-mir-1185	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-381	Intrón	UP	CSF	(Cogswell et al., 2008), (Burgos et al., 2014)
hsa-mir-487b	Intrón	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-539	Intrón	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-889	Intrón	-	-	-
hsa-mir-544a	Intrón	-	-	-
hsa-mir-655	Intrón	UP	HeLa	(Delay et al., 2011)
hsa-mir-487a	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-382	Intergénica	DOWN	CF, TI/CSF	(Weinberg et al., 2015), (Lau et al., 2013)
hsa-mir-134	Intergénica	UP	CB	(Spencer et al., 2012)
hsa-mir-668	Exón	DOWN	CF, TI	(Weinberg et al., 2015)
hsa-mir-485	Intergénica	DOWN	CSF/CF, TI	(Faghihi et al., 2010), (Weinberg et al., 2015), (Gui et al., 2015), (Lau et al., 2013)
hsa-mir-323b	Intergénica	UP	HeLa	(Delay et al., 2011), (Burgos et al., 2014)
hsa-mir-154	Intergénica	DOWN	CSF	(Cogswell et al., 2008)
hsa-mir-496	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013)
hsa-mir-377	Intergénica	-	-	(Burgos et al., 2014)
hsa-mir-541	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-409	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013), (Wong, 2014), (Gui et al., 2015)
hsa-mir-412	Intergénica	UP	CM	(Leidinger et al., 2013)
hsa-mir-369	Intergénica	-	-	-
hsa-mir-410	Intergénica	DOWN	CSF	(Lau et al., 2013), (Burgos et al., 2014)
hsa-mir-656	Intergénica	-	-	-

Abreviaturas: CM: células mononucleares de sangre humana, CSF: fluido cerebroespinal, CF: corteza frontal, TI: temporal inferior, HC: hipocampo

En negrita los miRNAs en los que se encuentran los SNPs que dieron resultados significativos.

(*): Expresión de miRNAs en células mononucleares de sangre humana de personas de avanzada edad.

5.2.4. Análisis bioinformático de la estructura secundaria de los miRNAs

Para determinar el posible efecto funcional de los SNPs significativos, se analizó el cambio de energía libre de Gibbs *in silico* ($\Delta\Delta G$) y la estructura secundaria de los tres miRNAs que presentaban los SNPs localizados en **19q13.42 (Figura 6)** y en **14q32.31 (Figura 7)**.

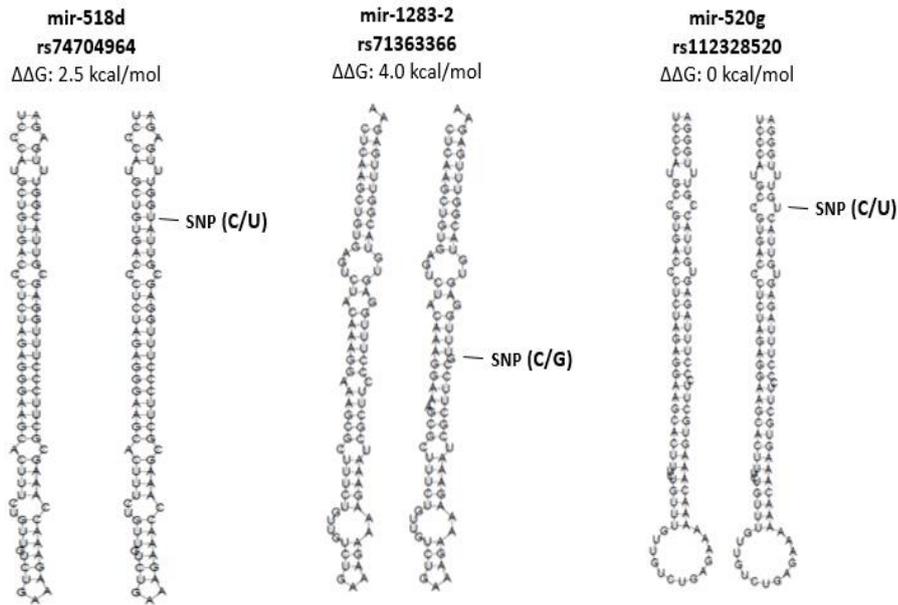


Figura 6. Efecto de la variante genética en la estructura secundaria de los miRNAs más significativos localizados en 19q13.42.

