

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

De la Placenta al Alzheimer

Un estudio de aleatorización mendeliana

Egilea /Autor:

Marta Elorriaga Urruticoechea

Zuzendaria / Director/a:

Nora Fernández Jiménez / José Ramón Bilbao Catalá

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Nora Fernández su paciencia, tiempo y dedicación al dirigirme este proyecto, así como la capacidad que ha tenido de transmitirme sus conocimientos y su pasión por la genética. También quiero agradecer a José Ramón Bilbao su ayuda en la corrección de mi trabajo. Gracias también a Sergi Marí por su colaboración con el análisis bioinformático de los datos y a Ariadna Cilleros por darme la oportunidad de tomar parte en su investigación.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi familia y amigos su apoyo incondicional a lo largo de estos últimos 6 años.

RESUMEN

Con el aumento de la esperanza de vida, se prevé un incremento en la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer en nuestra sociedad. En los últimos años se está investigando para conocer sus posibles causas y así poder plantear tratamientos más específicos. Además, también es importante conocer su etiopatogenia, para así identificar los actores involucrados en la predisposición a desarrollar la enfermedad, pudiendo llegar a detectarse de manera precoz. En este trabajo, con el objetivo de conocer si existe relación potencialmente causal entre la metilación del ADN de la placenta y la posterior aparición del Alzheimer en la vida adulta, realizamos un análisis de aleatorización mendeliana, usando para ello una base de datos propia de *loci* de rasgos cuantitativos de metilación o mQTLs de placenta y otras públicas de tejido cerebral adulto y fetal. Además, se realizó una búsqueda de estadísticos de resumen de estudios de asociación de genoma completo o GWAS de Alzheimer, y se formatearon los datos genómicos obtenidos. Posteriormente se ejecutó la aleatorización mendeliana por medio del software SMR y se caracterizaron los resultados mediante buscadores genómicos *online*. Finalmente, se discutieron e interpretaron los resultados obtenidos mediante búsqueda bibliográfica. En resumen, encontramos CpGs asociados con Alzheimer en la placenta cerca de genes previamente relacionados con esta enfermedad como *BINI* y *PICALM*, pero también otros con funciones relevantes en el desarrollo fetal, como *BCL3* y *EPHA1-ASI*. Así, parte de la genética de susceptibilidad al Alzheimer podría expresarse en etapas prenatales mediante la metilación del ADN de la placenta. Las posiciones CpG implicadas se encuentran cerca de genes relacionados con el neurodesarrollo y parecen específicas de la placenta. No obstante, serán necesarias más investigaciones para corroborar nuestros hallazgos.

Palabras clave: Alzheimer, placenta, aleatorización mendeliana, metilación del ADN, SNP, GWAS, mQTL.

ABSTRACT

With the increase in life expectancy, a higher prevalence of Alzheimer's disease is predicted in our society. In recent years, many researches have been conducted to identify possible causes of this disease and to propose more specific treatments. Additionally, it is important to understand its etiopathogenesis in order to identify the actors involved in the predisposition to develop the disease, potentially allowing an early detection. In this work, in order to determine if there is a potentially causal relationship between DNA methylation in the placenta and the later onset of Alzheimer's disease in adulthood, we conducted a Mendelian Randomization analysis using our own database of placental quantitative trait loci (mQTLs) and other publicly available datasets of adult and fetal brain tissue. We also conducted a search for summary statistics of Alzheimer's disease genome-wide association studies (GWAS) and formatted the obtained genomic data. Subsequently, Mendelian Randomization was performed using the SMR software and the results were characterized using online genomic search tools. Finally, the results were discussed and interpreted through a literature search. In summary, we found CpGs associated with Alzheimer's disease in the placenta near genes previously related to this disease, such as *BINI* and *PICALM*, but also others with relevant functions in fetal development, such as *BCL3* and *EPHA1-AS1*. Thus, part of the genetic susceptibility to Alzheimer's disease may be expressed during prenatal stages through placental DNA methylation. The implicated CpG positions are located near genes related to neurodevelopment and appear to be specific to the placenta. However, further research will be necessary to corroborate our findings.

Keywords: Alzheimer, placenta, Mendelian randomization, DNA methylation, SNP, GWAS, mQTL.

LABURPENA

Bizi-itxaropenaren handitzearekin batera, gure gizartean Alzheimerraren prebalentziaren gorakada ere espero da. Azken urteotan, Alzheimer gaixotasuna etengabe ikertzen ari da gaixotasun honen kausak topatzeko asmotan, tratamendu zehatzagoak ezarri ahal izateko. Horrenbestez, garrantzitsua da haren etiopatogenia ezagutzea, Alzheimerraren garapenean parte hartzen duten faktoreak identifikatzeko, eta honenbestez, gaixotasuna garaiz detektatu ahal izateko. Ikerketa lan honetan, DNAaren metilazioa eta Alzheimerraren garapenean arteko erlazioa ezagutzeko, ausazkotze mendeldar analisi bat egin genuen. Horretarako, lan honetan plazentaren DNAREN metilazioaren eta helduaroan Alzheimerra garatzearen arteko erlazio kausala ikertu zen, horretarako plazentaren eta garun-ehun heldu eta fetalaren metilazioaren ezaugarri kuantitatiboan *loci* edo mQTLen datu-baseak erabilita. Horretaz gain, genoma osoko asoziazio-ikerketen edo GWASen laburpen-estatistikoak bilatu eta lortutako datu genomikoak formateatu ziren. Ondoren, Ausazkotze Mendeldarra burutu zen SMR softwarearen bidez eta lortutako informazioa hobeto ezagutzeko, bilatzaile genomikoetan ezaugarritu genuen. Bukatzeko, emaitzak eztabaidatu eta interpretatu genituen bilaketa bibliografiko bidez. Laburbilduz, hurrengo informazioa aurkitu genuen: Alzheimerrarekin asoziatuak CpGak aurkitu genituen gaixotasun honekin aurretik erlazionaturiko genen ondoan (*BINI* eta *PICALM*), eta baita fetuaren garapenean paper bat duten geneen ondoan ere (*BCL3* eta *EPHA-ASI*). Hori horrela, Alzheimerraren suszeptibilitate genetikoaren zati bat jaio aurretiko faseetan adieraz liteke plazentaren DNAREN metilazioari esker. Parte hartzen duten CpG posizioak garapen neuronalarekin zerikusia duten genen ondoan daude, eta posizio hauek oso plazenta-espezifikoak direla ematen du. Hala eta guztiz ere, ikerketa gehiago behar izango da gure aurkikuntzak berresteko.

Hitz gakoak: Alzheimer, plazenta, ausazkotze mendeldarra, DNAaren metilazioa, SNP, GWAS, mQTL.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	1
1.1.1.	Definición y prevalencia.....	1
1.1.2.	Clínica y diagnóstico	1
1.1.3.	Etiopatogenia	2
1.1.4.	Genética de la EA	2
1.2.	PLACENTA Y METILACIÓN DEL ADN	5
1.3.	ALEATORIZACIÓN MENDELIANA.....	7
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1.	BASES DE DATOS DE MQTLS DE PLACENTA Y CEREBRO.....	9
2.2.	GWAS SELECCIONADO	11
2.3.	MULTI-ALLELIC SMR	11
2.4.	BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.	RESULTADOS	12
4.	DISCUSIÓN.....	16
5.	CONCLUSIONES.....	21
6.	BIBLIOGRAFÍA	23

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1.1. Definición y prevalencia

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de deterioro cognitivo en nuestra sociedad. Se trata de una enfermedad crónica para la que actualmente no existe cura. Se estima que su prevalencia es del 2% en países industrializados, y ésta aumenta considerablemente a partir de los 65 años. Por lo tanto, teniendo en cuenta el aumento de la esperanza de vida, se prevé una gran epidemia con unos 80 millones de casos nuevos al año hacia el año 2040. Dicho incremento de casos tendrá un impacto importante, tanto económico, como a nivel de calidad de vida de los y las pacientes y sus familiares (1). Es la sexta causa de muerte en países industrializados como Estados Unidos y la única causa de muerte que sigue en considerable aumento hoy en día (2).

1.1.2. Clínica y diagnóstico

La enfermedad suele debutar de manera progresiva con pérdida de capacidad cognitiva, pérdida de memoria, dificultades para pensar y para comunicarse y pérdida de la capacidad de realizar actividades de la vida cotidiana, además de incapacidad para crear nuevos recuerdos (3,4). Para llevar a cabo el diagnóstico, normalmente suele bastar con la observación y la realización de una correcta historia clínica mediante preguntas, tanto al paciente como a sus convivientes cercanos (1). También se utilizan tests de capacidad cognitiva; hay unos marcadores diagnósticos que sirven para estratificar la probabilidad del paciente de sufrir esta enfermedad según su sintomatología en el momento. Una vez se obtienen los datos subjetivos y objetivos mediante la exploración clínica, se puede apoyar el diagnóstico definitivo con una serie de pruebas de imagen. Se pueden emplear la resonancia magnética nuclear (RNM) o la tomografía por emisión de positrones (PET) y se apreciará un cerebro atrófico (5). También se realizan pruebas moleculares para la detección de β -amiloide o proteínas TAU en líquido cefalorraquídeo. Las pruebas de imagen no son positivas hasta que la enfermedad está avanzada, por lo que sería útil poder realizar pruebas moleculares ante la mínima sospecha (2,4). El diagnóstico definitivo se realiza mediante la detección de material acumulado en una biopsia cerebral, pero ésta no se puede realizar hasta el

fallecimiento del paciente (1). En resumen, no hay un dato diagnóstico que nos dé el resultado definitivo, se trata de una integración de datos clínicos y radiológicos (2).

