



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MICRORNA DURANTE EL DESARROLLO DEL
OÍDO EXTERNO DE RATÓN (*Mus musculus*)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ULISES EHATL JUÁREZ FIGUEROA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA/

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. JUAN MIRANDA RÍOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de junio de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **JUÁREZ FIGUEROA ULISES EHATL** con número de cuenta **303284767**, con la tesis titulada **“PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MICRORNA DURANTE EL DESARROLLO DEL OÍDO EXTERNO DE RATÓN (*Mus musculus*)”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**:

Presidente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Vocal: DR. JORGE MELENDEZ ZAJGLA
Secretario: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE
Suplente: DR. JUAN MIRANDA RÍOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de julio de 2014



María del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por haberme permitido ingresar, para poder crecer en mi desarrollo académico.

Agradezco al CONACYT por darme la oportunidad de obtener una beca durante el desarrollo de mi proyecto (270077/333372).

Agradezco también el apoyo otorgado por PAEP 2013, ya que me permitió asistir al congreso internacional de biología del desarrollo importante para mi desarrollo académico.

Agradezco al Instituto Nacional de Pediatría, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en el Laboratorio de Citogenética y también por el apoyo por parte de los FONDOS FEDERALES del proyecto "Identificación de los microRNA involucrados en el desarrollo normal del oído externo humano y realización de un modelo en ratón" (053/2013).

Al personal del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría.

Agradezco también a mi Comité Tutoral quienes fueron parte muy importante en el desarrollo de mi proyecto y mi formación académica.

TUTORA PRINCIPAL

Dra. SARA FRÍAS VAZQUEZ

Instituto Nacional de Pediatría/Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. JUAN MIRANDA RÍOS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Agradecimientos a título personal

Agradezco a los miembros del jurado Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Jorge Melendez Zajgla, Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, Dr. José Miguel Betancourt Rule, Dr. Juan Miranda Ríos, por la revisión y sugerencias realizadas para mejorar mi tesis.

Agradezco al departamento de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría por ayudarme en mi crecimiento académico.

A la Dra. Sara Frías por aceptarme en su laboratorio, por instruirme académica y personal mente y por siempre confiar en mí. Muchas gracias.

A la Dra. Leda Torres, por su apoyo en la realización del proyecto y por la revisión y sugerencias realizadas en la tesis.

Agradezco la ayuda de todos mis compañeros de laboratorio de Citogenética (Dra. Sara, Dra. Bertha, Dra. Leda, Mary Paz, Armando, Alf, Chivis, Sandy, Oscar, Luz, Charly) por el apoyo, la atención, los comentarios y su amistad.

A la Dra. Rosa Ma. Vigueras por permitirme el uso del área de disección.

Al Laboratorio de Oncología Experimental del INP y a Dr. Sergio Juárez por el apoyo en el uso de la plataforma de microarreglos de Affymetrix.

Agradezco a mi madre Rocio a mi tía Ana Lilia y a todos los miembros de mi familia hermanos (David y Rocio), primos (Baltazar, Fabiola, Marcos e Israel), mis sobrinas (Mayita y Cheyenne) por su apoyo durante todos estos años.

Dedicatoria

A mi madre Rocio Ángeles Figueroa Sandoval por darme siempre las facilidades de seguir estudiando, ayudarme y comprenderme siempre en todo momentos de mi vida y por ser la mejor mamá.

A mi tía Ana Lilia por cuidarme, educarme y siempre dar me un buen consejo para seguir adelante con este proceso de mi educación académica.

ÍNDICE

	PAGINA
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. Desarrollo del oído externo en mamíferos	5
1.2. Genes que participan en el desarrollo del oído externo	6
1.3. El RNA como regulador de la expresión génica	9
1.4. Los microRNAs	9
1.5. Biogénesis de los microRNAs	9
1.6. Función biológica de los microRNAs	12
1.7. Mecanismo de regulación de RNA mensajero blanco por microRNAs	13
2. Objetivo General	15
2.1. Objetivos Particulares	15
3. Antecedentes	16
3.1. Espectro Facio Auriculo Vertebral	16
3.2. MicroRNAs y desarrollo embrionario	16
3.3. MicroRNAs y desarrollo del oído	17
4. Justificación	18
5. Estrategia general	19
6. Materiales y métodos	20
6.1. Muestras	20
6.2. Extracción de RNA total incluyendo RNA pequeños	21
6.3. Microarreglos	21
6.4. Análisis de los resultados	21
6.5. Análisis bioinformático	22
6.6. Consideraciones éticas	22

7. Resultados	23
7.1. Muestras obtenidas	23
7.2. Integridad del RNA total	23
7.3. Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA total extraído	24
7.4. Prueba de ELOSA.	25
7.5. Escaneo de los microarreglos GeneChip® miRNA 3.0 Array	25
7.6. Patrón de expresión de los microRNAs.	26
7.7. RNA mensajeros blancos.	27
8. Discusión	34
9. Conclusiones	40
10. Perspectivas	40
11. Literatura citada	41

Lista de figuras y tablas

Figura #	Nombre	Pagina
Figura 1	Desarrollo embrionario del oído externo en ratón	6
Figura 2	Biogénesis de los miRNAs	11
Figura 3	Ejemplo de sitios blanco de miRNAs	12
Figura 4	Mecanismo de regulación del blanco por miRNAs	14
Figura 5	Imagen representativa de la integridad del RNA total	24
Figura 6	Prueba Cualitativa del ELOSA	25
Figura 7	Imagen representativa de un GeneChip® miRNA 3.0 Array	26
Figura 8	HeatMap de la etapa 13.5 dpc en ratón	28
Figura 9	HeatMap de la etapa 14.5 dpc en ratón	30

Tabla #	Nombre	Pagina
Tabla 1	Genes candidatos en el desarrollo del oído externo de ratón y de humano	8
Tabla 2	Tipo de muestras obtenidas	23
Tabla 3	Calidad y cantidad del RNA total	24
Tabla 4	MicroRNAs diferencialmente expresados entre muestras de espalda de ratón de 13.5 dpc. y muestras de oído de ratón de 13.5 dpc	29
Tabla 5	MicroRNAs diferencialmente expresados entre muestras de espalda de ratón de 14.5 dpc. y muestras de oído de ratón de 14.5 dpc	31
Tabla 6	Genes candidato del desarrollo del oído externo de ratón y los miRNAs que pueden regular su expresión	32
Tabla 7	Nuevos genes candidato que posiblemente puedan estar involucrados en el desarrollo del oído externo de ratón y los miRNAs que pueden regular su expresión	33

Resumen.

La biología del desarrollo es fundamental para poder entender diferentes mecanismos que pueden generar algunas malformaciones congénitas, conocer cómo se desarrolla cualquier estructura en un organismo es parte esencial para poder comprender como pequeñas modificaciones en los mecanismos de regulación génica pueden afectar el desarrollo.

Esta regulación está dirigida por diferentes mecanismos como condensación de la cromatina, marcas de histonas, factores de transcripción, secuencias específicas, RNA no codificantes; dentro de los cuales se encuentran los siRNAs, piRNAs, lncRNAs y los microRNAs entre otros mecanismo. La regulación génica es de suma importancia en el estudio de los diversos procesos celulares involucrados en el desarrollo como la diferenciación, proliferación y apoptosis entre otros.

Los microRNAs (miRNAs) son reguladores clave de la expresión génica, miden aproximadamente 22 nucleótidos y regulan de manera postranscripcional a sus RNAs mensajeros (mRNA) blanco por apareamiento de bases. Se ha observado que son esenciales durante el desarrollo embrionario de los animales, se expresan de manera tejido específica y participan en procesos embrionarios como diferenciación, establecimiento de patrones y morfogénesis.

El objetivo de este estudio fue identificar el patrón de expresión de los miRNAs durante el desarrollo normal del oído externo en ratón. Se obtuvieron fetos de dos diferentes etapas de desarrollo (13.5 días post coito (dpc) y 14.5 dpc) de ratón de la cepa CD1, se disecaron y se les tomó muestra de tejidos del oído externo y piel de la región de la espalda. Posteriormente se realizó la extracción del RNA total incluyendo los RNAs pequeños, a los que se marcaron con el kit FlashTag® Biotin HSR para poder realizar la hibridación en los arreglos GeneChip® miRNA 3.0 de Affymetrix, una vez terminada la hibridación se tiñeron y lavaron. Se realizó el escaneo de estos para obtener los archivos correspondientes y poder analizarlos posteriormente.

De los análisis realizados se encontró que para la etapa de 13.5 dpc. 11 miRNAs presentaron niveles altos de expresión en el oído externo de ratón con respecto al tejido referencia (espalda de ratón), y 14 miRNAs presentaron niveles bajos de expresión; mientras que para la etapa de 14.5 dpc se encontraron 14 miRNAs con niveles altos de expresión en el oído externo de ratón con respecto al tejido referencia, y 17 miRNAs con niveles bajos.

Con los resultados generados se pudo determinar que existen patrones específicos de expresión de miRNAs en las dos etapas analizadas 13.5 dpc y 14.5 dpc. Por otra parte con ayuda de programas bioinformáticos conseguimos proponer nuevos genes candidatos que puedan estar regulando el desarrollo del oído externo en ratón.

Este es el primer reporte sobre el perfil de expresión de microRNAs en el desarrollo del oído externo en ratón, este estudio contribuye a sentar las bases para comprender las implicaciones de los microRNAs en el desarrollo embrionario normal y a determinar su participación en la etiología de malformaciones congénitas, como la microtia.

Abstract

Developmental biology is essential to understand the different mechanisms that can generate some congenital malformations. Knowing how the structures develop in an organism is fundamental to understand how small changes in the mechanisms of gene regulation may affect the embryonic development.

This regulation is governed by different mechanisms like chromatin condensation, histone marks, transcription factors, specific sequences and non-coding RNA (including the siRNAs, piRNAs, microRNAs and lncRNAs) among other mechanisms. Gene regulation is important in the study of various cellular processes involved in development such as differentiation, proliferation and apoptosis among others.

MicroRNAs (miRNAs) are key regulators of gene expression. They are conformed by approximately 22 nucleotides and regulate in a posttranscriptional way their target messenger RNAs (mRNAs) expression by base pairing. It has been observed that they are essential for embryonic development in animals and are expressed in a tissue specific manner regulating multiple processes including embryonic differentiation, establishing patterns and morphogenesis.

The aim of this study was to identify the expression pattern of miRNAs during normal development of the external ear in mice. Fetuses from two different stages of development (13.5 days post coitus (dpc) and 14.5 dpc) of mouse strain CD1, were dissected and tissue samples of the external ear and skin from the back region were obtained. Subsequently, total RNA extraction was performed including small RNAs, which were labeled with the kit FlashTag® Biotin HSR to be able to conduct hybridization in the GeneChip® miRNA 3.0 of Affymetrix arrays, once the hybridization were stained and washed. These scanning was performed to obtain the appropriate files and to analyze them later.

The analyzes of miRNA 3.0 arrays showed at stage 13.5 dpc. 11 miRNAs with high levels of expression in the outer ear compared with the levels in reference mouse tissue (mouse back), and 14 miRNAs showed low expression levels; while

for the 14.5 dpc stage 14 miRNAs high levels of expression were found in the external mouse ear compared with the levels in reference tissue and 17 miRNAs with low levels.

With the generated results it was determined that there are specific patterns of expression of miRNAs in the two stages analyzed 13.5 dpc and 14.5 dpc. Moreover, by using bioinformatics programs we were able to propose new candidate genes that may be regulating the development of the external ear in mice.

This is the first report on the expression profile of microRNAs in the development of the external ear in mice, this study establish the basis for understanding the implications of microRNAs in normal embryonic development and determine their involvement in the etiology of congenital malformations such as microtia.

1.-Introducción

1.1.-Desarrollo del oído externo en mamíferos

El desarrollo del oído externo se origina a partir del primero y segundo arcos faríngeos, estos son formados a partir de células mesenquimales del mesodermo y de células de la cresta neural (CCN), este grupo de células transitorias pluripotenciales se originan en el límite del ectodermo-neuroectodermo de la parte dorsal del tubo neural. Para el inicio de la morfogénesis rostral, incluyendo el oído externo, existe una señalización recíproca en la región craneal entre las CCN y células embrionarias del ectodermo endotelial y craneofacial (His, 1882; Jones and Chuan, 1934; Minoux et al., 2013; Moore and Persaud, 2008; Santagati et al., 2005).