En los primeros dos miRNAs el polimorfismo genera un cambio de energía libre positivo. El **rs74704964** en el **mir-518d**, el cambio es del alelo C por el alelo U ($\Delta\Delta G = 2,5$ kcal/mol) y no se produce ningún cambio en la estructura. En el caso de **rs71363366** en el **hsa-mir-1283-2**, el cambio es del alelo C por el alelo G ($\Delta\Delta G = 4,0$ kcal/mol) y se produce un cambio en la estructura secundaria. En **rs112328520** el cambio producido es del alelo C por el alelo U en el **mir-520g** y en este caso no se observa ningún cambio de energía libre ($\Delta\Delta G = 0,0$ kcal/mol) ni en la estructura secundaria.

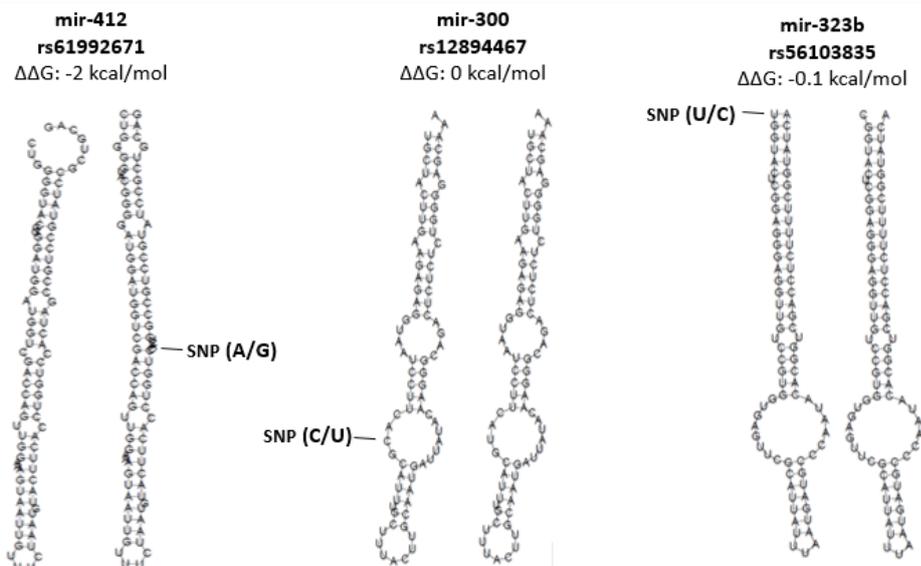


Figura 7. Efecto de la variante genética en la estructura secundaria de los miRNAs más significativos localizados en 14q32.31.

En lo que respecta a la localización **14q32.31**, el **rs61992671** en el **hsa-mir-412**, el cambio es del alelo A por el alelo G ($\Delta\Delta G = -2,0$ kcal/mol) y se produce un ligero cambio en la estructura secundaria. En los otros dos casos, el **rs12894467** en el **hsa-mir-300** y **rs56103835** en el **hsa-mir-323b**, se cambia el alelo C por el alelo U y el alelo U por el alelo C, respectivamente. En el primer caso no se produce ningún cambio de energía libre ($\Delta\Delta G = 0,0$ kcal/mol) ni en la estructura secundaria y en el segundo se observa un pequeño cambio de energía libre ($\Delta\Delta G = -0,1$ kcal/mol) sin variaciones en la estructura secundaria.

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la correlación entre 213 SNPs en 206 miRNAs y la susceptibilidad a padecer LOAD, con el objetivo de identificar nuevos marcadores de riesgo. Se encontraron un total de 16 SNPs en 16 miRNAs que muestran una asociación estadísticamente significativa con el riesgo a padecer LOAD. En los resultados se observó que algunos de los miRNAs en los que se encontraron SNPs significativos compartían la misma localización: **19q13.42**, en el caso de los miRNAs **mir-518d**, **mir-1283-2** y **mir-520g** y **14q32.31**, para los miRNAs **mir-412**, **mir-300** y **mir-323b**. Por este motivo se analizaron con mayor detenimiento y se propuso que podrían tratarse de *hot spots* o “puntos calientes” para la susceptibilidad a LOAD.