1.1.3. Etiopatogenia

La EA es una enfermedad de causa multifactorial y su patogenia sigue sin estar clara, pero se cree que su desarrollo se debe principalmente a factores de riesgo genéticos y ambientales. Hay varias teorías que tratan de explicar el porqué de la EA.

Por una parte, una de las teorías refiere que se da un acúmulo de placas de β -amiloide en el tejido cerebral. Esta proteína tiene dos isoformas, *A β 40* y *A β 42*. La *A β 40* es la forma fisiológica, mientras que la *A β 42* es más hidrofóbica y, por lo tanto, forma agregados más fácilmente, convirtiéndose en una sustancia neurotóxica. Es el componente principal de las placas seniles, cuya acumulación produce una inflamación que se vuelve crónica y puede generar especies reactivas de O_2 , NO y proteinasa, dando lugar a toxicidad neuronal. Esa misma inflamación crónica puede promover la formación de placas de β -amiloide.

La otra teoría sugiere que en los pacientes con EA se da una disminución de la cantidad de acetilcolina en el sistema nervioso central, sobre todo en las zonas relacionadas con el aprendizaje y la memoria (hipocampo y corteza cerebral). Esta disminución de actividad colinérgica afectaría a la transmisión simpática y, en consecuencia, provocaría una inflamación crónica del tejido. La inflamación produciría entonces especies de O_2 reactivas, y éstas reducirían la integridad sináptica (1, 4). Finalmente, existe una tercera hipótesis que apoya que la glicoproteína *APOE*, que participa en la reparación y anti-inflamación neuronal, se encuentra mutada en los pacientes con EA. Esta mutación dotaría a los pacientes de una isoforma ineficaz que promueve los depósitos de amiloide, desencadenando la toxicidad descrita anteriormente (1, 3).

1.1.4. Genética de la EA

Las enfermedades complejas como la EA se caracterizan por no tener una mutación concreta causante de su desarrollo. Al contrario, muchos genes de susceptibilidad de baja penetrancia, y la propia interacción del organismo con el medio ambiente son quienes promueven la aparición de dichas enfermedades. En este trabajo, nos centraremos en los aspectos genéticos de la EA.

Para poder estudiar la genética de las enfermedades complejas se utilizan los estudios de asociación de genoma completo o GWAS (por sus siglas en inglés, *Genome Wide Association Study*). En este tipo de estudios se genotipan polimorfismos de un único nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) comunes en la población general (el alelo menos frecuente está presente en al menos un 1% de la población) y se calcula su asociación con un rasgo determinado o una enfermedad en concreto. El método incluye un chequeo del genoma completo de muchas personas en busca de alelos de SNPs que sean más frecuentes en personas con una enfermedad o rasgo específico que en la población general. La técnica más habitual para la realización de esta prueba es la hibridación del ADN en microarrays de genotipado de SNPs. Una vez se han identificado las variantes cuya frecuencia de aparición es mayor en el grupo afecto de forma estadísticamente significativa, se pueden utilizar para buscar genes cercanos que contribuyan directamente a la enfermedad o rasgo (6), tal y como se muestra en la **Figura 1**.

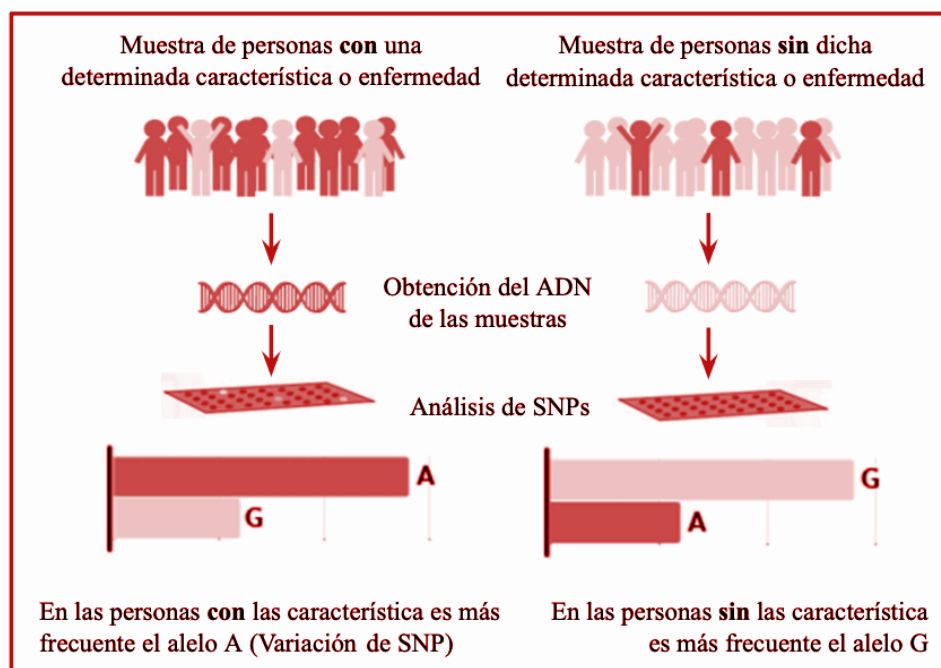


Figura 1. El proceso de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Las muestras de ADN de dos grupos de individuos con y sin un rasgo complejo o enfermedad se analizan a nivel de SNPs. Analizando las frecuencias de los alelos de los dos grupos obtendremos los SNPs implicados en la susceptibilidad de desarrollar un determinado rasgo o enfermedad. (Adaptado de Gairizelaia A, 2021)

Con el objetivo de identificar nuevos *loci* relacionados con el desarrollo de la EA, en 2019 Iris E. Jansen et al. realizaron un metaanálisis, siendo éste el GWAS de EA más grande realizado hasta la fecha. En este trabajo reclutaron una muestra de 455.258 individuos (47.793 casos y 328.320 controles) y encontraron relación entre la EA y diferentes *loci* genómicos (8). Algunos de los genes más relevantes en esos *loci* son los siguientes: *ADAMTS4*, que codifica una proteinasa encargada de degradar proteoglicanos; *BINI*, cuya mutación puede favorecer el acúmulo de TAU (9); *ADAMI0*, que juega un papel clave en la modulación de los mecanismos moleculares responsables de la formación, maduración y estabilización de las espinas dendríticas y en la organización molecular de la sinapsis glutamatérgica (10); o *KAT8*, gen que codifica un miembro de la familia de proteínas histona acetilasa MYST; además del ya conocido *APOE* (11).

Al margen de dichos hallazgos, concluyeron que había una relación estadísticamente significativa entre el desarrollo de la EA y ciertas enfermedades neuropsiquiátricas cuyo origen podría remontarse al neurodesarrollo, como la esquizofrenia, el neuroticismo, los síntomas depresivos, el insomnio o el trastorno bipolar. Además, se observó una relación inversa entre la habilidad cognitiva en la infancia y el desarrollo de demencia tipo Alzheimer (8) (**Figura 2**).