El oído externo se compone del pabellón auricular (aurícula y oído externo), del meato acústico externo (canal del oído) y la capa exterior de la membrana timpánica (tímpano). Su desarrollo se origina del mesénquima del primero y segundo arco faríngeo y se controla, en al menos una parte, por genes que determinan la identidad de ambos arcos faríngeos. Donde el ectodermo suprayacente de la parte dorsal del primero y segundo arco faríngeo induce al mesénquima subyacente hacia la proliferación y diferenciación condrocítica con depósito de colágeno, formando seis montículos auriculares precartilaginosos (Jones and Chuan, 1934; Minoux et al., 2013; Moore and Persaud, 2008; Porter and Tan, 2005).

W. His asumió erróneamente que los montículos auriculares que describió desarrollaban regiones específicas en la aurícula (tragus, helicis crus, hélix, antihélix o tubérculo auricular), estos montículos son regiones de conglomerados celulares que tienen una alta proliferación. Los montículos auriculares crecen, se fusionan y experimentan un proceso de morfogénesis para producir un apéndice en forma de embudo (canal del oído) desde el meato acústico hasta la membrana timpánica y el pabellón auricular. La posición inicial del oído se encuentra en una región ventrolateral del cuello del embrión y una vez que inicia el desarrollo de la maxila y la mandíbula se mueve progresivamente a la posición dorsolateral de la cara. En el ratón como en humano el desarrollo del oído externo es similar y se inicia a partir del día 10.5 de gestación en ratón y entre la quinta y sexta semana de gestación en

humano (Minoux et al., 2013; Moore and Persaud, 2008; Porter and Tan, 2005).
Figura 1.

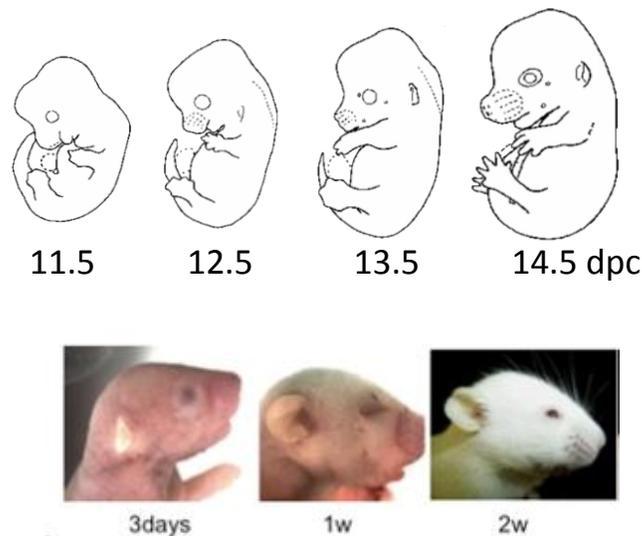


Figura 1. Desarrollo embrionario del oído externo en ratón tomados de (Kobayashi et al., 2011)

1.2.- Genes que participan en el desarrollo del oído externo

El desarrollo embrionario se regula de manera espacio-temporal, esta regulación depende de factores de transcripción, moléculas de señalización y receptores. En los últimos años el estudio de los genes que codifican para estas moléculas ha sido fundamental en la biología del desarrollo, se sabe que existen familias génicas y que muchas de ellas como las familias de genes homeóticos participan en una amplia variedad de procesos durante el desarrollo. Un claro ejemplo son los genes *Hox*, los cuales fueron identificados por mutaciones generadas en estos genes en el modelo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, posteriormente fueron caracterizados en ratón como en humano observando que tenían una función conservada, estos genes son factores de transcripción los cuales contienen un homeódominio capaz de unirse al DNA, este dominio les confiere la capacidad de poder regular genes involucrados en el desarrollo temprano. Su principal función que se les ha atribuido a los genes *Hox* es la determinación del eje antero posterior

en embriones bilaterales (Heffer and Pick, 2013; Lewis, 1978; McGinnis and Krumlauf, 1992).

Hasta la fecha se han descrito diferentes familias de genes homeóticos las cuales se han encontrado implicadas en la formación de las diferentes estructuras, órganos y tejidos, en un tiempo y espacio determinado durante el desarrollo embrionario. La gran mayoría de los genes involucrados en el desarrollo del oído externo de ratón y humano son genes homeóticos (Tabla 1), por ejemplo, un estudio en ratón muestra que el modelo nulo para el gen homeótico *Hoxa2* tenía alteraciones en el desarrollo de las estructuras derivadas del primero y segundo arco branquial, los cuales están involucrados en el desarrollo del oído medio y externo. (Santagati et al., 2005). En humano, tanto HOXA1 como HOXA2 son factores de transcripción para otros genes que se encargan de regular el desarrollo del oído, de hecho en humanos se ha relacionado la presencia de microtia familiar con una mutación autosómica recesiva de *HOXA2* (Alasti et al., 2008). Además de los genes homeóticos se han descrito otros genes cuyas proteínas están involucradas en los procesos morfogénicos del desarrollo del oído (Alasti et al., 2008; Lin et al., 2011; Luquetti et al., 2012) como los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes candidatos en el desarrollo del oído externo de ratón y de humano.

Gen	Hallazgos	
	Ratón	Humano
<i>Hoxa1</i> , <i>HOXA1</i>	<i>Hoxa1</i> ^{-/-} Hipoplasia del oído externo	HOXA1 regula a otros genes que a su vez se encargan de regular el desarrollo del oído.
<i>Hoxa1/Hoxb1</i>	<i>Hoxa1</i> ^{-/-} / <i>Hoxb1</i> ^{-/-} Ausencia del oído externo	No reportado
<i>Hoxa2</i> , <i>HOXA2</i>	Define la identidad del segundo arco faríngeo, paso inicial de la formación de la aurícula.	Se han reportado casos familiares con microtía en ausencia de HOXA2.
<i>Hoxb6/Hoxa7</i>	<i>Hoxb6</i> ^{-/-} <i>Hoxa7</i> ^{-/-} : Malformación del oído externo.	No reportado
<i>Six1</i> , <i>SIX1/SIX5</i>	Anormalidades Craneofaciales (incluye oído externo)	Genes involucrados en el Síndrome Branqui-oto-renal.
<i>Six1/Six4</i>	Anormalidades del oído externo	no reportado
<i>SIX2</i>	No reportado	Gen blanco de HOXA2.
<i>Eya1</i> , <i>EYA1</i>	Anormalidades del oído externo.	Síndrome Branqui-oto-renal
<i>Tbx1</i> , <i>TBX1</i>	Falla en el desarrollo del oído externo, participa en la morfogénesis de los arcos faríngeos.	Gen involucrado en el desarrollo del oído medio y externo.
<i>Bmp5</i> , <i>BMP5</i>	Orejas pequeñas.	Síndrome Meier Gorlin
<i>Fgfr 1-3</i> , <i>FGF3</i>	Participan en diferentes procesos del desarrollo de la aurícula	Factor de crecimiento de fibroblastos participa en la morfogénesis del epitelio del oído.
<i>Fgf8/Fgf10</i>	Orejas pequeñas.	no reportado
Genes <i>Wnt</i>	Participan en la formación y desarrollo de las células de la cresta neural.	No reportado
<i>Wnt5</i>	Presente en el mesénquima del oído externo, presenta orejas pequeñas	No reportado
<i>Sall1</i>	No reportado	Síndrome Townes-Brocks
Vía de la endotelina	Regulación de la proliferación y migración de las células de la cresta neural.	No reportado

1.3.- El RNA como regulador de la expresión génica

El RNA es parte fundamental en la expresión génica debido a que participa en procesos esenciales como la transcripción (RNA mensajero, mRNA), la traducción (RNA de transferencia) y procesos catalíticos (RNA ribosómico); en los últimos años y con ayuda del desarrollo de nuevas tecnologías a partir de análisis de genoma o transcriptomas completos, se han podido identificar que aproximadamente el 2% del genoma es transcrito y traducido a proteínas, pero además se han encontrado moléculas de RNA no codificantes (ncRNAs) como los RNA de interferencia pequeños (siRNAs), Piwi-interacting RNA (piRNAs), RNA largos no codificantes (lncRNAs) y los microRNAs a los cuales se les ha atribuido una función reguladora debido a que pueden controlar la expresión de sus mRNA blanco. Parte fundamental de este descubrimiento es poder caracterizar la función de los ncRNA que es de suma importancia para poder entender con mayor precisión los mecanismos globales que ocurren en las células (Amaral and Mattick, 2008; Liu et al., 2013; Neilson and Sharp, 2008).

1.4.- Los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son reguladores clave de la expresión génica, son pequeños ncRNA de aproximadamente 22 nucleótidos que regulan de manera postranscripcional a sus mRNA blanco por apareamiento de bases. Se ha estimado que más de la mitad de todos los mRNA en una célula son blanco de miRNAs, un solo miRNA puede regular cientos de mRNA. Estas características particulares les confiere la actividad de participar en una amplia variedad de procesos biológicos como proliferación, diferenciación, apoptosis entre otros. Estos pequeños RNAs son particularmente críticos durante el desarrollo, la pérdida total durante el desarrollo dirige a la letalidad (Gurtan and Sharp, 2013; Hu and Gatti, 2011).

1.5.- Biogénesis de los microRNAs

La biogénesis de los microRNAs incluye los procesos de transcripción, procesamiento/maduración y degradación. Dependiendo de la localización genómica de los miRNAs la transcripción es diferente, si se encuentran en regiones

intergénicas son transcritos a pri-miRNA por la RNA polimerasa II, en este caso, contienen sus propias unidades promotoras y reguladoras. Cuando los miRNAs son intrónicos se localizan dentro de un gen y son co-transcritos con los genes hospederos, ambos procesos forman a los pri-miRNA. Los pri-miRNA intergénicos se modifican para su exportación y en la región 5' se agrega un metil-guanosil, mientras que en la región 3' se poliadenila; posteriormente para formar un pre-miRNA se hace una escisión por el complejo microprocesador Drosha/DGCR8. Los miRNAs intrónicos sufren la escisión directa por el complejo Drosha/DGCR8 a un pre-miRNA sin afectar el *splicing* de los genes hospederos. Los pre-miRNA son exportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 y Ran-GTP, una vez fuera el complejo Dicer/TRBP realiza una escisión para formar un dúplex imperfecto de miRNA-3p/miRNA-5p (Hu and Gatti, 2011; Wienholds and Plasterk, 2005; Yekta et al., 2008).

En la mayoría de los casos, sólo una cadena del dúplex se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC/Argonauta 1-4), este miRNA maduro cargado en el RISC es protegido de degradación por proteínas argonautas y posteriormente se unirá por medio de una región específica denominada **semilla** (la cual se extiende del nucleótido 2-7 del miRNA maduro) a la región 3' UTR (del inglés untranslate region) o 5' UTR del mRNA del gen blanco lo cual suprimirá su expresión, por otra parte la otra cadena del dúplex normalmente es degradada. No obstante, al finalizar su función el miRNA maduro de cadena sencilla es degradado por la 5'-3' exoribonucleasa XRN2 o por las 3'-5' exoribonucleasas como se muestra en la Figura 2 (Hu and Gatti, 2011; Pasquinelli, 2012; Wienholds and Plasterk, 2005; Yekta et al., 2008).