Las regiones **19q13.42** y **14q32.31** son dos clústers de miRNAs. Un clúster de miRNAs es un conjunto de miRNAs localizados, en su mayoría, a unos cuantos miles de bases de distancia de los otros. De acuerdo con la localización y la similitud de secuencias, estos grupos de miRNA pueden tener relaciones evolutivas y funcionales (Guo et al., 2013).

En los resultados se encontraron tres SNP significativos localizados en la región **19q13.42**. El SNP más significativo fue **rs74704964** en el **mir-518d** bajo el modelo codominante (CT vs. CC) donde el genotipo CT incrementó 2,78 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 1,3-5,95; P= 0,0056). El segundo SNP más significativo fue **rs71363366** en el **mir-1283-2** bajo el modelo codominante (CG vs. CC+GG) donde el genotipo CG incrementó 2,64 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 1,27-5,5; P= 0,0066). En la misma región se encuentra también el SNPs **rs112328520** en el **mir-520g** el cual fue también significativo bajo el modelo codominante (CT vs. CC) donde el genotipo CT disminuyó 0,51 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 0,28-0,95; P= 0.0311).

En el clúster **19q13.42**, cabe destacar las frecuencias genotípicas de los dos SNPs más significativos: **rs74704964** en el **mir-518d** y **rs71363366** en el **mir-1283-2**. En ambos casos se observó que ningún individuo presentaba el genotipo TT. Se consultó la base de datos “1000 Genomes Browser” y se obtuvo que ninguno de los individuos analizados en la población española presentaba el genotipo

TT, siendo la frecuencia alélica para el alelo T de 0,0421. Por lo tanto, el genotipo TT en los SNPs **rs74704964** y **rs71363366** podría ser un genotipo letal.

También se analizó el efecto de los SNPs en el cambio de energía libre de Gibbs *in silico* ($\Delta\Delta G$) y la estructura secundaria de los tres miRNAs que presentaban los SNPs más significativos localizados en **19q13.42** (**Figura 6**). En los primeros dos miRNAs el polimorfismo genera un cambio de energía libre positivo: **rs74704964** en el **mir-518d** ($\Delta\Delta G = 2,5$ kcal/mol) y **rs71363366** en el **mir-1283-2** ($\Delta\Delta G = 4,0$ kcal/mol). Un cambio de energía positivo, disminuye la estabilidad del miRNA, se reduce el producto de miRNA maduro, lo que a su vez puede aumentar la expresión del gen diana (Gong et al., 2012). En base a estos resultados, cabría esperar una reducción del producto de **mir-518**. Sin embargo, algunos autores (Cogswell et al., 2008, Weinberg et al., 2015) proponen un aumento en la expresión de este miRNA en pacientes con LOAD. Esta discrepancia podría deberse a la existencia de mecanismos desconocidos que puedan estar implicados en el aumento de la expresión de los miRNAs, como podría ser su metilación.

En el caso del SNP **rs112328520** en el **mir-520g**, el cual disminuyó 0,51 veces el riesgo a desarrollar LOAD, no se produjo ningún cambio de energía libre ($\Delta\Delta G = 0,0$ kcal/mol) ni en la estructura secundaria. A pesar de ello, numerosos estudios validan la implicación de la sobre expresión de este miRNA en la susceptibilidad a LOAD (Cogswell et al., 2008, Leidinger et al., 2013, Ruberti et al., 2010, Shipper et al., 2007).

En este mismo clúster es interesante añadir que tras la revisión de la literatura (**Tabla 5**), se observó un aumento en la expresión de miRNAs en pacientes con LOAD en comparación con controles sanos en todos los miRNAs estudiados excepto en el caso del miRNA **mir-512**. La reducción de **mir-512** provoca la sobre expresión de dos genes: *cFLIP* y *MCL1*, los cuales se expresan en neuronas que presentan la proteína TAU hiperfosforilada en pacientes con LOAD. Los resultados del estudio sugirieron que los productos de los genes activados pueden alterar el equilibrio apoptótico/antiapoptótico de las neuronas (Mezache et al., 2015).

Otros miRNAs muy sobre expresados en esta misma región descritos en la literatura fueron: **mir-515**, **mir-523**, **mir-518** y **mir-373** (Shipper et al., 2007). También existen evidencias de la sobre expresión de miRNAs en pacientes con LOAD pueden alterar funciones celulares relacionadas con la enfermedad. Por ejemplo, el **mir-517** se encuentra sobre expresado en pacientes con LOAD y se ha relacionado con el metabolismo celular y la reparación del daño en el DNA durante la fase G0 del ciclo celular (Shipper et al., 2007).