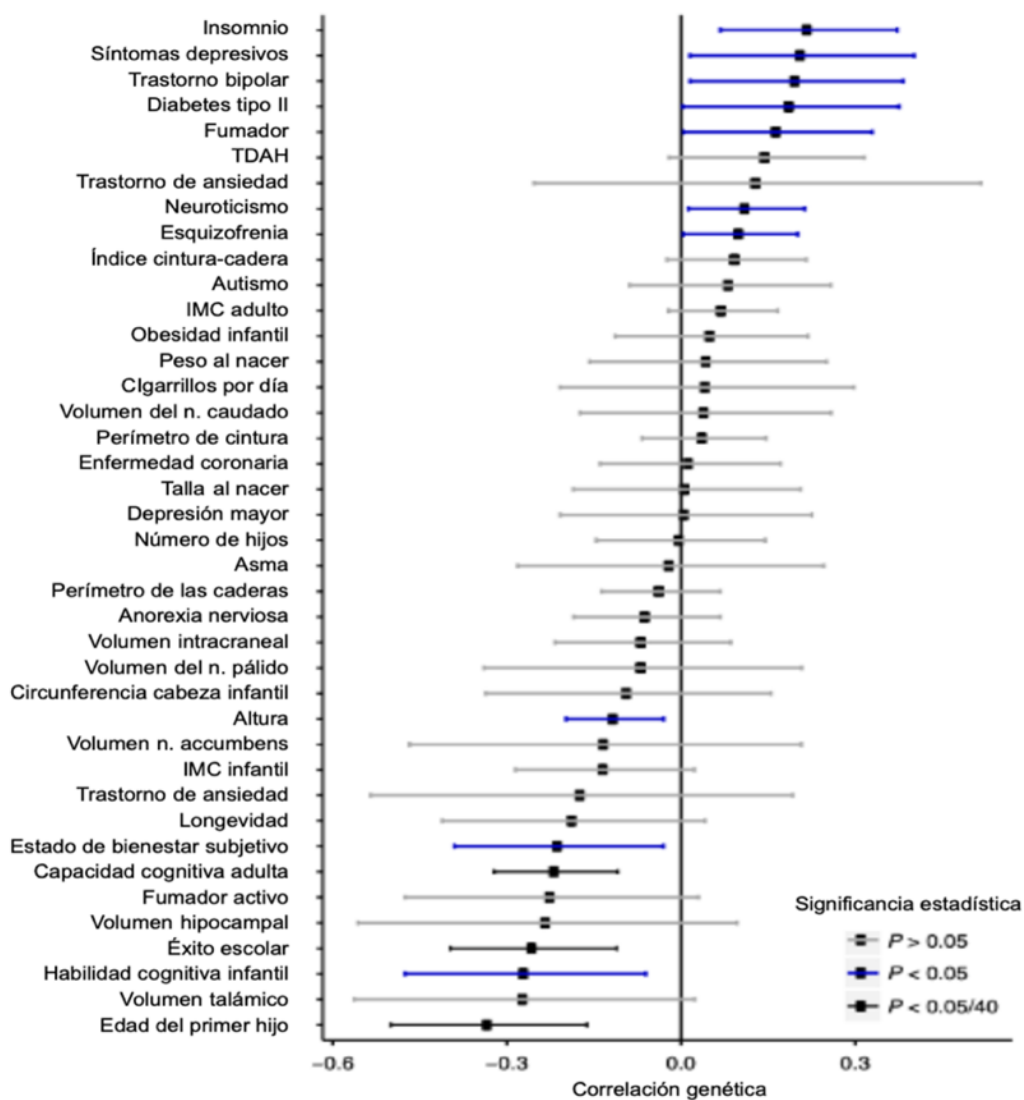


Figura 2. Resultados del estudio de Iris E. Jansen, relacionando la presencia de EA con la de diferentes enfermedades o características. Las barras horizontales representan los intervalos de confianza del 95%. La p determina la significancia estadística de los resultados obtenidos, siendo estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$. Las barras azules, por lo tanto, hacen referencia a los valores estadísticamente significativos. (Adaptado de Jansen et al. Nature Genetics, 2021).

1.2. PLACENTA Y METILACIÓN DEL ADN

La placenta es el órgano fetal encargado de comunicar el feto con la madre durante la gestación (12). Se sabe que el estrés prenatal propicia un ambiente intrauterino subóptimo, que puede desencadenar la aparición posterior de trastornos del comportamiento y del neurodesarrollo (13). En este sentido, la placenta es única a la hora de evaluar el impacto del ambiente intrauterino en el desarrollo fetal. Existen publicaciones que

relacionan el ambiente intrauterino con la alteración de la función de la placenta a través de mecanismos epigenéticos, entre los que se puede destacar la metilación del ADN (14). La metilación del ADN es un proceso mediante el que se añaden grupos metilo al ADN en dinucleótidos CpG, modificando así su función, pero sin producir cambios en la secuencia genética. La metilación del ADN generalmente conlleva una represión de la transcripción génica y el silenciamiento de los genes incluidos en dicha secuencia (15).

Es importante señalar que, si bien globalmente en el organismo, la metilación del ADN sigue una distribución bimodal (metilado o no metilado), en el caso concreto de la placenta se distribuye de manera trimodal. Esto se puede explicar por la alta presencia, tanto de dominios parcialmente metilados, como de posiciones CpG con niveles de metilación intermedios (16). La metilación del ADN se considera un puente de unión entre el medio ambiente y el genoma, y está controlada por factores tanto ambientales como genéticos. Debido a que la placenta es especialmente rica en posiciones CpG con niveles intermedios de metilación, la interacción genoma-ambiente y su impacto en la metilación del ADN es probablemente muy particular en la placenta, con grandes diferencias respecto a lo que ocurre en otros tejidos del organismo.

En los últimos años, varios estudios han revelado que la metilación del ADN en *loci* específicos puede verse influenciada por variaciones de secuencia, de modo que los genotipos individuales en un locus determinado pueden dar lugar a diferentes patrones de metilación. Estos sitios son los que se denominan *loci* de rasgos cuantitativos de metilación (mQTL, por sus siglas en inglés, *methylation Quantitative Trait Loci*) y pueden influir en el patrón de metilación en una región genómica extendida (17). En este contexto, los mQTLs se han destacado recientemente como instrumentos poderosos para revelar un número sustancial de relaciones con enfermedades y rasgos complejos que de otro modo no podríamos identificar. De hecho, un trabajo reciente de Oliva et al. concluyó que, en general, es más probable que las variantes asociadas a enfermedades y rasgos complejos den como resultado cambios detectables en la metilación del ADN, en lugar de en la expresión génica (18) (**Figura 3**).

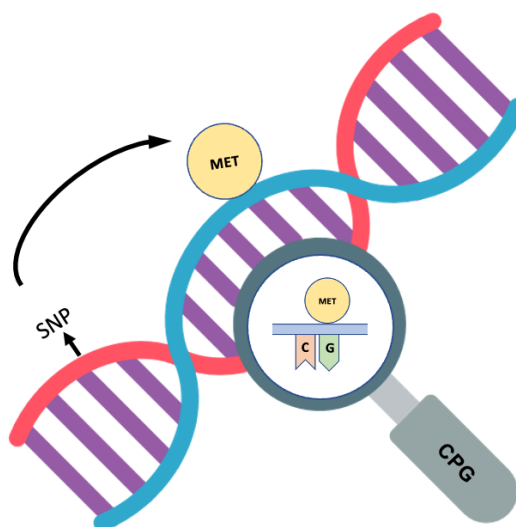


Figura 3. Se ha descubierto que ciertos SNPs pueden predisponer a la metilación de ciertas zonas del genoma o posiciones CpG concretas. Esta metilación regulará la expresión de los genes cercanos a esas regiones. Se ha establecido que la utilización de SNPs y mQTLs es útil para determinar la etiología de las asociaciones genéticas en rasgos complejos por medio de métodos como el de la aleatorización mendeliana.

En conjunto, debido a la peculiaridad de los patrones de metilación de la placenta, y al gran potencial de los mQTLs en la búsqueda de la etiología de las asociaciones genéticas, los mQTLs específicos de placenta pueden ser herramientas especialmente útiles para la identificación de dichas asociaciones, así como en la ubicación del riesgo genético en etapas prenatales. Así, nuestro grupo construyó recientemente la primera base de datos de cis-mQTLs de placenta (o mQTLs de placenta locales, que afectan a CpGs cercanas a las variantes implicadas) disponible públicamente. Esta base incluye casi 8 millones de mQTLs calculados en 368 muestras de placenta fetal de la cohorte prospectiva Infancia y Medio Ambiente (INMA) (19).

1.3. ALEATORIZACIÓN MENDELIANA

Con el fin de evitar sesgos y factores de confusión que puedan condicionar los resultados, se suele confiar en la aleatorización a la hora de diseñar los experimentos. La mayoría de las veces, la manera de hacer frente a estos sesgos es aumentando la muestra de estudio. Para intentar superar estas limitaciones sin tener que modificar el número de sujetos incluidos en el estudio, se proponen los estudios de aleatorización mendeliana (AM). Éstos también buscan relaciones causales entre factores de riesgo y

enfermedades; sin embargo, no lo hacen a través de la experimentación clínica controlada. Los estudios de AM hacen uso de técnicas genéticas de genotipado masivo de SNPs y aprovechan la aleatorización genética natural (20).

En nuestro caso, esta aleatorización genética natural hace referencia a la manera de distribuirse al azar que tienen los alelos de los SNPs en la población; como esta distribución aleatoria es innata, no está sujeta a factores de confusión. Es decir, la aleatorización no se lleva a cabo en el momento del diseño del estudio, sino que está presente de forma natural en los sujetos participantes.

Dentro de las estrategias de aleatorización mendeliana se encuentra la variante SMR (*Summary-based Mendelian Randomization*) que integra los datos de resumen de los resultados de un GWAS con datos de estudios de *loci* de rasgos cuantitativos de expresión o de metilación (e/mQTLs) para identificar, concretamente en nuestro caso, CpGs cuyos niveles de metilación están asociados con un rasgo complejo debido a la pleiotropía. El software utilizado para llevar a cabo esta investigación integra los métodos SMR y HEIDI (HEterogeneity In DEpendent Instruments), para probar la asociación pleiotrópica entre el nivel de metilación de una posición CpG concreta y un rasgo complejo de interés. Este método se puede usar para comprobar si el efecto de un SNP en el fenotipo está mediado por la metilación del ADN en una posición CpG concreta, en un órgano o tejido en particular.