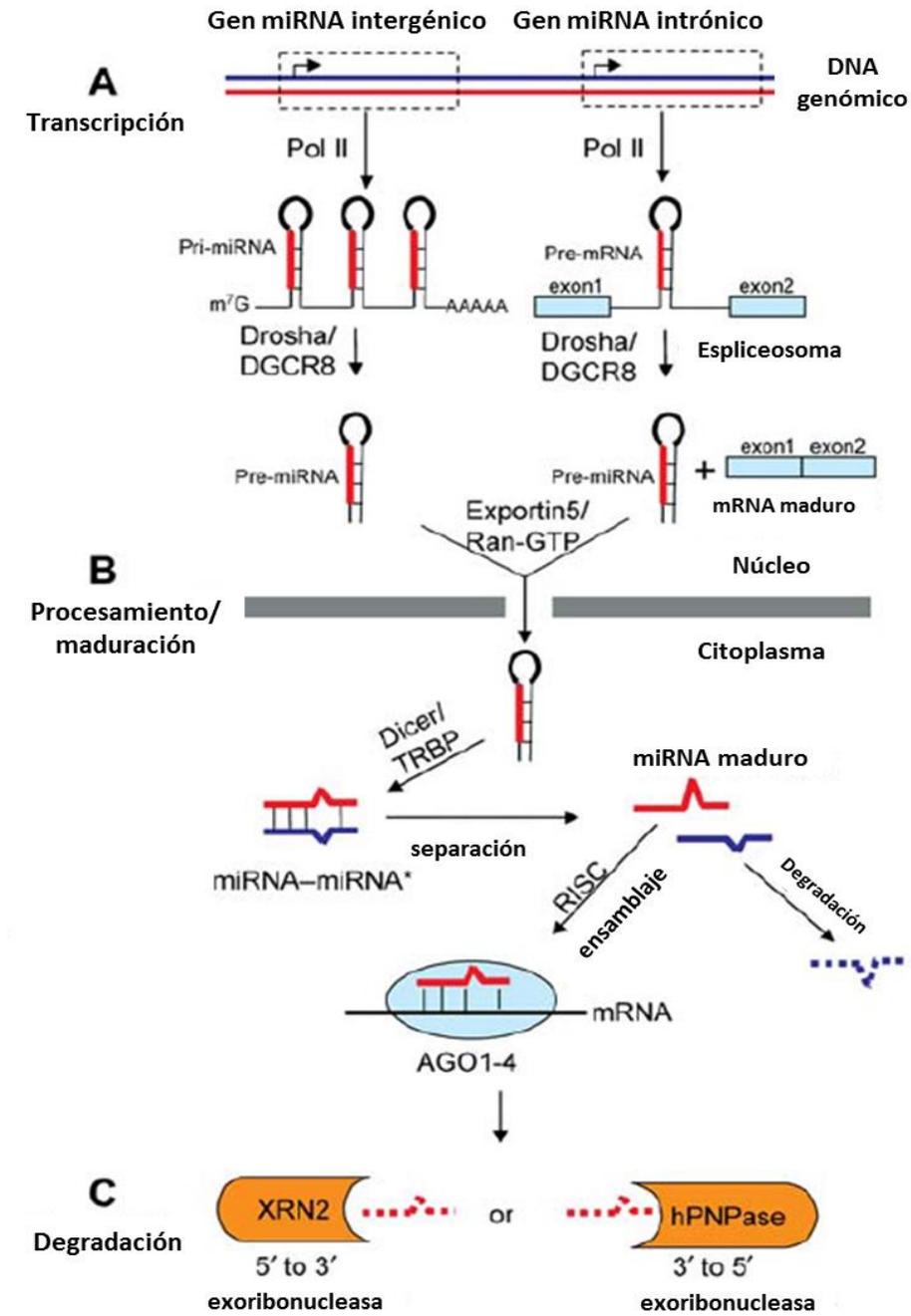


Figura 2. Biogénesis de los miRNAs. A transcripción de miRNAs, B Procesamiento y maduración, C Degradación de los miRNAs. Modificado de (Hu and Gatti, 2011).

1.6.- Función biológica de los microRNAs

Hasta el momento no se conoce como los miRNAs reconocen secuencias específicas de complementariedad parcial, lo cual dificulta el proceso de predicción de sitios blanco (Neilson and Sharp, 2008; Pasquinelli, 2012).

Una de las características de las regiones blanco de los miRNAs, es que entre ellos solo se necesita tener un apareamiento parcial para poder regular al mRNA. Esta propiedad no únicamente indica que un solo miRNA pueda regular varios mRNA, sino que la predicción de las regiones blanco es muy compleja. En animales, esto es claro ya que la mayoría de los miRNAs únicamente forman dúplex parciales con sus blancos y la gran mayoría de los mRNAs blancos estudiados son regulados en la región 3'UTR. Aunque existen excepciones de complementariedad cercana a la perfección como es el caso del *miR-196* con una secuencia del mRNA del gen *HOXB8*. Algunos de los ejemplos de este tipo de apareamiento se muestran en la figura 3.(Kaikkonen et al., 2011; Pasquinelli, 2012).

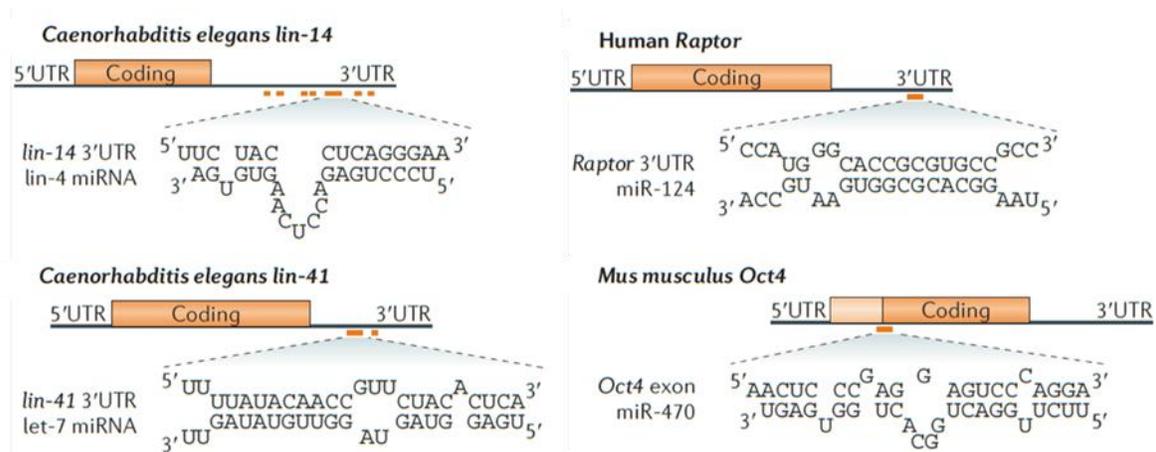


Figura 3. Ejemplo de sitios blanco de miRNAs. Modificado de (Pasquinelli, 2012).

1.7.- Mecanismo de regulación de RNA mensajero blanco por microRNAs

Los mecanismos utilizados por los miRNAs para la regulación de la expresión de sus genes blanco están sujetos a controversia, ya que existe evidencia de que los mRNA blancos pueden ser desestabilizados, reprimidos durante el proceso de traducción e incluso pueden activar la expresión génica (Hu and Gatti, 2011; Pasquinelli, 2012).

En animales los miRNAs pueden silenciar a sus blancos tanto por degradación como por represión de la vía de traducción, el apareamiento perfecto de un miRNA con el sitio blanco del mRNA sugiere una escisión endonucleolítica por una proteína Argonauta (Fig 4a). El mecanismo por desestabilización del mRNA blanco, es dirigido por la unión del RISC, el cual incluye la proteína GW182, la cual se une a la secuencia blanco de la región 3'UTR del mRNA, lo que puede resultar en el reclutamiento de factores de deadenilación que remueven la cola de poli-A, lo cual hace susceptible a la degradación exonucleolítica (Fig 4b). Existen casos en los cuales el miRNA causa reducción en los niveles de la proteína codificada (no en el mRNA), sugiriendo que existe una represión de la traducción, dirigida por el complejo RISC. Los conocimientos actuales sobre los mecanismos que reprimen la producción de proteínas, no son claros y hay evidencia tanto de inhibición del inicio de la traducción o elongación, como de proteólisis dirigida a los péptidos que están siendo sintetizados del gen blanco (Fig. 4c, d) (Eulalio et al., 2009; Huntzinger and Izaurralde, 2011; Pasquinelli, 2012; Petersen et al., 2006).

Además, se sabe que algunos miRNAs pueden estimular la traducción de sus blancos bajo ciertas circunstancias, por ejemplo en *Xenopus laevis* el miR-16 con ayuda de Argonauta y FMR1, activa la expresión de la cinasa myt1 (Fig. 4e). Este comportamiento evidentemente hace aún más complicada la comprensión sobre el funcionamiento de los miRNAs (Mortensen et al., 2011; Pasquinelli, 2012).

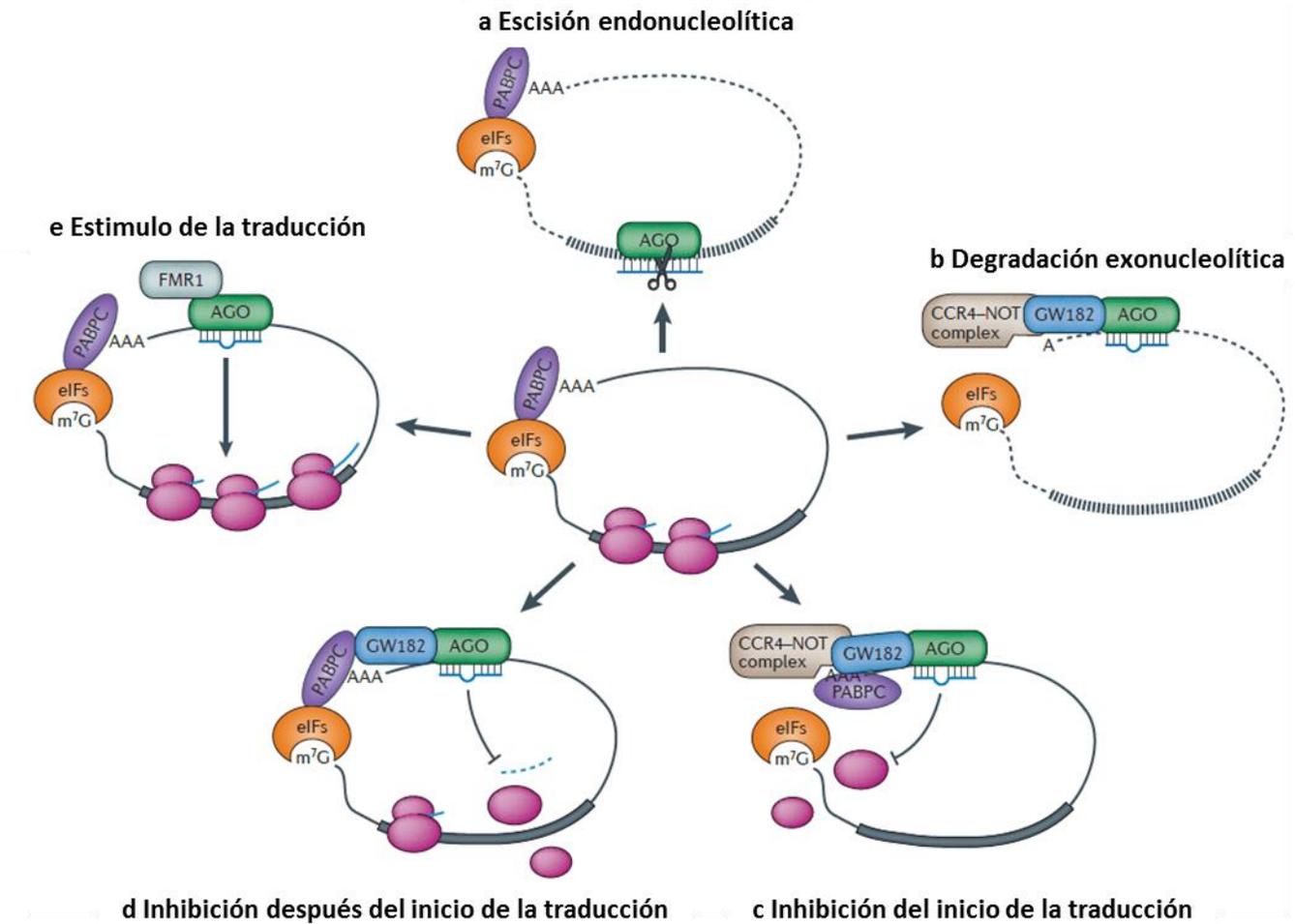


Figura 4. Mecanismo de regulación del blanco por miRNAs. (modificado de (Pasquinelli, 2012).

Además de tener una regulación tan controlada y por su importancia en la participación de diversos procesos biológicos, se descubrió que existe un mecanismo de regulación post-transcripcional capaz de disminuir los niveles de expresión de los miRNAs para controlar su función en contra de los mRNA. Este mecanismo implica la participación de RNA capaces de ser circulares (circRNA), esto circRNA tienen sitios específicos que hacen que los miRNAs maduros se unan a él, promoviendo su regulación (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013).

2.- Objetivo General

Describir el patrón de expresión de los microRNAs durante el desarrollo normal del oído externo en ratón.

2.1.- Objetivos Particulares

1.- Comparar en ratones de 13.5 dpc y 14.5 dpc la presencia y los niveles de expresión de los miRNAs en el tejido de oído externo y el tejido de la espalda de ratones de la cepa CD1.