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos y de lo descrito en la literatura, se propone que el clúster **19q13.42** es un *hot spot* de riesgo para la susceptibilidad a desarrollar LOAD.

En el caso de la región **14q32.31**, se encontraron tres SNPs significativos **rs61992671** en el **mir-412**, **rs12894467** en el **mir-300** y **rs56103835** en el **mir-323b** asociados al riesgo a padecer LOAD. En el primero de ellos, **rs61992671**, bajo el modelo dominante (GG vs. AG+AA) el genotipo AG incrementó 1,58 veces el riesgo a desarrollar LOAD (95% CI: 1,03-2,41; P= 0,0336). Los otros dos, bajo el modelo aditivo incrementaron también el riesgo a desarrollar LOAD. En el caso de **rs12894467** (CC vs. CT vs. TT) los genotipos CT y TT incrementaron el riesgo 1,36 veces y en **rs56103835** (TT vs. CT vs. TT) los genotipos CT y CC incrementaron el riesgo 1,41 veces (rs12894467: 95% CI: 1,02-1,81; P= 0,0360; rs56103835: 95% CI: 1,00-1,97; P= 0,0457).

La variación de energía resultó ser negativa para los SNPs **rs61992671** en el **mir-412** ($\Delta\Delta G = -2,0$ kcal/mol) y en **rs56103835** en el **mir-323b** ($\Delta\Delta G = -0,1$ kcal/mol) (**Figura 7**). Una variación negativa de la energía aumenta la estabilidad, lo que provoca un aumento de los niveles del miRNA y por tanto disminuye la expresión del gen diana (Gong et al., 2012). Esto se corresponde con lo descrito por (Leidinger et al., 2013, Delay et al., 2011, Burgos et al., 2014), los cuales propusieron que la expresión de estos dos miRNAs se encuentra aumentada en pacientes con LOAD.

Es interesante destacar que el **mir-412** ya se ha encontrado desregulado en pacientes con LOAD. Se ha demostrado que el mir-412 se expresa en células neuronales y que está relacionado con procesos de muerte celular (Melamed et al., 2013). Además, se ha observado que en tejidos embrionarios los niveles de **mir-412** se encuentran significativamente reducidos en comparación con tejidos adultos. Esto sugiere que la desregulación del **mir-412** podría causar el incremento de la expresión de genes relacionados con la muerte celular, provocando la degeneración neuronal característica de la enfermedad. Por lo tanto, la presencia del SNP **rs61992671** en **miR-412** podría ser un factor de riesgo de LOAD al causar la aceleración de la degeneración neuronal.

En esta región se ha propuesto que el SNP rs320120 en el **mir-655** podría disminuir la expresión del gen APP en pacientes con LOAD en comparación con los controles (Delay et al., 2011). Otro miRNA localizado en esta región y asociado con LOAD es el **mir-134**, en este caso parece ser que la sobre expresión del miRNA reduce la densidad de las dendritas del hipocampo, induciendo daño en esta región. Además, también participa en la diferenciación, proliferación y apoptosis celular (Spencer et al., 2012).

En vista de los resultados obtenidos y de lo descrito en la literatura, se propone que el clúster **14q32.31** es un *hot spot* de riesgo para la susceptibilidad a desarrollar LOAD.

En definitiva, a pesar de que hasta la fecha ningún autor había propuesto la herencia en bloque de los clúster **14q32.31** y **19q13.42** relacionada con la susceptibilidad a desarrollar LOAD, 14 estudios independientes revelaron que 37 de los 57 miRNAs que los constituyen se encuentran desregulados

con una frecuencia significativamente mayor en pacientes con LOAD en comparación con controles sanos.

En resumen, en este estudio se encontraron 16 SNPs en 16 miRNAs que muestran una asociación estadísticamente significativa con el riesgo a padecer LOAD. Además, se propone por primera vez que los clúster **19q13.42** y **14q32.31** pueden ser *hot spot* para la susceptibilidad a desarrollar LOAD.

7. CONCLUSIÓN

En conclusión, las variantes genéticas en los miRNAs, pueden ser consideradas como nuevos marcadores para la susceptibilidad a padecer LOAD y podrían ser útiles para determinar la predisposición genética a desarrollar la enfermedad.