Recientemente, nuestro Grupo de Investigación ha utilizado este método con GWAS de distintas enfermedades neuropsiquiátricas y nuestra base de datos de mQTLs de placenta, y ha descubierto que algunas regiones genómicas podrían contribuir al riesgo genético de la esquizofrenia, la depresión y el trastorno bipolar a través de la metilación del ADN de la placenta (19). Además, tal y como hemos apuntado anteriormente, también se han publicado estudios demostrando relación entre la genética de la EA y de enfermedades neuropsiquiátricas de aparición más temprana que tienen como posible origen el neurodesarrollo, incluyendo entre otras la esquizofrenia o el trastorno bipolar (8). Así, formulamos la hipótesis de que la metilación del ADN de la placenta puede funcionar como puente entre la genética fetal y el ambiente intrauterino, contribuyendo a su vez al posterior desarrollo de la EA. En este contexto, nuestro objetivo es conocer si existe una relación potencialmente causal entre la metilación del

ADN de la placenta y la aparición de la EA en la vida adulta. Para ello, en nuestro caso, utilizamos SMR para confrontar el GWAS de EA más grande realizado hasta la fecha (8) con nuestra base de datos de mQTLs de placenta (19), y también con otras de cerebro adulto y de cerebro fetal (21, 22), y saber de este modo si existe alguna asociación pleiotrópica potencialmente causal entre la metilación del ADN de placenta y la EA, que sea, además, específica de este órgano efímero.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. BASES DE DATOS DE MQTLs DE PLACENTA Y CEREBRO

La base de datos de mQTLs de placenta utilizada es una base propia, recientemente construida por nuestro Grupo de Investigación, y que está disponible en la siguiente web: https://smari.shinyapps.io/shiny_mqtl_placenta/. Todas las características de esta base de datos, así como las herramientas utilizadas para su cálculo están descritas en nuestro *preprint* de Cilleros-Portet et al, MedRxiv 2023 (19), ahora en revisión en *Nature Communications*. Brevemente, obtuvimos datos de metilación del ADN de la placenta y de genotipado de genoma completo por medio de los arrays EPIC y GSA de Illumina, respectivamente. Construimos los mQTLs utilizando el software TensorQTL, utilizando como covariables el sexo fetal, los cinco primeros componentes principales de los datos de genotipado y una estimación de la composición celular de las muestras de placenta. Para el cálculo de cis-mQTLs se consideraron todos los SNPs en ventanas de 0,5 Mb aguas arriba y aguas abajo de cada CpG.

Las muestras de placenta utilizadas en este estudio se obtuvieron de la cohorte INMA. Esta cohorte es el resultado de un seguimiento de 2506 parejas de madre-hijo/a, desde el embarazo hasta la actualidad (14 años). De estas 2506 parejas, 397 fueron seleccionadas al azar para recoger muestras de placenta. Tras los experimentos de metilación y genotipado, y distintos controles de calidad, finalmente se utilizaron 368 muestras para el cálculo de los mQTLs de placenta. Los datos de las madres y la gestación se pueden ver en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características de las mujeres de la cohorte INMA cuyas placentas fueron incluidas en la base de datos de mQTLs. N hace referencia al tamaño muestral. DE hace referencia a la desviación estándar y se utiliza para

hacer un cálculo del grado de dispersión en el que los puntos de datos individuales difieren de la media de la muestra total. La N desconocidos hace referencia al número de datos desconocidos para cada variable.

Variable	Categoría	INMA (n = 368)		
		N	Media \pm DE %	N desconocidos
Tabaco durante el embarazo	Si	52	14.13%	5
	No	311	84.51%	
Edad materna	Media (SD)	368	30.85 \pm 3.95	0
Paridad	0	208	56.52%	0
	≥ 1	160	43.47%	
Educación materna	Básica o sin educación	68	18.47%	0
	Secundaria	172	46.73%	
	Universitaria	128	34.78%	
Peso al nacer (g)	Media (SD)	368	3,278 \pm 440.55	0
Edad gestacional (semanas)	Media (SD)	368	39.71 \pm 1.30	0
Nacimiento pretérmino (<37 semanas)	Si	10	2.71%	0
	No	358	97.28%	
Etnia	Blanca	347	94.29%	5
	No blanca	16	4.34%	
Sexo del recién nacido	Femenino	189	51.35%	0
	Masculino	179	48.64%	
Nivel socioeconómico	I+II	130	35.32%	0
	III	100	27.17%	
	IV+V	138	37.50%	

En cuanto a la base de datos de cis-mQTLs de cerebro, fue obtenida de un estudio publicado en 2018 de Qi et al. (21), en la que se meta-analizaron los cis-mQTLs de tres conjuntos de datos diferentes: 468 muestras de la región cortical del cerebro del estudio *ROSMAP*, 166 de cerebro fetal del estudio de Hannon et al. y 526 muestras de

la corteza frontal (22). La suma de todas las muestras dio como resultado un tamaño muestral final de 1160 muestras de cerebro, y casi 6 millones de cis-mQTLs. Como en el caso de la base de datos mQTLs de cerebro fetal, los datos de cerebro también se descargaron del portal de datos SMR.

La segunda base de datos, la de mQTLs de cerebro fetal, se obtuvo de un estudio publicado en 2015 por Hannon et al. (23). En resumen, en este estudio calcularon mQTLs en 166 muestras de cerebro fetal humano. Los datos de metilación los obtuvieron con el array de metilación Infinium HumanMethylation 450K de Illumina, y el mapeo de los mQTL lo realizaron con el paquete MatrixEQTL, determinando la ventana cis en 0,05 Mb. Sólo se pusieron a disposición mQTLs con $p < 1,5 \times 10^{-9}$, lo que dio como resultado 556.513 cis-mQTLs de cerebro fetal que se descargaron del portal SMR (<https://yanglab.westlake.edu.cn/software/smr/#DataResource>) (24).

2.2. GWAS SELECCIONADO

Se utilizó el GWAS de EA más grande realizado hasta la fecha. Se trata del metaanálisis llevado a cabo por I. Jansen et al. (8) en 2019. En este metaanálisis se incluyó una muestra de 455.258 individuos de origen europeo (47.793 casos y 328.320 controles), en los que se analizaron 10.847.151 SNPs. Dichos participantes se obtuvieron de múltiples fuentes: el Consorcio de Genómica Psiquiátrica (PGC-ALZ), el Proyecto de Secuenciación de la Enfermedad de Alzheimer (ADSP), el Proyecto Internacional de Genómica del Alzheimer (IGAP) y el Biobanco del Reino Unido (UKB).

2.3. MULTI-ALLELIC SMR

Se llevó a cabo un análisis SMR considerando los SNPs que participan en los mQTLs como variables instrumentales, la metilación de cada CpG de esos mismos mQTLs como la exposición y la EA como resultado. El análisis SMR basado en múltiples SNPs (SMR-multi) se realizó utilizando el software SMR (24). SMR integra estadísticos de resumen de GWAS y QTL para probar asociaciones pleiotrópicas entre rasgos cuantitativos, como la metilación o la expresión, y rasgos complejos, como, por ejemplo, una enfermedad (en nuestro caso, la EA). Más concretamente, SMR-multi incluye múltiples SNPs en un locus mQTL en la prueba SMR para calcular el efecto causal de una exposición en un resultado. Primero, SMR-multi seleccionó todos los SNP con

$p < 5 \times 10^{-8}$ en la región *cis* (a una distancia máxima de 0,5Mb de cada CpG). En segundo lugar, eliminó los SNPs en desequilibrio de ligamiento con el SNP más fuertemente asociado. Luego, el efecto causal de la exposición (metilación) sobre el resultado (EA) se estimó en cada uno de los SNPs que habían pasado el filtro anterior. Adicionalmente, se realizó la prueba HEIDI. HEIDI utiliza múltiples SNPs en una región *cis*-mQTL para distinguir la pleiotropía del ligamiento entre SNPs. Finalmente, se seleccionaron asociaciones pleiotrópicas significativas entre la metilación del ADN de la placenta y la EA; es decir, aquellas con P_{SMR} (valor de p del test SMR) corregido por Bonferroni $< 0,05$ y P_{HEIDI} (valor de p del test HEIDI) $> 0,05$ (sin mostrar heterogeneidad).

En este trabajo llevamos a cabo los test SMR y HEIDI mediante el software SMR con el GWAS de EA anteriormente descrito, y con las bases de datos de placenta, cerebro y cerebro fetal.

2.4. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Una vez obtenidos los SNPs y las CpGs asociadas a la enfermedad, se realizó una búsqueda en portales genómicos como Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) (25) y el de la UCSC (*University of California Santa Cruz*) (<https://genome.ucsc.edu>) (26), para localizar los genes más próximos. Seguidamente, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre esos genes en Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) (27) para así poder comprender mejor la relación entre los sitios de metilación y el desarrollo de la EA. También se investigó la expresión de cada uno de los genes en el portal *protein atlas* (<https://www.proteinatlas.org>), (28) para así conocer si verdaderamente dichos genes se expresan en la placenta.