2.- Identificar *in silico* los posibles mRNA blancos de los miRNAs con expresión diferencial durante el desarrollo del oído externo.

3. Correlacionar los genes candidatos previamente reportados como involucrados en el desarrollo del oído externo de ratón, con los miRNAs diferencialmente expresados.

3.- Antecedentes

3.1. Espectro Facio Auriculo Vertebral

El Espectro Facio Auriculo Vertebral (EFAV) es una entidad compleja y heterogénea; desde el punto de vista dismorfológico se clasifica como una disrupción. La manifestación mínima del EFAV es la microtia unilateral, la más severa se presenta con macrostomia y dermoide epibulbar, se conoce como síndrome de Goldenhar y puede asociarse con otras malformaciones (Llano-Rivas et al., 1999; Quintana and Canún, 2006)

El EFAV se asocia con defectos durante el desarrollo del primer y segundo arco branquial. Como parte del EFAV la microtia es una malformación congénita del oído externo, que puede variar en su manifestación clínica, desde una pequeña malformación, cómo un oído más pequeño, hasta la ausencia total del pabellón auricular (anotia)(Alasti and Van Camp, 2009). La prevalencia del EFAV es de 1 en 5600, mientras que la prevalencia de las malformaciones óticas varía entre 0.83 a 4.34 por 10,000 nacidos vivos (Luquetti et al., 2012) y aunque en México no existe un cálculo de su prevalencia, se sabe que es la quinta causa de consulta en la clínica de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría y la segunda en el Hospital Infantil de México.

La mayoría de los casos se acompañan de atresia o estenosis del canal auditivo y anomalías del oído medio lo cual a largo plazo termina con pérdida de la audición. La etiología de la microtia se describe generalmente como multifactorial, aunque en pocos casos la causa puede ser autosómica recesiva, autosómica dominante o ambiental (Luquetti et al., 2012).

3.2.- Los microRNAs y el desarrollo embrionario

Los miRNAs son elementos esenciales durante el desarrollo embrionario en los animales, se expresan de manera tejida específica durante el desarrollo, regulando muchos de los procesos embrionarios como diferenciación, establecimiento de

patrones y morfogénesis. Los primeros miRNAs descritos como reguladores del desarrollo fueron *let-7* y *let-4*, estos miRNAs modulan el desarrollo temprano en el nemátodo *C. elegans*. En ratón se han identificado miRNAs que regulan el desarrollo de corazón, *miR-1-1* especifica los atrios, mientras que *miR-1-2* especifica los ventrículos. Otro ejemplo claro es el proceso de neurogénesis el cual puede estar regulado por miRNAs en diferentes organismos, por ejemplo en *C. elegans* *lgy-6* y *miR-273* aseguran que las neuronas gustativas tengan asimetría izquierda/derecha; en el pez cebrá *mir-430* regula la formación del tubo neural y en mamíferos *miR-134* se expresa específicamente en las dendritas de las neuronas del hipocampo. (Wienholds and Plasterk, 2005; Zhao and Srivastava, 2007).

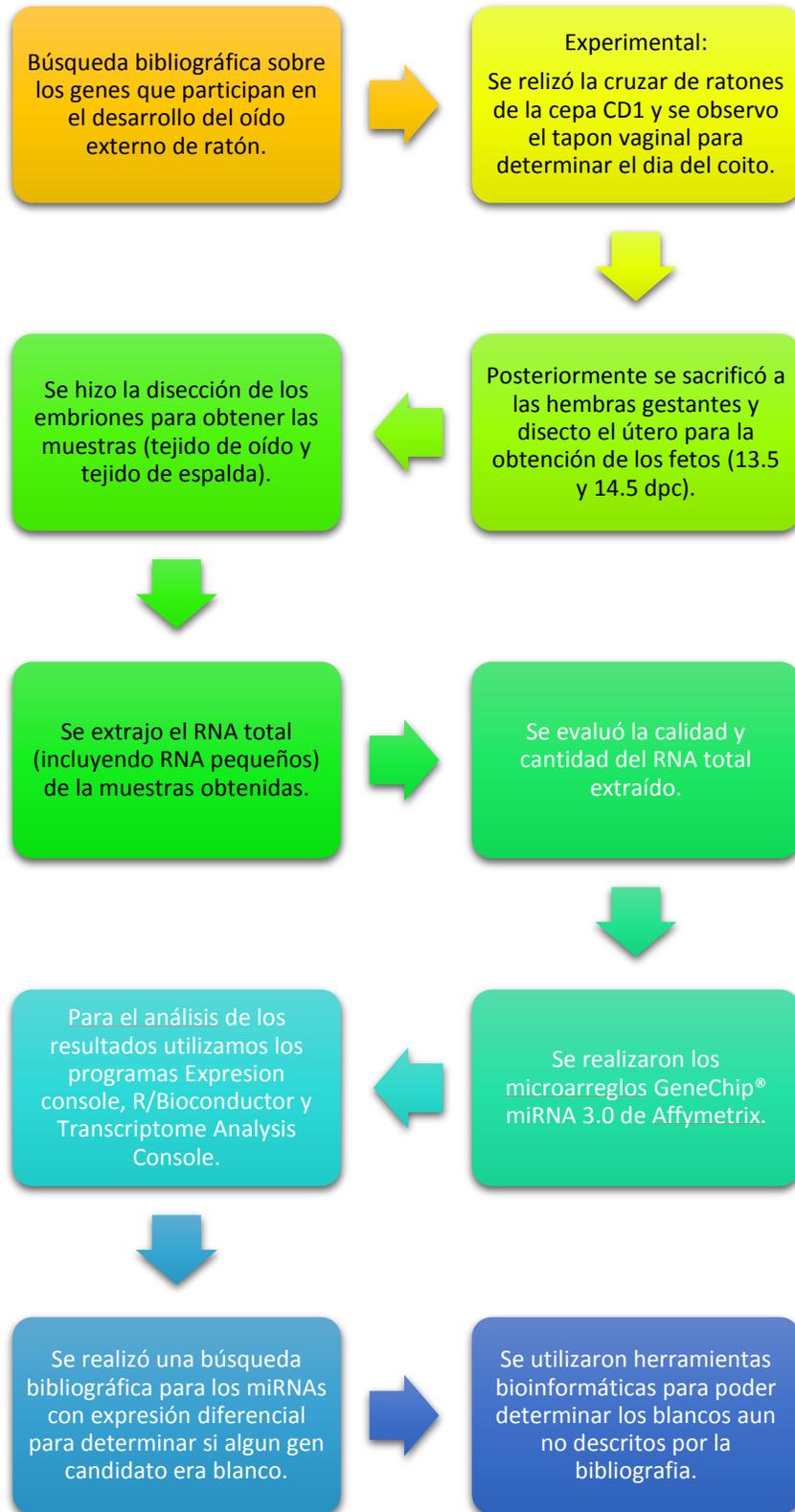
3.3.- Los microRNAs y el desarrollo del oído

Hasta el momento no se han descrito los miRNAs que participan en el desarrollo del oído externo en ratón. Solo se conoce que los miRNAs, *miR-96*, *miR-182* y *miR-183* tienen un patrón determinado durante el desarrollo del oído interno (Sacheli et al., 2009). Por otra parte, en humano se ha encontrado que el *miR-21* está relacionado con las enfermedades del oído como colesteatoma tislular del oído medio y Schwannoma vestibular (Neuroma acústico) (Rudnicki and Avraham, 2012); en otros estudios se encontró que mutaciones en *mir96/MIR96* pueden estar relacionadas con sordera en ratón y en humano, para el caso de los pacientes con sordera no sindromática se encontraron mutaciones en la región semilla y en una región importante para el procesamiento de *mir96* (Kuhn et al., 2011; Solda et al., 2012). Recientemente se estudió un grupo de 9 pacientes con microtia, se analizó la expresión de los microRNAs presentes en el cartílago, observando la sobreexpresión de los microRNAs *miR-451*, *miR-486-5p* y disminución en los niveles de *miR-200c* (Li et al., 2013). Sin embargo, hasta el momento, no hay reportes en donde se describan los miRNAs que participan en el desarrollo embrionario del oído externo.

4.- Justificación

Durante el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y morfogénesis tienen patrones de expresión génica que se basan en la regulación de la expresión génica y los microRNAs se perfilan como importantes reguladores para realizar esto, sobre todo a nivel de desarrollo embrionario. Consideramos de suma importancia investigar los miRNAs involucrados en el desarrollo del oído externo normal, debido a que su estudio contribuirá no solo a sentar las bases para comprender las implicaciones de los miRNAs en el desarrollo embrionario normal, sino también para determinar su participación en la etiología de malformaciones del oído externo, como la microtia.

5.- Estrategia general



6.- Materiales y métodos

6.1.- Muestras

Se utilizaron especímenes de ratón (*Mus musculus*, cepa CD1). El alojamiento tuvo un ambiente controlado con una temperatura de 19.5 a 22.5°C y humedad relativa de 45-55%. El agua y el alimento (Teklab Global Rodent Diet de Harlan) fueron suministrados *ad libitum*, por el personal del bioterio, quienes también estuvieron a cargo del cuidado y cambio de cama. Para cada muestra se puso a cruzar a un macho y una hembra, al día siguiente se observó el tapón vaginal, tomando como preñada a una hembra con tapón positivo. Debido a que los miRNAs deben controlar genes durante el desarrollo ontogénico del oído y es muy probable que desaparezcan después de su actividad específica en tiempo y espacio, se estudiaron fetos de ratón en los que se encontraba en desarrollo esta área. Por lo anterior, se trabajó con fetos murinos de la cepa CD1 de 13.5 y 14.5 días de desarrollo o días pos coito (dpc), estos días corresponden a las etapas de Carnegie 18 y 20 en el humano (44 y 52 días). Para obtener los embriones de las edades planteadas se consideró 0.5 dpc cuando se identificó un tapón positivo; se sacrificaron las hembras gestantes (tres hembras por edad gestacional) por dislocación cervical, se disecó el útero y se aislaron los fetos; los fetos se sacrificaron por decapitación y de cada uno se obtuvo tejido del oído externo (muestra problema) y de la piel de la espalda como tejido de referencia, se realizó un pool con todos los tejidos obtenidos a partir de los fetos de una camada; se procesaron tres camadas de 13.5 dpc y tres camadas de 14.5 dpc. El tejido se estabilizó en solución RNA*later* y se almacenó en la misma solución a una temperatura de -70°C hasta su procesamiento. La edad gestacional fue también calculada de acuerdo al número de somitas del feto y características particulares de la etapa. Todo el material biológico que no se ocupó se dispuso para su destrucción adecuada.

6.2.- Extracción de RNA total incluyendo RNAs pequeños

A las muestras obtenidas de los embriones de ratón se les realizó la extracción del RNA total incluyendo RNA pequeños con el kit de Qiagen miRNeasy Micro. Se observó la integridad del RNA total por medio de un gel de agarosa al 2% teñido con GelRed en el cual se observaron por medio de un transiluminador MicrQBIS de DNr Bio-Imaging System las bandas 18S y 28S como controles y se tomó una foto para cada extracción realizada. Posteriormente se analizó la calidad y cantidad del RNA total por medio del Nanodrop 1200.

6.3.- Microarreglos

Una vez obtenido el RNA total con una adecuada calidad y cantidad se realizó el marcaje con el kit FlashTag® Biotin HSR. Para poder evaluar si se realizó un apropiado procedimiento de marcaje, se realizó el ensayo de enzimas ligadas a oligoabsorbentes (ELOSA) el cual indica si el marcaje con biotina se realizó correctamente. Posteriormente se puso la muestra marcada en los Microarreglos GeneChip® miRNA 3.0 Array de Affymetrix, este microarreglo cuenta con sondas específicas que identifican 1733 miRNAs de humano y 1111 miRNAs de ratón, se utilizó la plataforma de Affymetrix para realizar la hibridación de los miRNAs de la muestra con las sondas que se encuentran en el microarreglo, una vez terminado el proceso de hibridación se realizaron los lavados y tinción en la estación de fluidos Affymetrix, posteriormente se realizó el escaneo de los microarreglos y se obtuvieron los archivos de cada microarreglo.