En este estudio se detectaron 16 SNPs significativos asociados con el riesgo a desarrollar LOAD. Considerando los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, las localizaciones **14q32.31** y **19q13.42** se proponen como “puntos calientes” o *hot spots* en los que aparecen miRNAs que podrían estar implicados en LOAD.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Sería interesante validar los resultados obtenidos en los clústers **14q32.31** y **19q13.42** en una nueva población y en caso de confirmarse estos resultados, determinar el efecto funcional de los miRNAs de estos clústers en el cerebro de pacientes con LOAD.

9. BIBLIOGRAFÍA

9.1 Citas bibliográficas

- Armstrong, R.A. (2011). The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *International Journal Alzheimers Disease*, 630865.
- Batistela, M.S., Josviak N.D., Sulzbach C.D., de Souza R.L. (2016). An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *International Journal of Neuroscience*, 20:1-12.
- Ben Halima, S., Siegel, G., Rajendran, L. (2016). miR-186 in Alzheimer's disease: a big hope for a small RNA? *Journal of Neurochemistry*, 137(3):308-11.
- Bilbao, N. (2015). Variantes genéticas implicadas en la susceptibilidad del osteosarcoma pediátrico. Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal. Facultad de Medicina y Odontología.
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533): 387-403.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, & Arrighi, H.M. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 3(3):186-91.
- Burgos, K., Malenica, I., Metpally, R., Courtright, A., Rakela, B., Beach, T., Shill, H., Adler, C., Sabbagh, M., Villa, S., Tembe, W., Craig, D., Van Keuren-Jensen, K. (2009). 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*, 9(5):e94839.
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(4): 147-154.
- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A.M., Roses, A.D., Richards, C.A. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *Journal of Alzheimer's disease*, 14(1):27-41.
- Consortium, G. P. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319):1061-1073.
- Consortium, E. P. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414): 57-74.
- Davinelli, S., Calabrese, V., Zella, D., Scapagnini, G. (2014). Epigenetic nutraceutical diets in Alzheimer's disease. *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 18(9):800-5.
- Delay, C., Calon, F., Mathews, P., Hébert, S.S. (2011). Alzheimer-specific variants in the 3'UTR of Amyloid precursor protein affect microRNA function. *Molecular neurodegeneration*, 6:70.

- Faghihi, M.A., Zhang, M., Huang, J., Modarresi, F., Van der Brug, M.P., Nalls, M.A., Cookson, M.R., St-Laurent, G. 3rd, Wahlestedt, C. (2010). Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biology*, 11(5):R56.
- Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., y Guo, A.Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Human Mutation*, 33(1):254-63.
- Gui, Y., Liu, H., Zhang, L., Lv, W., Hu, X. (2015). Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Oncotarget*, 6(35):37043-53.
- Guo, L., Zhao, Y., Zhang, H., Yang, S., Chen, F. (2013). Integrated evolutionary analysis of human miRNA gene clusters and families implicates evolutionary relationships. *Gene*, 534(1):24-32.
- Gutiérrez, A. (2016). Genetic variants involved in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Susceptibility. Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal. Facultad de Medicina y Odontología.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10): 1088-1093.
- Kim, D.H., Yeo, S.H., Park, J.M., Choi, J.Y., Lee, T.H., Park, S.Y., Ock, M.S., Eo, J., Kim, H.S., Cha, H.J. (2014). Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene*, 545(2):185-93.
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C.S., Barbash, S., Rothman, R., Sierksma, A.S., Thathiah, A., Greenberg, D., Papadopoulou, A.S., Achsel, T., Ayoubi, T., Soreq, H., Verhaagen, J., Swaab, D.F., Aerts, S., De Strooper, B. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5(10):1613-34.
- Leidinger, P., Backes, C., Deutscher, S., Schmitt, K., Mueller, S.C., Frese, K., Haas, J., Ruprecht, K., Paul, F., Stähler, C., Lang, C.J., Meder, B., Bartfai, T., Meese, E., Keller, A. (2013). A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients. *Genome Biology*, 14(7):R78.
- Liu, W., Zhao, J., Lu, G., (2016). miR-106b inhibits tau phosphorylation at Tyr18 by targeting Fyn in a model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(2):852-7.
- Maciotta, S., Meregalli, M., Torrente, Y. (2013). The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:265.
- Mallick, B., Ghosh, Z. (2011). A complex crosstalk between polymorphic microRNA target sites and AD prognosis. *RNA Biology*, 8(4):665-73.