3. RESULTADOS

Tras realizar el análisis SMR en el GWAS de EA y la base de datos de mQTLs de placenta, y tal y como se observa en la **Tabla 2**, 7 CpGs mostraron asociación con la EA en placenta. Dichas posiciones se encuentran en los cromosomas 2, 7, 11 y 19. Tras una búsqueda en los portales genómicos determinamos que dichas CpGs se situaban cerca de los siguientes genes: *BINI*, *EPHA1 – ASI*, *MS4AE*, *PICALM*, *BCL3*, *TRAPPC6A*.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en el estudio SMR en placenta. Se detallan las CpGs de interés, la posición que ocupan dentro de cada cromosoma, el gen para el que codifica cada región, el tamaño de efecto o beta resultante de la aleatorización mendeliana (b_{SMR}), el error estándar de ese tamaño de efecto (se_{SMR}), el valor de p de la función multi-SMR, el valor de p del test HEIDI y el valor de p de la aleatorización mendeliana ajustado por Bonferroni ($p_{SMR_multi_bonf}$).

BRAIN							
CpG	Posición	Gen	b_{SMR}	se_{SMR}	p_{SMR_multi}	p_{HEIDI}	$p_{SMR_multi_bonf}$
cg21078193	2:127886416	<i>BIN1</i>	-4.058	0.68422	4.631868e-08	0.09293866	0.00512367974424
cg05908241	7:143110762	<i>EPHA1 – AS1</i>	-0.424526	0.0974223	2.760291e-07	0.1151425	0.0305337869838
cg08238829	11:60005424	<i>MS4A4E</i>	-0.220051	0.0335882	6.686365e-11	0.1682	7.3963232357e-06
cg18684128	11:60021948		2.68683	0.469933	1.295038e-07	0.8389344	0.0143254513484
cg05186239	11:85811238	<i>PICALM</i>	-1.43722	0.284329	3.184643e-07	0.0770675	0.0352278839374
cg09109179	19:45267258	<i>BCL3</i>	-0.503917	0.0906654	3.704474e-08	0.0667423	0.00409781504932
cg26097728	19:45673701	<i>TRAPPC6A</i>	-1.538	0.238044	1.779474e-10	0.2663953	1.96841854932e-05

Las CpGs más llamativas fueron cg05186239, cg21078193 y cg26097728 (**Figura 4**). cg05186239 se localiza en el promotor del gen *PICALM*, localizado en el cromosoma 11 (**Figura 4a**). La localización de esta CpG asociada con la EA sugiere que los niveles de metilación en esta posición podrían tener implicaciones en la regulación de la expresión de dicho gen. cg21078193, por su parte, se localiza en el promotor del gen *BIN1*, en el cromosoma 2 (**Figura 4b**) y también podría tener implicaciones en la regulación de la expresión del gen. Finalmente, cg26097728 está ubicada en el cuerpo del gen *TRAPPC6A*, localizado en el cromosoma 19 (**Figura 4c**). Su localización sugiere implicación funcional a nivel génico.

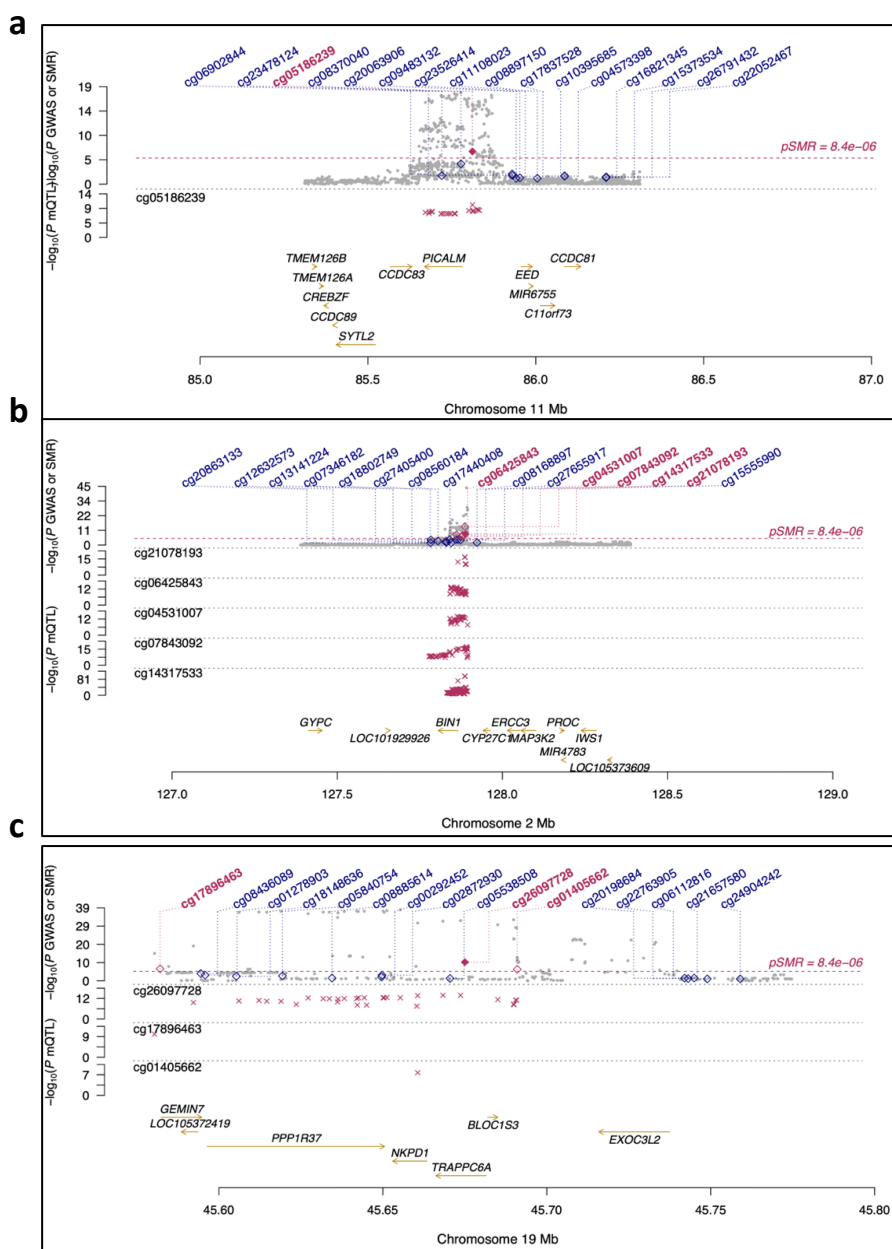


Figura 4. El eje Y muestra el logaritmo de los valores P de los conjuntos de datos mQTL y GWAS, así como el que proviene de SMR. Los diamantes y las flechas doradas representan genes. En concreto, los diamantes vacíos representan genes cuyo valor de P en el análisis SMR no alcanzó significación estadística, mientras que el diamante granate representa el valor estadísticamente significativo. **a)** Representación gráfica de los datos relacionados con el gen *PICALM*. **b)** Representación gráfica de los datos relacionados con el gen *BIN1*. **c)** Representación gráfica de los datos relacionados con el gen *TRAPPC6A*.

Al realizar el mismo análisis SMR con la base de datos de mQTLs de cerebro, también encontramos asociaciones. Concretamente hallamos 9 CpGs cuyos niveles de metilación se relacionaban con la EA, en los cromosomas 6, 7, 16 y 19. En este caso los genes más cercanos a estas posiciones CpG fueron *HLA-DRB1*, *ACO 73842.19*, *STAG3*, *KAT8*, *TOMM40* y *APOC1*, tal y como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Se resumen los resultados obtenidos en el estudio del tejido cerebral adulto. Se detallan las CGs de interés, la posición que ocupan dentro de cada cromosoma, el gen para el que codifica cada región, la b resultante de la aleatorización mendeliana (b_SMR), el error estándar de la aleatorización mendeliana (se_SMR), el p valor de la multi-SMR, el p valor del test HEIDI y el p valor de la aleatorización mendeliana por Bonferroni (p_SMR_multi_bonf).

BRAIN							
CpG	Posición	Gen	b SMR	se SMR	p SMR multi	p HEIDI	p SMR multi bonf
cg17480035	6:32571227	<i>HLA-DRB1</i>	0.0190058	0.00388783	1.946768e-08	0.2982159	0.00169479781776
cg22906224	7:99734661	<i>ACO 73842.19</i>	-0.00967112	0.0019737	4.053677e-07	0.07939849	0.0352900958589
cg13210467	7:99785671	<i>STAG3</i>	-0.0442091	0.00948015	4.465352e-07	0.667167	0.0388740149064
cg04778012	7:99790971		-0.0232498	0.0042229	5.135778e-08	0.3957366	0.00447105425346
cg10084644	7:99790971		-0.0274276	0.00516314	8.514267e-08	0.5445562	0.00741226542219
cg15140703	7:99785671		-0.0321333	0.0061158	1.779642e-07	0.499975	0.0154930293594
cg02220965	16:31128615	<i>KAT8</i>	0.0182453	0.00425186	4.028198e-07	0.2409379	0.0350682833286
cg02613937	19:45396665	<i>TOMM40</i>	-0.436228	0.0744903	3.988037e-09	0.4476072	0.000347186537109
cg00397545	19:45418790	<i>APOC1</i>	0.306847	0.0498153	4.782541e-10	0.149861	4.16353671837e-05

Finalmente, al realizar le mismo análisis SMR que en los dos casos anteriores, pero en este caso con la base de datos de mQTLs de cerebro fetal, se encontraron tres asociaciones en los cromosomas 2 y 6. En este caso, los genes más cercanos ubicados junto a las CpGs resultantes fueron: *BINI*, *TSBP1* y *BTNL2*, mostrados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Se resumen los resultados obtenidos en el estudio del tejido cerebral fetal. Se detallan las CGs de interés, la posición que ocupan dentro de cada cromosoma, el gen para el que codifica cada región, la b resultante de la aleatorización mendeliana (b_SMR), el error estándar de la aleatorización mendeliana (se_SMR), el p valor de la multi-SMR, el p valor del test HEIDI y el p valor de la aleatorización mendeliana por Bonferroni (p_SMR_multi_bonf).