6.4.- Análisis de los resultados

Los archivos fueron analizados con el programa *Expression Console de Affymetrix*, este programa normaliza y evalúa los diferentes parámetros de control de calidad, como la calidad de hibridación y la calidad de la muestra, además de proporcionarte un análisis de componentes principales el cual indica que tan parecidas son las muestras. Posteriormente para el análisis de la expresión diferencial de los miRNAs presentes en las muestras se utilizó el programa *Transcriptome Analysis Console y R/Bioconductor*, con los cuales se obtuvieron el listado de los miRNAs presentes en

los diferentes microarreglos (tejido de oído y tejido de espalda), para lo cual se hizo una comparación entre las muestras de referencia (espalda) contra las muestras problema (oído). La región de referencia (espalda) es cercana a nuestra región problema y se diferencia en las mismas etapas, pero tiene un origen embrionario diferente, de esta manera podremos identificar los miRNAs que se están expresando específicamente en el oído externo en estas etapas.

La expresión diferencial de los miRNAs fue realizada con ayuda de la librería limma (Linear Models for Microarrays) de Bioconductor, el cual utiliza modelos lineales para analizar experimentos de microarreglos (Smyth, 2005). Se utilizaron cambios significativos de un log₂-fold Change mayores a 3, con p-value ajustado con FDR (false discovery rate) menores a 0.005 y con un β -statistic mayor a 3.

6.5.- Análisis bioinformático

Una vez que se identificaron los miRNAs con expresión diferencial se realizó un análisis bioinformático buscando en las bases de datos especializadas, cuales son los genes blancos probados y probables de estos miRNAs. Las bases de datos para consulta son las siguientes miRNA body Map, miRBase, DIANA Tarbase, DIANA microT v4, DIANA microT-CDS (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011, 2014; Maragkakis et al., 2011; Paraskevopoulou et al., 2013; Vergoulis et al., 2012).

6.6.- Consideraciones éticas

Se trabajó con ratones de la cepa CD1. Los animales se adquirieron con el proveedor aprobado: Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio-Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Campus Xochimilco. Los animales estuvieron alojados en el área asignada por el personal del bioterio en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Pediatría, el manejo y los métodos como de sacrificio de los animales fueron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a las guías de cuidado y manejo de animales del laboratorio: "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (Alvarez and Pardo, 1997), "A guide to the new ARENA/OLAW IACUC guidebook" (Pitts, 2002).

7.- Resultados

7.1.- Muestras obtenidas

De las diferentes cruces se hicieron varias tomas de muestra y se obtuvieron diferentes tejidos se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Tipo de muestras obtenidas

Número de muestra	Tipo de muestra	Número de muestra	Tipo de muestra
1	Cabeza completa ratón 8.5 dpc.	12	Espalda ratón 14.5 dpc.
2	Patas ratón 13.5 dpc.	13	Oído ratón 14.5 dpc.
3	Oído ratón 13.5 dpc.	14	Espalda ratón 14.5 dpc.
4	Patas ratón 13.5 dpc	15	Oído ratón 13.5 dpc.
5	Excluida	16	Espalda ratón 13.5 dpc.
6	Patas ratón 14.5 dpc.	17	Oído ratón 13.5 dpc.
7	Patas ratón 14.5 dpc.	18	Espalda ratón 13.5 dpc.
8	Oído ratón 14.5 dpc	19	Oído ratón 13.5 dpc.
9	Excluida	20	Espalda ratón 13.5 dpc.
10	Oído humano (aborto)	21	Oído ratón 13.5 dpc.
11	Oído ratón 14.5 dpc.	22	Espalda ratón 13.5 dpc.

Para la realización del proyecto solo se utilizaron las muestras 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, a las que se les aplicaron las diferentes técnicas utilizadas.

7.2.- Integridad del RNA total

Después de cada extracción de las diferentes muestras se obtuvo el RNA total incluyendo los RNA pequeños y se realizaron geles de agarosa para poder observar la integridad de nuestro RNA total. Figura 3

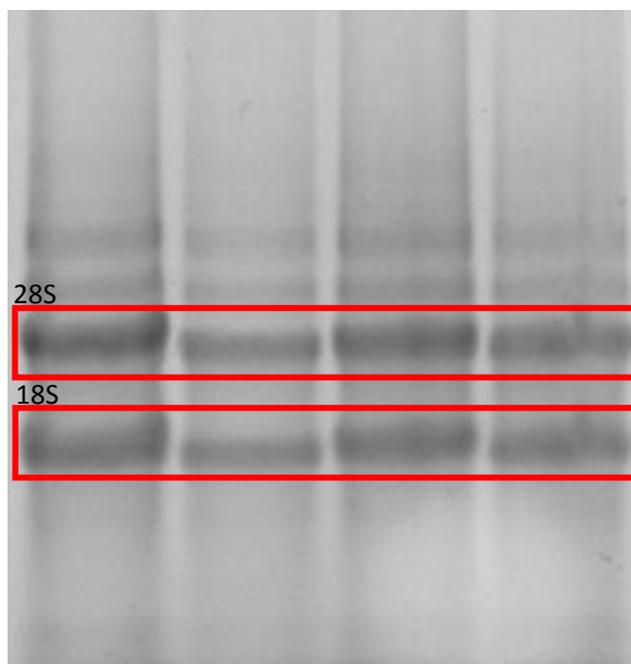


Figura 5. Imagen representativa de la integridad del RNA total. Se observa una electroforesis en un gel de agarosa teñido con GelRed donde se observan las bandas 28S y 18S como controles.

7.3.- Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA total extraído

Después de evaluar la integridad de la extracción de RNA total se tomaron 2 μ L de las muestras y se analizaron en el espectrofotómetro Nanodrop para verificar si las muestras eran óptimas para proseguir con los experimentos. Tabla 3.

Tabla 3. Calidad y cantidad del RNA total.

Ratón CD1 13.5 dpc.					Ratón CD1 14.5 dpc.				
#	Tipo de muestra	ng/ μ L	260/230	260/280	#	Tipo de muestra	ng/ μ L	260/230	260/280
15	Oído ratón	1028	2.10	2.08	8	Oído ratón	133.3	1.85	1.94
16	Espalda ratón	2870.7	1.87	2.07	11	Oído ratón	3697.1	2.12	2.0
19	Oído ratón	861.5	1.95	2.09	12	Espalda ratón	2302.5	2.15	2.08
20	Espalda ratón	794.8	1.91	2.03	13	Oído ratón	3204.5	2.07	2.05
21	Oído ratón	201.3	1.56	2.05	14	Espalda ratón	3541.9	1.56	2.05
22	Espalda ratón	2326	2.11	2.08					

7.4.- Prueba de ELOSA

Una vez que se realizó el marcaje con el kit FlashTag® Biotin HSR y antes de hibridar en el microarreglo se realizó la prueba de ELOSA para confirmar que el marcaje era adecuado (prueba cualitativa, figura 4).

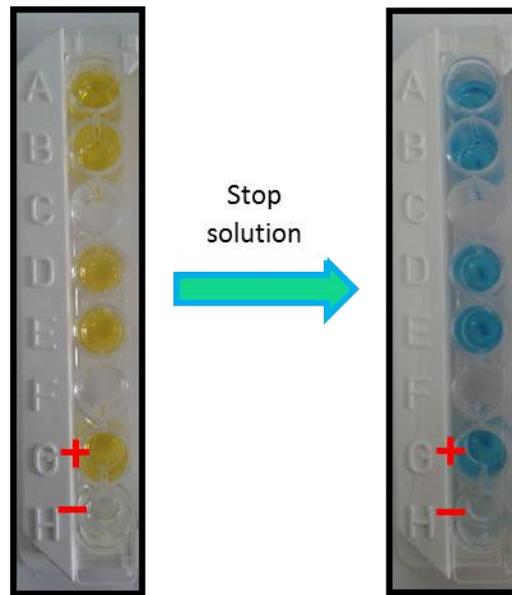


Figura 6. Prueba Cualitativa del ELOSA. La imagen es representativa para la prueba de ELOSA donde se observa del lado izquierdo en coloración amarillo (como lo indican los controles positivo pozo “G” y negativo pozo “H”) las muestras se marcaron adecuadamente (los pozos C y F no tienen muestra). De lado derecho se observan los mismo pozos pero después de haber agregado el Stop solution.

7.5.- Escaneo de los microarreglos GeneChip® miRNA 3.0 Array

Después de la hibridación y los lavados correspondientes se realizó el escaneo de los Chips en el escáner de Affymetrix para poder obtener los archivos correspondientes para posteriormente ser analizados. Figura 5.

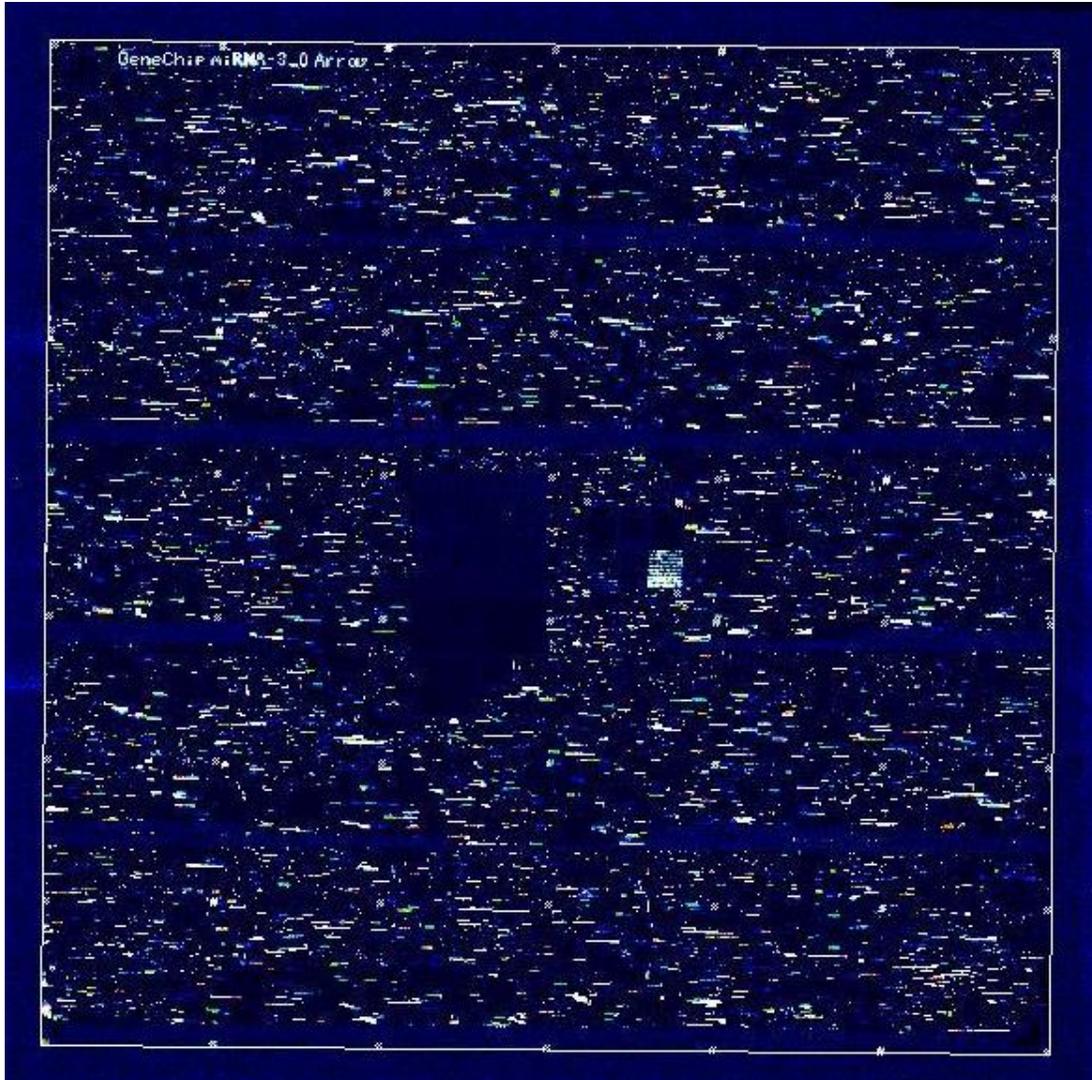


Figura 7. Imagen representativa de un GeneChip® miRNA 3.0 Array después de ser escaneados.

Una vez obtenidos los CEL.files se realizó el análisis de las diferentes muestras con el programa *Expression Console de Affymetrix* para poder obtener los CHP.file que son los datos ya normalizados, posteriormente se hizo otro análisis para poder identificar a los miRNAs expresados diferencialmente.