- Melamed, Z., Levy, A., Ashwal-Fluss, R., Lev-Maor, G., Mekahel, K., Atias, N., Gilad, S., Sharan, R., Levy, C., Kadener, S., Ast, G. (2013). Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon-intron junctions. *Molecular Cell*, 50(6):869-81.
- Mezache, L., Mikhail, M., Garofalo, M., Nuovo, G.J. (2015). Reduced miR-512 and the Elevated Expression of Its Targets cFLIP and MCL1 Localize to Neurons With Hyperphosphorylated Tau Protein in Alzheimer Disease. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 23(9):615-23.
- Moriyama, T., Relling, M. V. and Yang, J. J. (2015). Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 125(26): 3988-95.
- Nicolas, G., Charbonnier, C., Champion, D. (2016). From Common to Rare Variants: The Genetic Component of Alzheimer Disease. *Human Heredity*, 81(3):129-141.
- Puthiyedth, N., Riveros, C., Berretta, R., Moscato, P. (2016). Identification of Differentially Expressed Genes through Integrated Study of Alzheimer's Disease Affected Brain Regions. *PLOS ONE*, 11(4): e0152342.
- Querfurth, H. W., La Ferla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4): 329-344.
- Ruberti, F., Barbato, C., Cogoni, C. (2010). Post-transcriptional regulation of amyloid precursor protein by microRNAs and RNA binding proteins. *Communicative & Integrative Biology*, 3(6):499-503.
- Sana, J., Faltejskova, P., Svoboda, M., Slaby, O. (2012). Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10:103.
- Serpente, M., Bonsi, R., Scarpini, E., Galimberti, D. (2014). Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to treatment. *Neuroimmunomodulation*, 21(2-3):79-87.
- Schipper, H.M., Maes, O.C., Chertkow, H.M., Wang, E. (2007). MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1:263-74.
- Schonrock, N., Ke, Y.D., Humphreys, D., Staufenbiel, M., Ittner, L.M., Preiss, T., Götz, J. (2010). Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta. *PLOS ONE*, 5(6):e11070.
- Spencer, P., Fry, R.C., Kisby, G.E. (2012). Unraveling 50-Year-Old Clues Linking Neurodegeneration and Cancer to Cycad Toxins: Are microRNAs Common Mediators? *Frontiers in Genetics*, 3:192.
- Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D. A. (2009). SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*, 15(9): 1640-1651.
- Wang, H. X., Karp, A., Winblad, B., Fratiglioni, L. (2002). Late-life engagement in social and leisure activities is associated with a decreased risk of dementia: A longitudinal study from the kungsholmen project. *American Journal of Epidemiology*, 155(12): 1081-1087.

- Weinberg, R.B., Mufson, E.J., Counts, S.E. (2015). Evidence for a neuroprotective microRNA pathway in amnesic mild cognitive impairment. *Frontiers in Neuroscience*, 9:430.
- Wong, J. (2014). Regulation of a TrkB Alternative Transcript by microRNAs. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 4(3):364-74.
- Zhao, Z.B., Wu, L., Xiong, R., Wang, L.L., Zhang, B., Wang, C., Li, H., Liang, L., Chen, S.D. (2014). MicroRNA-922 promotes tau phosphorylation by downregulating ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1) expression in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 275:232-7.
- Zhang, Y., Xing, H., Guo, S., Zheng, Z., Wang, H., Xu, D. (2016). MicroRNA-135b has a neuroprotective role via targeting of β -site APP-cleaving enzyme 1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(2):809-814.

9.2. Referencias online

- PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Last retrieved April 7th, 2014)
- miRBase database: (<http://www.mirbase.org/>) (retrieved: March 2013).
- miRNA SNipER database: (<http://www.integratomics-time.com/miRNA-SNiPer/>) (retrieved: March 2013)
- Illumina: <http://www.illumina.com/technology.ilmn> (retrieved: June 12th, 2014)
- Bioguo: <http://bioguo.org> (Release 2.0: July 2013) (Gong et al., 2012) (retrieved: May 20th, 2014)