FETAL BRAIN							
CpG	Posición	Gen	b SMR	se SMR	p SMR multi	p HEIDI	p SMR multi bonf
cg06223080	2:127859766	<i>BIN1</i>	0.46497	0.0809722	9.409902e-09	0.6448613	6.3883824678e-05
cg09452510	6:32287329	<i>TSBP1</i>	0.141982	0.0509755	1.349941e-06	0.1555769	0.009164749449
cg16615014	6:32376348	<i>BTNL2</i>	-0.777615	0.172755	2.022607e-06	0.7093766	0.013731478923

4. DISCUSIÓN

A pesar de que se ha demostrado la relación de ciertos genes con la EA, hasta ahora no se ha planteado la posibilidad de que algunos de esos genes predispongan a la enfermedad a través de la placenta. Éste es el primer estudio que trata de ubicar parte del riesgo genético de la EA en etapas prenatales y más concretamente en el neurodesarrollo, a través del estudio de la metilación de la placenta.

La CpG más fuertemente asociada con EA en placenta se encuentra en el promotor del gen *BIN1*. Hay trabajos que lo consideran el segundo locus de riesgo más importante para la EA (por detrás del *APOE*). En el cerebro humano adulto, este gen se expresa principalmente en oligodendrocitos, células microgliales, neuronas glutamatérgicas y gabaérgicas y se sabe que su expresión está reducida en los cerebros de pacientes con EA. No obstante, la forma en la que esta expresión reducida de *BIN1* puede afectar la patogénesis de la EA sigue siendo poco conocida (29), aunque este gen se ha relacionado con varias vías importantes de la patogenia de la EA. Por lo tanto, *BIN1* ha sido el centro de muchas investigaciones y se ha hecho un gran esfuerzo para conocer el mecanismo por el cual podría estar involucrado en el proceso patogénico de la EA. Hoy en día existen evidencias que apoyan que este gen puede participar en el desarrollo de la EA a través de varias vías, incluida la de las proteínas tau y amiloide, así como desencadenando procesos de inflamación o apoptosis (30). Además, hay estudios que

han demostrado una alteración en la expresión de *BINI* en los cerebros que desarrollan EA. Sin embargo, su papel exacto sigue siendo desconocido.

Por otro lado, en el *protein atlas* (28) se incluye la placenta entre los tejidos en los que se expresa el gen *BINI*. En principio, este hecho sugiere que este gen podría participar de manera activa en el desarrollo fetal. Esta posibilidad ya ha sido estudiada por Harriet P. et al., quienes establecieron una relación entre el neurodesarrollo y este gen. *BINI* participaría en la formación de túbulos T, encargados de dar estabilidad durante el desarrollo a ciertos tejidos, entre los que se encontraría el tejido nervioso y los músculos (31). En trabajos previos que estudiaron la metilación del ADN de la placenta en relación con otras enfermedades, se estableció que la expresión de *BINI* participaba en la diferenciación celular, la formación de regiones sinápticas y axones, y la proyección celular (32).

La CpG cg05186239, otra de las resultantes de nuestro análisis, se relaciona con el gen *PICALM*. Varios estudios de GWAS han considerado este gen como el tercero más relacionado con la patogenia de la EA, detrás del *APOE* y de *BINI*. *PICALM* codifica una proteína adaptadora de clatrina que desempeña un papel fundamental en la endocitosis y la autofagia. Es una proteína muy ubicua, expresada en varios tejidos como el cerebro, los músculos, los riñones, la vejiga urinaria, los tejidos conectivos, la médula ósea, los tejidos linfoides, incluso en la placenta. Se ha visto que interacciona con otros genes, como *BINI* o *EPHA1*, los cuales también tienen cierta asociación con la EA (33). En la placenta se expresa de una manera abundante (28).

Por otro lado, Ponomareva et al. aportaron datos que indican que *PICALM* aumenta el riesgo de desarrollar EA principalmente mediante la modulación de la producción, el transporte y la eliminación de β -amiloide. Además, este gen también se relacionó con una edad de inicio más temprana de la EA, un fenotipo clínico específico de la enfermedad. Este mismo estudio aportó que la alteración de *PICALM* puede estar relacionada con las conexiones cerebrales. Los resultados obtenidos en el estudio de Ponomareva et al. sugieren que la reducción de la conectividad en el electroencefalograma se ve disminuida en los pacientes homocigotos para ciertos alelos de *PICALM*, lo que en estos individuos puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de EA (34). Finalmente, y apoyando nuestra hipótesis de que las enfermedades como la EA podrían ser

consecuencia de sucesos acontecidos durante el neurodesarrollo, numerosos estudios han demostrado que *PICALM* podría ejercer una función de control sobre el crecimiento de muchas células del organismo, incluidas las neuronas. Los estudios han encontrado que si se bloquea el transporte de Golgi (lo que podría ser una consecuencia de mutaciones en *PICALM*) se impide el crecimiento de axones y dendritas en las neuronas del hipocampo durante el neurodesarrollo (35).

En cuanto al gen *MS4A4E*, se encontraron dos CpGs de interés (cg08238829 y cg18684128) cerca de este locus. Este gen codifica una proteína de 4 dominios que abarca la membrana celular, pero se sabe poco más sobre su función. No obstante, se sabe que puede estar fuertemente asociado con el desarrollo de EA. Ebbert et al. y Hamblin estudiaron su posible asociación con la EA, pero no obtuvieron resultados estadísticamente significativos de que dicho gen aumentara la posibilidad de sufrir la enfermedad. (36, 37). El *protein atlas* muestra expresión de este gen en placenta (28). Sin embargo, a fecha de hoy no se han publicado estudios de interés sobre su posible función en etapas prenatales.

TRAPPC6A, relacionado con la CpG cg26097728, también se incluye entre los genes cuya expresión en placenta es considerable (28). Este gen codifica una subunidad del complejo *TRAPP* y juega un papel en el transporte retículo endoplásmico – aparato de Golgi. Mohamoud et al. concluyen en su estudio que *TRAPPC6A* se suma potencialmente a una lista creciente de proteínas del complejo *TRAPP* (*TRAPPC2*, *TRAPPC9*, *TRAPPC11*) que se encuentran involucradas en trastornos con probable origen en el neurodesarrollo. En concreto, *TRAPPC6A* se ha implicado en la patogenia de la EA, ya que mutaciones en este gen afectan a la estabilidad de dicha subunidad, dificultando el transporte de moléculas entre los orgánulos mencionados previamente (38). En 2019, Rygiel et al. estudiaron la relación entre la metilación de la placenta y los problemas del neurodesarrollo. Concluyeron que los niveles de metilación cerca del locus correspondiente a *TRAPPC6A* pueden influir en el desarrollo neuronal. Aunque se sabe poco sobre el gen *TRAPPC6A* en concreto, se conoce que otros genes de su familia como *TRAPP9* y *TRAPP11* están asociados con discapacidad intelectual y trastornos del movimiento respectivamente (39).

Otra de las CpGs de interés obtenidas en nuestro análisis, cg09109179, se relaciona con el gen *BCL3*. Un estudio concluyó que *BCL3* estaba aumentado en el cerebro del 27% de los pacientes con EA (40). Por otro lado, El *protein atlas* determina que este gen tiene una expresión en placenta especialmente elevada (28), lo que le podría otorgar un papel activo en el desarrollo fetal. Existen estudios que han tratado de relacionar la metilación del ADN en genes como *BCL3* y el desarrollo embrionario. Ya en 2012, Gao et al. establecieron que la restricción de la metilación del ADN del útero tenía como consecuencia una expresión aumentada de genes que, como consecuencia de la metilación excesiva estaban silenciados (*BCL3* entre ellos). En general, estos resultados sugieren que la metilación del ADN uterino juega un papel importante para el correcto desarrollo embrionario durante el embarazo temprano (41). Previamente, en 1999, Muggia et al. ya mencionaron que la modulación de genes como *BCL3*, expresados en células del trofoblasto, podrían tener un papel clave en la embriogénesis, así como en la modulación de la placenta (42).