7.6.- Patrón de expresión de los microRNAs

Con las muestras obtenidas se realizaron 2 análisis, el primero fue comparar las muestras de espalda (muestra referencia) de 13.5 dpc contra las muestras de oído

(muestra problema) de 13.5 dpc, donde observamos que había 11 miRNAs con expresión a la alta y 14 miRNAs con una expresión a la baja. El segundo fueron las muestras referencia de 14.5 dpc. comparando con las muestras problema de 14.5 dpc, donde se observaron 14 miRNAs con expresión a la alta y 17 miRNAs con expresión a la baja. De los resultados que se obtuvieron se generó un HeatMap de los miRNAs con expresión diferencialmente significativa (figuras 6 y 7).

Para la etapa de 13.5 dpc. 11 miRNAs tuvieron una expresión elevada en el oído externo de ratón con respecto al tejido referencia (espalda de ratón), y 14 miRNAs con expresión disminuida, además de encontrar 3 pre-miRNAs del mir-124 (Tabla 4). Para la etapa de 14.5 dpc se encontraron 14 miRNAs con expresión elevada en el oído externo de ratón con respecto al tejido control, y 17 miRNAs con expresión disminuida, y también se encontraron los mismo 3 pre-miRNAs del mir-124 (Tabla 5). Se pudo observar que 7 miRNAs (mmu-miR-429, mmu-miR-375, mmu-miR-200a, mmu-miR-708, mmu-miR-27b-star, mmu-miR-23b y mmu-miR-24) se mantienen expresados y que 6 miRNAs (mmu-miR-7a-2-star, mmu-miR-135a-2-star, mmu-miR-10b, mmu-miR-615-3p, mmu-miR-9-star, mmu-miR-219-3p y mmu-miR-10a) no se expresan durante el proceso de desarrollo del oído externo en el ratón durante las etapas analizadas.

7.7.- RNA mensajeros blancos

Para poder determinar que posibles blancos pudieran tener los miRNAs con una expresión diferencial encontrados en el estudio, utilizamos los programas antes mencionados para realizar este análisis bioinformático, donde encontramos que gran parte de los genes candidatos en el desarrollo del oído externo en ratón pueden ser regulados por miRNAs, además de que el mmu-miR-27b y mmu-miR124 probablemente puedan regular *Eya1* y *Six4* respectivamente, debido a que los encontramos como predicciones en tres programas diferentes (Tabla 6). Por otra parte con estos mismos programas se pudieron determinar nuevos blancos, corroborando su función y posible participación con ayuda bibliográfica (Tabla 7).

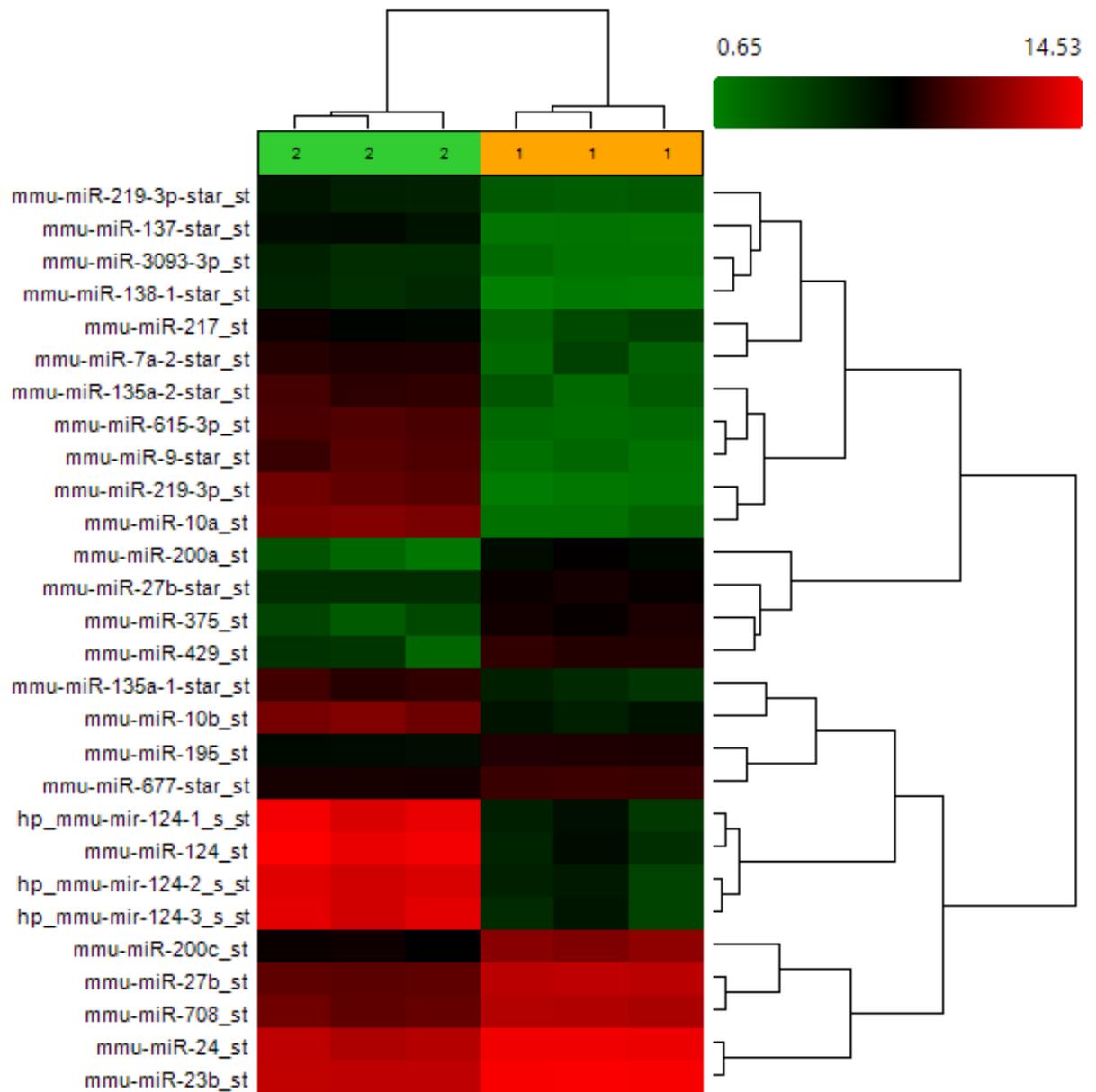


Figura 8. HeatMap de la etapa 13.5 dpc en ratón. miRNAs diferencialmente expresados en tejido de espalda (muestra referencia, 2) de ratón contra tejido de oído (muestra problema, 1) de ratón. Se realizó la agrupación jerárquica de los 25 miRNAs con expresión diferencialmente significativa. La escala representa la intensidad de expresión del miRNA (escala log2 intervalo entre -1.5 y 1.5).

Tabla 4. MicroRNAs diferencialmente expresados entre muestras de espalda de ratón de 13.5 dpc. y muestras de oído de ratón de 13.5 dpc.

Nombre del miRNA	Secuencia (5' -3')	Longitud (nt)	Veces de cambio	valor p	Posición cromosómica
miRNAs con expresion a la alta en oido de ratón de 13.5 dpc.					
mmu-miR-200c_st	UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA	23	3.17780672	0.00016416	chr6:124668340-124668408
mmu-miR-429_st	UAAUACUGUCUGGUAAUGCCGU	22	2.803265232	0.001648311	chr4:155428014-155428096
mmu-miR-27b_st	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	22	2.516262117	3.45E-06	chr13:63402020-63402092
mmu-miR-375_st	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	22	2.434758961	0.000286943	chr1:74947232-74947295
mmu-miR-200a_st	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	22	2.094521075	0.001648311	chr4:155429005-155429094
mmu-miR-708_st	AAGGAGCUUACAUCUAGCUGGG	23	1.923029171	0.001534762	chr7:103397934-103398042
mmu-miR-27b-star_st	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	22	1.849398137	0.000187592	chr13:63402020-63402092
mmu-miR-23b_st	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	21	1.565606212	1.04E-05	chr13:63401792-63401865
mmu-miR-24_st	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	22	1.557005417	0.001648311	chr13:63402516-63402583
mmu-miR-195_st	UAGCAGCACAGAAAUUUGGC	21	1.155290883	0.000176559	chr11:70048544-70048637
mmu-miR-677-star_st	GAAGCCAGAUGCCGUUCCUGAGAAGG	26	0.851768672	0.000616158	chr10:127522342-127522419
miRNAs con expresion a la baja en oido de ratón de 13.5 dpc.					
mmu-miR-3093-3p_st	UGUGGACACCGUGGGAGGUUGG	22	-1.05856938	0.001052084	chr:388019093-88019179
mmu-miR-138-1-star_st	CGGCUACUUCACAACACCAGGG	22	-1.17772542	0.001211757	chr9:122591994-122592092
mmu-miR-219-3p-star_st	AGAGUUGCGUCUGGACGUCCCCG	22	-1.29636708	0.001648311	chr17:34161928-34162037
mmu-miR-137-star_st	ACGGGUAUUCUUGGGUGGAUAAU	23	-1.95837442	0.000187592	chr3:118136775-118136847
mmu-miR-217_st	UACUGCAUCAGGAACUGACUGGA	23	-2.070185	0.0015333	chr11:28663728-28663835
mmu-miR-135a-1-star_st	UAUAGGGAUUGGAGCCGUGGCG	22	-2.61595919	0.001534762	chr9:106056455-106056544
mmu-miR-7a-2-star_st	CAACAAGUCCAGUCUGCCACA	22	-2.91094364	0.000286943	chr7:86033163-86033259
mmu-miR-135a-2-star_st	UGUAGGGAUGGAAGCAUGAA	21	-3.52784312	0.000286943	chr10:91534831-91534930
mmu-miR-10b_st	UACCCUGUAGAACCGAUUUGUG	23	-3.75483174	0.000286943	chr2:74564127-74564194
mmu-miR-615-3p_st	UCCGAGCCUGGGUCUCCUCUU	22	-4.17604326	3.45E-06	chr15:102845341-102845432
mmu-miR-9-star_st	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU	22	-4.23357368	0.000222353	chr3:88019520-88019608
mmu-miR-219-3p_st	AGAAUUGUGGCUUGGACAUCUGU	22	-4.9643376	7.53E-05	chr2:29701151-29701247
mmu-miR-10a_st	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	23	-5.49566611	3.45E-06	chr11:96178479-96178588
hp_mmu-mir-124-2_s_st		25	-6.88239969	0.000155327	chr3:17695662-17695770
hp_mmu-mir-124-3_s_st		25	-7.04033668	0.000187592	chr2:180628745-180628812
hp_mmu-mir-124-1_s_st		25	-7.04354415	0.000272509	chr14:65209494-65209578
mmu-miR-124_st	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC	20	-7.40640812	0.000176559	chr14:65209494-65209578

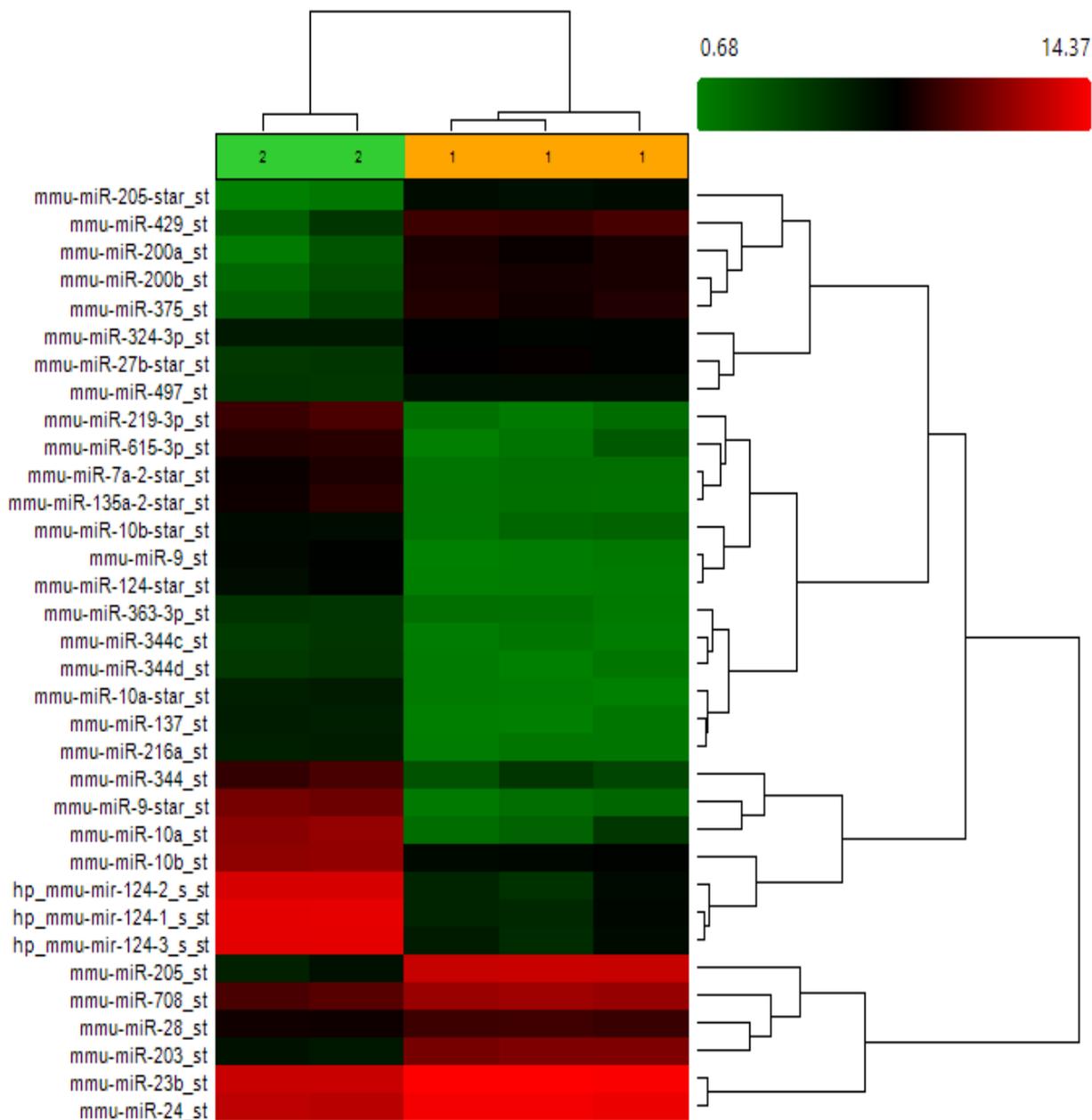


Figura 9. HeatMap de la etapa 14.5 dpc en ratón. miRNAs diferencialmente expresados en tejido de espalda (muestra referencia, 2) de ratón contra tejido de oído (muestra problema, 1) de ratón. Se realizó la agrupación jerárquica de los 31 miRNAs con expresión diferencialmente significativa. La escala representa la intensidad de expresión del miRNA (escala log2 intervalo entre -1.5 y 1.5).

Tabla 5. MicroRNAs diferencialmente expresados entre muestras de espalda de ratón de 14.5 dpc. y muestras de oído de ratón de 14.5 dpc.

Nombre del miRNA	Secuencia (5' -3')	Longitud (nt)	Veces de cambio	valor p	Posición cromosómica
miRNAs con expresión a la alta en oído de ratón de 14.5 dpc.					
mmu-miR-205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	22	5.920594261	0.000245067	chr1:195333657-195333724
mmu-miR-203	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	22	3.75826992	0.000245067	chr12:113369091-113369166
mmu-miR-429	UAAUACUGUCUGGUAUUGCCGU	22	3.374073314	0.001672635	chr4:155428014-155428096
mmu-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	22	2.744862354	0.00203314	chr4:155429005-155429094
mmu-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA	22	2.728004105	0.000426988	chr4:155429790-155429859
mmu-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	22	2.642994307	0.001135072	chr1:74947232-74947295
mmu-miR-205-star	GAUUUCAGUGGAGUGAAGCUCA	22	2.023300937	0.000602978	chr1:195333657-195333724
mmu-miR-708	AAGGAGCUUACAUCUAGCUGGG	23	1.919826894	0.00200916	chr7:103397934-103398042
mmu-miR-27b-star	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	22	1.755464964	0.001737456	chr13:63402020-63402092
mmu-miR-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	22	1.466495229	0.001672635	chr13:63402516-63402583
mmu-miR-23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	21	1.426305782	0.000426988	chr13:63401792-63401865
mmu-miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUGUA	22	1.083387669	0.000887661	chr11:70048219-70048302
mmu-miR-28	AAGGAGCUCACAGUCUUAUUGAG	22	1.060543532	0.001524519	chr16:24827941-24828026
mmu-miR-324-3p	CCACUGCCCCAGGUGCUGCU	20	0.714857251	0.001847873	chr11:69825545-69825633
miRNAs con expresión a la baja en oído de ratón de 14.5 dpc.					
mmu-miR-363-3p	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA	22	-0.76469877	0.001769097	chrX:50094870-50094944
mmu-miR-344c	UGAUCUAGUCAAGCCUGACAGU	23	-0.77036984	0.00200916	chr7:68982197-68982288
mmu-miR-344d	GAUUAUAAACACUGCCAGACUGA	22	-0.8551087	0.001966801	chr7:68828010-68828078
mmu-miR-216a	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	22	-1.39131955	0.000456842	chr11:28657012-28657083
mmu-miR-137	UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG	23	-1.44608857	0.00071289	chr3:118136775-118136847
mmu-miR-10a-star	CAAUUCGUUUCUAGGGGAAUA	22	-1.65863991	0.000657525	chr11:96178479-96178588
mmu-miR-10b-star	CAGAUUCGAUUCUAGGGGAAUA	22	-1.92695172	0.000426988	chr2:74564127-74564194
mmu-miR-124-star	CGUGUUCACAGCGGACCUUGAU	22	-2.1971481	0.001524519	chr14:65209494-65209578
mmu-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23	-2.2744996	0.000352121	chr3:88019520-88019608
mmu-miR-7a-2-star	CAACAAGUCCCAGUCUGCCACA	22	-2.83534084	0.001672635	chr7:86033163-86033259
mmu-miR-135a-2-star	UGUAGGGAUGGAAGCAUGAA	21	-3.01971365	0.001524519	chr10:91534831-91534930
mmu-miR-615-3p	UCCGAGCCUGGGUCUCCUCUU	22	-3.21670146	0.000245067	chr15:102845341-102845432
mmu-miR-344	UGAUCUAGCAAAGCCUGACUGU	23	-3.38778257	0.00203314	chr7:69022656-69022750
mmu-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUGUG	23	-3.81189023	0.000245067	chr2:74564127-74564194
mmu-miR-219-3p	AGAAUUGUGGCGUGACAUCUGU	22	-3.93527069	0.000362718	chr2:29701151-29701247
mmu-miR-9-star	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU	22	-5.12603124	0.000231568	chr3:88019520-88019608
mmu-miR-10a	UACCCUGUAGAUCGAAUUGUG	23	-5.60896954	0.000602978	chr11:96178479-96178588
hp_mmu-mir-124-3_s		25	-6.68973599	0.001036356	chr2:180628745-180628812
hp_mmu-mir-124-2_s		25	-6.7227873	0.001524519	chr3:17695662-17695770
hp_mmu-mir-124-1_s		25	-6.80916718	0.001108341	chr14:65209494-65209578

Tabla 6. Genes candidato del desarrollo del oído externo de ratón y los miRNAs que pueden regular su expresión.

Gen Candidato	Programa de predicción de blancos			
	miRNA body Map v1.1	microT v4	microT-CDS v5	Tarbase
<i>Bmp5</i>	mmu-miR-203	-----	-----	-----
<i>Cyp26b1</i>	mmu-miR-24, 200a, 205, 9, 217	-----	mmu-miR-195, 200 ^a	-----
<i>Dlx5</i>	mmu-miR-124, 203, 200a	-----	mmu-miR-124	mmu-miR-200a
<i>Dlx6</i>	mmu-miR-205	-----	mmu-miR-7a-2-star	-----
<i>Edn1</i>	mmu-miR-203	-----	mm-miR-344d, 135a-2-star	-----
<i>Ednra</i>	mmu-miR-203, 27b, 324-3p, 497, 195, 124	-----	mmu-miR-27b	mmu-miR-324-3p
<i>Eya1</i>	mmu-miR-23b, 27b, 200a, 203, 205, 497, 195, 124, 217	mmu-miR-27b	mmu-miR-124, 10a-star, 195, 497, 27b	-----
<i>Fgf8</i>	mmu-miR-195	-----	-----	-----
<i>Fgf10</i>	mmu-miR-9, 200c, 200b, 203, 375, 429, 137, 217, 344	-----	mmu-miR-137, 124, 9	-----
<i>Frem2</i>	mmu-miR-9, 200b, 24, 205, 27b, 200c, 429, 216a,	-----	mmu-miR-9, 429, 200c, 200b, 24	-----
<i>Gsc</i>	mmu-miR-200c	-----	-----	-----
<i>Hoxa1</i>	mmu-miR-23b, 28, 203, 9, 10a, 216a	-----	mmu-miR-23b	-----
<i>Hoxa2</i>	mmu-miR-23b	-----	-----	-----
<i>Irf6</i>	mmu-miR-24, 27b, 200c, 200b, 324-3p, 429, 216a,	-----	-----	-----
<i>Pax8</i>	mmu-miR-203, 9	-----	-----	-----
<i>Prrx1</i>	mmu-miR-203, 205, 375, 9, 10a, 124	-----	mmu-miR-3093-3p, 124, 9, 195, 497, 375	-----
<i>Prrx2</i>	mmu-miR-124, 216a	-----	-----	-----
<i>Prkra</i>	mmu-miR-10a, 10b	-----	mmu-miR-10b, 27b-star	-----
<i>Sall1</i>	mmu-miR-195, 497, 28, 205	-----	mmu-miR-195, 497	-----
<i>Six1</i>	mmu-miR-27b, 200a, 200b, 200c, 205, 375, 429, 10a, 217	-----	mmu-miR-217, 7a-2-star, 429, 375, 200a	-----
<i>Six4</i>	mmu-miR-23b, 24, 27b, 200a, 200b, 429, 497, 195, 9, 10a, 124, 216a, 217	mmu-miR-124, 9	mm-miR-344d, 124, 9, 205-star, 27b, 23b	-----
<i>Tcfap2a</i>	mmu-miR-195, 200a, 200b, 200c, 375, 429, 497, 137	-----	mmu-miR-137, 124-star, 497, 429, 200c, 200b	-----
<i>Wnt5a</i>	mmu-miR-205, 375	-----	mmu-miR-205-star, 200a	-----
<i>Chuk</i>	mmu-miR-23b, 124, 200a,	-----	mmu-miR-124, 23b	-----
<i>Hoxb1</i>	-----	-----	mmu-miR-124, 375	-----

Tabla 7. Nuevos genes candidato que posiblemente puedan estar involucrados en el desarrollo del oído externo de ratón y los miRNAs que pueden regular su expresión.

Gen Candidato	Programa de prección de blancos			
	miRNA body Map v1.1	microT v4	microT-CDS v5	Tarbase
Zeb1	mmu-miR-23b, 200a, 200b, 200c, 205, 375, 429, 497, 708, 195, 216a, 217	mm-miR-429, 200c, 200b, 200a	mm-miR-429, 375, 205, 200c, 200b, 200a, 23b	mmu-miR-200a, 200b, 200c, 324-3p, 429-3p
Zeb2	mmu-miR-23b, 27b, 200a, 200b, 200c, 203, 205, 324, 375, 429, 9, 137, 216a	mmu-miR-363-3p, 429, 200c, 200b, 200a	mmu-miR-363-3p, 344d, 137, 124-star, 10a-star, 9, 429, 375, 205, 203, 200c, 200b, 200a, 27b-star, 27b, 23b	mmu-miR-200a, 200b, 200c, 324-3p, 429-3p
Tob1	mmu-miR-200b, 200c, 429, 216a	mmu-miR-205-star, 24, 23b	mmu-miR-363-3p, 375, 324-3p, 205-star, 200c, 200b, 24, 23b	-----
Snai1	mmu-miR-200c, 200b, 429, 124	----- --	mm-miR-344d, 429	-----
Smad5	mmu-miR-195, 23b, 27b, 28, 200b, 200c, 205, 324-3p, 429, 497, 708, 124	----- --	, 23bmmu-miR-124, 7a-2-star, 195, 497, 429, 200c, 200b	mmu-miR-23b, 24, 27b, 124
Runx1	mmu-miR-23b, 27b, 28, 200b, 200a, 200c, 205, 375, 429, 497, 195, 9, 10a, 217	mmu-miR-27b	mmu-miR-9, 27b	mmu-miR-27b, 9
Runx2	mmu-miR-205, 375, 9, 137, 217	----- --	mmu-miR-217, 137, 124, 10a-star, 375, 205, 23b	-----
Crim1	mmu-miR-324-3p, 375, 497, 195, 9	----- --	mmu-miR-3093-3p, 9, 7a-2-star, 23b	-----
Dicer1	mmu-miR-24, 27b, 200a, 200b, 324-3p, 497, 9, 10a, 124, 217	----- --	mmu-miR-124, 10a-star, 27b	-----

8.- Discusión

Los miRNAs juegan un papel muy importante en diferentes procesos celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis, entre otros. También pueden participar en la regulación del desarrollo y la fisiología normal de los órganos. Muchos miRNAs muestran un patrón de expresión limitado espacial y temporalmente durante la embriogénesis y organogénesis (Amaral and Mattick, 2008; Cao et al., 2012; Hu and Gatti, 2011; Neilson and Sharp, 2008).