Por otro lado, el gen *EPHA1* – *ASI*, también cercano a una CpG de interés (cg05908241), parece guardar cierta relación con el desarrollo de la placenta y con el correcto funcionamiento del aparato reproductor femenino, sobre todo durante el embarazo (43). Su expresión en placenta también es considerable (28). Se ha visto que la regulación de este gen afecta a procesos como la implantación, el desarrollo de la placenta o la formación de tejidos como el trofoblasto (43). Otra función importante que parece tener este gen (así como el resto de los genes de la familia *Eph*) es el de la formación de conexiones neuronales. Hay estudios que demuestran que son responsables de evitar que las células nerviosas y los axones entren en un territorio inapropiado. Esto significaría que dichos genes, entre los que se encontraría *EPHA1*, se encargan de modular la formación del sistema nervioso, es decir, dirigen el neurodesarrollo. Concretamente, se cree que participa como guía de las células de la cresta neural (44).

En estudios de experimentación con embriones también se ha visto que la inyección de proteínas de fusión *EphA1* en embriones *in vitro* interrumpe específicamente las interacciones del receptor ephrinA-EphA, lo que conduce a la inhibición del cierre del tubo neural espinal. La modificación en el desarrollo neural no alteraba el resto del crecimiento ni la progresión del desarrollo. Los resultados de este experimento parecen apoyar aún más la hipótesis de que las variaciones en la expresión de dicho gen podrían

tener un efecto negativo sobre el desarrollo del sistema nervioso central, lo que podría demostrar su importancia durante el neurodesarrollo (45). Toda esta evidencia acumulada podría explicar parcialmente el hallazgo de Jansen et al. que establecía una relación inversamente proporcional entre la capacidad cognitiva en la infancia y el desarrollo de EA en el adulto (8).

En cuanto a las posiciones CpG identificadas en tejido cerebral, el gen más cercano a la CpG más fuertemente asociada fue *HLA-DRB1*, que se ubica en una región genómica altamente polimórfica ubicada en el cromosoma 6, asociada con la inmunocompetencia y la histocompatibilidad. Lu et al. proporcionaron un apoyo estadístico significativo para una asociación entre el polimorfismo *HLA-DRB1* y la EA (46). Otros genes relacionados con las CpGs encontradas en tejido cerebral son *STAG3* y *TOMM40*. *STAG3* también se ha visto involucrado en la patogenia de la EA (47). En cuanto al gen *TOMM40*, hay estudios preliminares que muestran que la expresión de este gen aumenta en las células de la microglía durante la respuesta proinflamatoria, lo que concuerda con una de las teorías patogénicas de la EA (48).

Entre las CpGs resultantes de nuestro análisis de tejido cerebral fetal, se encuentra una cercana a *BINI*. Este gen, previamente descrito en el presente trabajo, también es el gen más cercano a la CpG más significativa en placenta. De este modo, es el único común a dos tejidos en el presente estudio (placenta y cerebro fetal). Los exclusivos de cerebro fetal son *TSBP1* y *BTNL2*. No se han encontrado trabajos relacionando estos genes con la EA, ni siquiera relacionándolos con el desarrollo fetal.

Tras mapear las CpGs obtenidas de los estudios SMR a los genes más cercanos y estudiar la literatura relacionada con los mismos, se ha observado que (a excepción de *BINI*) no existe solapamiento entre los genes identificados en la placenta y los que provienen de tejido cerebral. Esto podría indicarnos que nuestros hallazgos son específicos de la placenta, y, por lo tanto, lo que observamos en este órgano es potencialmente causal y específico del mismo. Así, las CpGs asociadas a EA en placenta estarían mediando en el riesgo genético a padecer la enfermedad.

Cabe recordar que nuestro objetivo era fundamentalmente buscar la relación entre la placenta como puente entre el ambiente intrauterino y el desarrollo y el crecimiento fetal, y la posterior aparición de la EA. La razón por la que hemos estudiado también

el tejido cerebral ha sido porque queríamos ver si había solapamiento entre los tejidos o, por el contrario, tal y como parece el caso, lo que encontramos en placenta es realmente específico y no un mero reflejo de lo que pasa en el cerebro. El gen *BINI* parece ser una excepción. Esto puede ser importante porque puede que en este caso la placenta sí que esté funcionando como espejo de lo que ocurre en el cerebro. O simplemente puede ser que *BINI* tenga un rol en ambos tejidos.

Las principales limitaciones del presente estudio son, por una parte, que no podemos demostrar causalidad. SMR informa sobre asociaciones pleiotrópicas, derivadas de un único SNP, excluyendo las que provienen del ligamiento entre diferentes SNPs, asociados de forma independiente a patrones moleculares y rasgos o enfermedades. Nuestro estudio deberá ser complementado con otros tipos de análisis. Particularmente, contrastar la relación entre los niveles de metilación de nuestras CpGs y la expresión de los genes adyacentes en placenta resultaría muy esclarecedor, y ayudaría a entender la posible implicación de la metilación del ADN en las posiciones identificadas, en la regulación génica. Por otro lado, otra limitación importante es que, al comparar los resultados de SMR obtenidos de distintas bases de mQTLs, estamos obviando que estas bases no han sido construidas de igual manera, y, por tanto, muy posiblemente estamos subestimando el solapamiento que pudiera existir entre los diferentes tejidos estudiados.

5. CONCLUSIONES

En definitiva, concluimos que las modificaciones en la metilación del ADN de la placenta, como mecanismo de modulación de su expresión, pueden tener una implicación en procesos que se cree, están relacionados con el desarrollo de la EA. Cerca de las CpGs que hemos hallado en placenta, se encuentran los genes *BINI*, *MS4AE*, *PICALM*, *TRAPPC6A*, *EPAHI-ASI* y *BCL3*. Se cree que *BINI* podría relacionarse con el desarrollo fetal mediante varias vías, siendo las más importantes la diferenciación celular, la formación de regiones sinápticas y axones, y la proyección celular. *PICALM* en cambio participaría en la formación de cúmulos de β -amiloide. El papel de *BCL3* y *EPAHI-ASI* parece estar más relacionado con el desarrollo de la placenta y en las modificaciones del aparato reproductor femenino durante el embarazo. En cuanto a *MS4AE* y *TRAPPC6A*, no se han encontrado datos de interés en su relación con la EA

o el desarrollo fetal. Entre los genes hallados en tejido cerebral, *HLA-DRB1*, *STAG3* y *TOMM40* han sido también relacionados en numerosos estudios con la etiopatogenia de la EA. No se puede decir lo mismo, en cambio, de *TSBP1* y *BTNL2*, los genes obtenidos del tejido cerebral fetal, que merecen ser estudiados más a fondo.

En conclusión, nuestros resultados indican que parte de la genética de susceptibilidad a EA podría expresarse en etapas prenatales mediante la metilación del ADN de la placenta. Las posiciones CpG implicadas se encuentran cerca de genes relacionados con el neurodesarrollo y parecen específicas de la placenta. No obstante, serán necesarias más investigaciones para corroborar nuestros hallazgos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Cabrera MJA, Martínez Pérez R, Ravelo AG, Dayleen I, Rodríguez H, Pérez G, et al. Pathogenesis and current treatment of Alzheimer's disease [Internet]. Sld.cu. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v48n3/far16314.pdf>
2. Atri A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: Diagnosis and management. *Med Clin North Am* [Internet]. 2019;103(2):263–93. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0025712518301317?token=1DAA1A9D386C3D10E9703B4EE23F2D307C1C0C00F24E2D5CAF99DF69C53E02813531454A07FD6BA28204F071986A7C94&originRegion=eu-west-1&originCreation=20221212113119>
3. Zhou Q, Zhao F, Lv Z-P, Zheng C-G, Zheng W-D, Sun L, et al. Association between *APOC1* polymorphism and Alzheimer's disease: a case-control study and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2014 ; 9(1) : e87017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087017>
4. Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2020 18(11):1106–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X18666200528142429>
5. Janelidze S, Mattsson N, Palmqvist S, Smith R, Beach TG, Serrano GE, et al. Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nat Med* [Internet]. 2020; 26(3):379–86. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0755-1>
6. Estudio de asociación de genoma completo (GWAS) [Internet]. Genome.gov. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Estudio-de-asociacion-de-genoma-completo>
7. Garitazelaia Gonzalez A, Endometriosis eta ezaugarri antropometriko eta menstrualak: erlazio genetiko kausalen bila, TFG, Leioa, UPV-EHU, 2021
8. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet* [Internet].

- 2019;51(3):404–13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>
9. Pickering F. Función de BIN1 en la prevención de la sinaptotoxicidad en la enfermedad de Alzheimer [Internet]. Neurodiem. Disponible en: <https://www.neurodiem.es/news/role-for-bin1-in-preventing-synaptotoxicity-in-alzheimers-disease-3UpTYyDyyJewLmBkJ8uxlx?locale=es-ES>
 10. *ADAM10* ADAM metallopeptidase domain 10 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/102>
 11. *KAT8* lysine acetyltransferase 8 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Nih.gov. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84148>
 12. Lester BM, Marsit CJ. Epigenetic mechanisms in the placenta related to infant neurodevelopment. Epigenomics [Internet]. 2018;10(3):321–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2217/epi-2016-0171>
 13. O'Donnell K, O'Connor TG, Glover V. Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HPA axis and role of the placenta. Dev Neurosci [Internet]. 2009;31(4):285–92. Disponible en: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000216539>
 14. Novakovic B, Saffery R. The ever growing complexity of placental epigenetics - role in adverse pregnancy outcomes and fetal programming. Placenta [Internet]. 2012;33(12):959–70. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400412003669>
 15. Wikipedia.org. Recuperado el 11 de abril de 2023, de https://es.wikipedia.org/wiki/Metilaci3n_del_ADN
 16. Konwar C, Del Gobbo G, Yuan V, Robinson WP. Considerations when processing and interpreting genomics data of the placenta. Placenta [Internet]. 2019; 84:57–62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2019.01.006>
 17. Smith AK, Kilaru V, Kocak M, Almli LM, Mercer KB, Ressler KJ, et al. Methylation quantitative trait loci (meQTLs) are consistently detected across ancestry, developmental stage, and tissue type. BMC Genomics [Internet]. 2014;15:145. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-145>

18. Oliva M, Demanelis K, Lu Y, Chernoff M, Jasmine F, Ahsan H, et al. DNA methylation QTL mapping across diverse human tissues provides molecular links between genetic variation and complex traits. *Nat Genet* [Internet]. 2023; 55(1):112–22. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41588-022-01248-z>
19. Cilleros-Portet A, Lesseur C, Marí S, Cosin-Tomas M, Lozano M, Irizar A, et al. Potentially causal associations between placental DNA methylation and schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. *medRxiv* [Internet]. 2023 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36945560/>
20. de Cultura Científica U. Aleatorización mendeliana: ¿una alternativa a los ensayos clínicos? [Internet]. *UBUinvestiga*. 2021. Disponible en: <https://ubuinvestiga.es/aleatorizacion-mendeliana-alternativa-ensayos-clinicos/>
21. Qi T, Wu Y, Zeng J, Zhang F, Xue A, Jiang L, et al. Identifying gene targets for brain-related traits using transcriptomic and methylomic data from blood. *Nat Commun* [Internet]. 2018 ; 9(1):1–12. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-04558-1>
22. Jaffe AE, Gao Y, Deep-Soboslay A, Tao R, Hyde TM, Weinberger DR, et al. Mapping DNA methylation across development, genotype and schizophrenia in the human frontal cortex. *Nat Neurosci* [Internet]. 2016 ; 19(1):40–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4181>
23. Hannon E, Spiers H, Viana J, Pidsley R, Burrage J, Murphy TM, et al. Methylation QTLs in the developing brain and their enrichment in schizophrenia risk loci. *Nat Neurosci* [Internet]. 2016 19(1):48–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4182>
24. SMR [Internet]. *Edu.cn*. Disponible en: <https://yanglab.westlake.edu.cn/software/smr/>
25. The Human Protein Atlas [Internet]. *Proteinatlas.org*. [citado el 21 de abril de 2023]. Disponible en: <http://www.proteinatlas.org>
26. Ensembl genome browser 109 [Internet]. *Ensembl.org*. [citado el 21 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.ensembl.org/index.html>
27. UCSC Genome Browser Home [Internet]. *Ucsc.edu*. [citado el 21 de abril de 2023]. Disponible en: <https://genome.ucsc.edu>

28. PubMed [Internet]. PubMed. [citado el 21 de abril de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>
29. Saha O, Melo de Farias AR, Pelletier A, Siedlecki-Wullich D, Gadaut J, Landeira BS, et al. Alzheimer's disease risk gene *BINI* modulates neural network activity through the regulation of L-type calcium channel expression in human induced neurons [Internet]. bioRxiv. 2022. p. 2022.01.18.476601. Disponible en: <http://biorxiv.org/content/early/2022/07/09/2022.01.18.476601.abstract>
30. Gao P, Ye L, Cheng H, Li H. The mechanistic role of Bridging integrator 1 (*BINI*) in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol* [Internet]. 2021;41(7):1431–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-020-00926-y>
31. Lo HP, Lim Y-W, Xiong Z, Martel N, Ferguson C, Ariotti N, et al. Cavin4 interacts with Bin1 to promote T-tubule formation and stability in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* [Internet]. 2021; 220(12). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34633413/>
32. Lim JH, Kang Y-J, Bak HJ, Kim MS, Lee HJ, Kwak DW, et al. Epigenome-wide DNA methylation profiling of preeclamptic placenta according to severe features. *Clin Epigenetics* [Internet]. 12(1):128. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-020-00918-1>
33. Ando K, Nagaraj S, Küçükali F, de Fisenne M-A, Kosa A-C, Doeraene E, et al. *PICALM* and Alzheimer's disease: An update and perspectives. *Cells* [Internet]. 2022 ;11(24):3994. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11243994>
34. Ponomareva N, Andreeva T, Protasova M, Konovalov R, Krotchenkova M, Malina D, et al. Genetic association between Alzheimer's disease risk variant of the *PICALM* gene and EEG functional connectivity in non-demented adults. *Front Neurosci* [Internet]. 2020;14:324. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2020.00324>
35. Bushlin I, Petralia RS, Wu F, Harel A, Mughal MR, Mattson MP, et al. Clathrin assembly protein *API80* and *CALM* differentially control axogenesis and dendrite outgrowth in embryonic hippocampal neurons. *J Neurosci* [Internet].

- 2008 ; 28(41):10257–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.2471-08.2008>
36. Ebbert MTW, Boehme KL, Wadsworth ME, Staley LA, Mukherjee S, Crane PK, et al. Interaction between variants in *CLU* and *MS4A4E* modulates Alzheimer's disease risk. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2016;12(2):121–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2015.08.163>
 37. Hamblin O. Epistasis in Alzheimer's Disease: Interactions Between *CLU-MS4A4E* and *WWCI-TLN2*. Brigham Young University; 2019.
 38. Mohamoud HS, Ahmed S, Jelani M, Alrayes N, Childs K, Vadgama N, et al. A missense mutation in *TRAPPC6A* leads to build-up of the protein, in patients with a neurodevelopmental syndrome and dysmorphic features. *Sci Rep* [Internet]. 2018 ;8(1):2053. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-20658-w>
 39. Rygiel CA, Dolinoy DC, Bakulski KM, Aung MT, Perng W, Jones TR, et al. DNA methylation at birth potentially mediates the association between prenatal lead (Pb) exposure and infant neurodevelopmental outcomes. *Environ Epigenet* [Internet]. 2021 ; 7(1):dvab005. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34141453/>
 40. Li X, Wang H, Long J, Pan G, He T, Anichtchik O, et al. Systematic analysis and biomarker study for Alzheimer's Disease. *Sci Rep* [Internet]. 2018 [citado el 10 de abril de 2023];8(1):17394. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-35789-3>
 41. Gao, F., Ma, X., Rusie, A., Hemingway, J., Ostmann, A. B., Chung, D., & Das, S. K. (2012). Epigenetic changes through DNA methylation contribute to uterine stromal cell decidualization. *Endocrinology*, 153(12), 6078–6090. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1457>
 42. Muggia, A., Teesalu, T., Neri, A., Blasi, F., & Talarico, D. (1999). Trophoblast giant cells express *NF-kappa B2* during early mouse development. *Developmental Genetics*, 25(1), 23–30. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1999\)25:1<23::AID-DVG3>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:1<23::AID-DVG3>3.0.CO;2-K)
 43. Adu-Gyamfi, E. A., Czika, A., Liu, T.-H., Gorleku, P. N., Fondjo, L. A., Djankpa, F. T., Ding, Y.-B., & Wang, Y.-X. (2021). Ephrin and Eph receptor

- signaling in female reproductive physiology and pathology. *Biology of Reproduction*, 104(1), 71–82. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa171>
44. Wilkinson, D. G. (2001). Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(3), 155–164. <https://doi.org/10.1038/35058515>
45. Abdul-Aziz, N. M., Turmaine, M., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2009). EphrinA-EphA receptor interactions in mouse spinal neurulation: implications for neural fold fusion. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(4), 559–568. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082777na>
46. Lu R-C, Yang W, Tan L, Sun F-R, Tan M-S, Zhang W, et al. Association of *HLA-DRB1* polymorphism with Alzheimer's disease: a replication and meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [citado el 10 de abril de 2023];8(54):93219–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.21479>
47. Bis JC, Jian X, Kunkle BW, Chen Y, Hamilton-Nelson KL, Bush WS, et al. Whole exome sequencing study identifies novel rare and common Alzheimer's-Associated variants involved in immune response and transcriptional regulation. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2020 [citado el 10 de abril de 2023];25(8):1859–75. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41380-018-0112-7>
48. Chen J, Samoylova NG, Cummings MG. *TOMM40*, a risk gene for Alzheimer's disease, is upregulated during proinflammatory response. *Alzheimers Dement* [Internet]. 2021;17 Suppl 2(S2):e058711. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/alz.058711>