Es importante investigar los miRNAs involucrados en el desarrollo del oído externo normal, debido a que su estudio contribuirá no solo a sentar las bases para comprender las implicaciones de los miRNAs en el desarrollo embrionario normal, sino también para determinar su participación en la etiología de malformaciones del oído externo, como la microtia.

En este trabajo describimos el patrón de expresión de los miRNAs que participan en el desarrollo del oído externo de ratón, analizamos en dos distintas etapas del desarrollo (13.5 dpc. y 14.5 dpc.) por microarreglos de expresión Affymetrix GeneChip® miRNA 3.0. Encontramos que para la etapa de 13.5 dpc. 11 miRNAs tuvieron una expresión elevada en el oído externo de ratón con respecto al tejido referencia (espalda de ratón), y 14 miRNAs con expresión disminuida, además de encontrar 3 pre-miRNAs del mir-124 (Tabla 4). Para la etapa de 14.5 dpc encontramos 14 miRNAs con expresión elevada en el oído externo de ratón con respecto al tejido control, y 17 miRNAs con expresión disminuida, y también encontramos los mismo 3 pre-miRNAs del mir-124 (Tabla 5). Observamos que algunos de ellos cambian sus niveles de expresión de una etapa a otra, por ejemplo el mmu-miR-200c solo se expresa en la etapa 13.5, mientras que el mmu-miR-205 se expresa en la etapa 14.5 dpc, algunos de ellos se expresan en ambas etapas como mmu-miR-429, mmu-miR-375, mmu-miR-200a, mmu-miR-708, mmu-miR-27b-star, mmu-miR-23b y mmu-miR-24. En ambas etapas se detectaron con baja expresión: mmu-miR-7a-2-star, mmu-miR-135a-2-star, mmu-miR-10b, mmu-miR-615-3p, mmu-miR-9-star, mmu-miR-219-3p y mmu-miR-10a.

Poco se conoce sobre la participación de los miRNAs durante la organogénesis y el desarrollo de órganos o tejidos, debido a que aún se desconocen los mecanismos de regulación de éstos (Pasquinelli, 2012). Sin embargo, se han realizado diferentes investigaciones de la participación de los miRNAs en procesos del desarrollo en ratón del corazón, la retina, el cerebro y el oído interno, y se ha determinado la participación de conjuntos específicos de miRNAs durante estos procesos (Cao et al., 2012; Hackler et al., 2010; Petri et al., 2014; Sacheli et al., 2009).

La expresión de miRNAs durante el desarrollo del corazón de ratón demostró que existen patrones específicos durante las diferentes etapas analizadas (E18.5, E16.5, E14.5 y E12.5), además de observar que nueve miRNAs (mmu-miR-23b, mmu-miR-24, mmu-miR-23a, mmu-miR-375, mmu-miR-29a, mmu-miR-93, mmu-miR-25, mmu-let-7b, mmu-miR-27b) mantienen su expresión durante todo el proceso de desarrollo (Cao et al., 2012). Este patrón de expresión específico para el corazón nos dan un indicio que ciertos miRNAs son necesarios en un tiempo y espacio determinado, similar a estos resultados nosotros encontramos un patrón específico para el desarrollo del oído externo y observamos que siete miRNAs (mmu-miR-429, mmu-miR-375, mmu-miR-200a, mmu-miR-708, mmu-miR-27b-star, mmu-miR-23b, mmu-miR-24) también mantenían una expresión constante durante nuestras etapas de estudio. Otro aspecto relevante de los miRNAs es la gran cantidad de blancos que pueden regular, por ello la presencia de tres miRNAs (mmu-miR-23b, mmu-miR-24 y mmu-miR27b) involucrados en el desarrollo de ambas estructuras en tiempos similares, indicándonos la importancia que juegan estos pequeños reguladores de la expresión génica durante el desarrollo.

También se han realizado estudios sobre el desarrollo del cerebro, donde han evaluado el conjunto de miRNAs 17-92 el cual está involucrado en la regulación de la expansión y transición de células neurales madre a progenitores intermediarios en la neocórtex (Bian et al., 2013), por otra parte se demostró la participación del miR-9 en la regulación de la neurogénesis y el desarrollo del telencéfalo, ya que puede regular múltiples factores de transcripción (Shibata et al., 2011). Otro estudio

demonstró la participación del miR-124 en el desarrollo del cerebro, en donde observaron que es necesario para la diferenciación de neuronas, además se sabe que el miR-124 tiene tres orígenes distintos de transcripción, uno de ellos se encuentra dentro de uno de los exones del gen *Rncr3* y donde ratones knockouts de este gen disminuyen en un 60% la expresión del miR-124, originando una reducción del tamaño del cerebro, generación de células cónicas y células apoptóticas en hipocampo y córtex (Akerblom et al., 2012; Sanuki et al., 2011).

De acuerdo a lo anterior, existen miRNAs específicos para el desarrollo de ciertos órganos, estructuras o tejidos. En nuestros resultados encontramos en tejido de oído externo la expresión de los miRNAs *mmu-miR-9* y *mmu-miR-124* a la baja, lo que nos puede indicar que la expresión de ciertos miRNAs solo es necesaria en tiempo y estructuras específicas durante el desarrollo normal.

Por otra parte se ha determinado la presencia de malformaciones congénitas en el desarrollo del oído externo en humano, esta malformación es denominada microtia y puede tener diferente severidad, desde un simple cambio en el tamaño de la aurícula hasta la ausencia total del pabellón auricular (anotia), con posterior pérdida de la audición. De los genes involucrados en la microtia, del oído humano y del ratón, se pueden mencionar: *EYA1/Eya1*, *SIX5*, *Six1*, *TCOF1*, *HMX1*, *FGF3*, *Bmp4*, *Bmp5*, *Prrx1* y *HOXA2/Hoxa2* entre otros. (Brown et al., 2013; Luquetti et al., 2012; Minoux et al., 2013). Se ha podido determinar la participación de los miRNAs en la regulación de la expresión génica de algunos genes involucrados en el desarrollo del oído externo como *Hoxa2*, que es regulado por miR-3960 durante la diferenciación de los osteoblastos (Hu et al., 2011), también se ha demostrado que los miRNA star (hebra hermana u/o acompañante) pueden regular la función de los mRNA, como ejemplo, el miR-31star regula la expresión del mensajero y la proteína de FGF3 que es determinante en la leucoplasia oral (Xiao et al., 2012); en una investigación sobre la lesiones en el riñón generadas por candidemia, se realizó un análisis computacional para determinar la posible participación de los miR-204 y miR-211 en la regulación del gen *Hmx1*, estos análisis funcionales corroboraron esta participación, ya que observaron una disminución de la proteína (Li et al.,

2014). Otro ejemplo se refiere a un estudio realizado en muestras de tumores esporádicos de Wilms con pérdida de la heterocigocidad de 2q37, donde se encontró que el miR-562 está ausente y el cual puede regular la expresión del gen *Eya1*, esto se confirmó por análisis de la actividad de luciferasa del 3'UTR de *Eya1* (Drake et al., 2009).

Por lo antes mencionado podemos decir que existen genes involucrados en la generación de la microtia y que algunos de ellos están regulados por miRNAs, por lo que una inadecuada regulación por miRNAs o una falta de ellos podrían provocar el desarrollo de la malformación del oído externo como la microtia en individuos afectados; como se demostró en el estudio realizado en pacientes con microtia, donde obtuvieron muestras de oído externo después de una cirugía de reconstrucción, después de realizar microarreglos se observó que los pacientes con microtia tienen bajos niveles de expresión en los miRNAs hsa-miR-200c y hsa-miR-205 (Li et al., 2013). Cabe resaltar que estos mismo miRNAs mmu-miR-200c y mmu-miR-205 en nuestro estudio se encontraron con niveles altos de expresión, contrario a los de los pacientes con microtia, lo cual nos puede dar una idea de la participación de miRNAs específicos durante el desarrollo del oído externo.

En los últimos años también se ha visto un gran avance en el ámbito bioinformático, debido a la gran cantidad de datos que generan las nuevas metodologías utilizadas. Para poder darles un sentido biológico funcional se han desarrollado y diseñado programas predictivos con algoritmos que son capaces de ayudar a procesar toda esta información. Aunque aún se desconoce gran parte de la biología y función de los miRNAs, se han podido desarrollar programas que puedan predecir los blancos sobre los cuales probablemente puedan estar realizando su función, esto con referencia a su región semilla y características particulares del apareamiento de bases en las regiones específicas de la unión al blanco, algunos de los más utilizados son el body Map, miRBase, DIANA Tarbase, DIANA microT v4, DIANA microT-CDS y Target Scan (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011, 2014; Maragkakis et al., 2011; Paraskevopoulou et al., 2013; Vergoulis et al., 2012), En este trabajo decidimos utilizar estas herramientas, para poder realizar un análisis de

los miRNAs resultantes contra los genes candidatos involucrados en el desarrollo del oído externo en base al artículo del estudio de la microtia (Luquetti et al., 2012).

Como podemos observar en la tabla 6 de predicción de blancos, los programas antes mencionados nos ayudan a identificar miRNAs que pueden tener una mayor probabilidad de regular a los genes que participan en el desarrollo del oído externo, como el gen *Eya1*, *Frem2*, *Prrx1*, *Six1*, *Six4* y *Tcfap2a*, para los cuales se identificaron más de 3 miRNAs en dos programas distintos, indicándonos la importancia que pueden tener estos genes por la gran cantidad de miRNAs que pueden estar regulándolos.

Por otra parte con los mismos programas también se puede realizar una búsqueda de los miRNAs que tuvieron una expresión diferencial en nuestro análisis, para proponer nuevos blancos génicos, debido a que la función de estos genes puede estar implicada en el desarrollo del oído externo de ratón (Tabla7). Algunos de los genes que nosotros proponemos son *Zeb1* y *Zeb2*, que funcionan como factores de transcripción que participan en el desarrollo neural y en el desarrollo de tejidos derivados de células de la cresta neural (Shin et al., 2012). Otros genes que proponemos que pueden estar implicados en el desarrollo del oído externo son *Tob1* y *Smad5*, debido a *Tob1* puede regular negativamente la señalización BMP/Smad en osteoblastos y esta señalización también se ha visto implicada en el desarrollo de oído externo de ratón en etapas tempranas (Minoux et al., 2013; Yoshida et al., 2000). En un estudio realizado con embriones de diferentes etapas de desarrollo para evaluar la presencia del gen *Crim1* durante la organogénesis, se encontró por medio de hibridación *in-situ* que en la etapa de 13.5 dpc en la región de la aurícula existe una gran expresión del gen *Crim1* el cual pueda estar regulando alguna función aun no descrita para el oído externo (Kolle et al., 2000). Los condrocitos son parte importante en el desarrollo del oído externo ya que estas células son las encargadas en la formación de la matriz extracelular y del cartílago, se han determinado la participación de genes implicados en el proceso de condrogénesis como son los genes *Sani1*, *Runx1* y *Runx2* (Chen and Gridley, 2013; Yoshida and Komori, 2005).

Para poder demostrar la participación de estos nuevos genes candidatos se han desarrollado técnicas de inhibición

Con lo antes mencionado podemos darnos una idea de la importancia de la regulación de la expresión génica por parte de los miRNAs, ya que participan en una gran cantidad de procesos biológicos y como observamos en este estudio también tienen un importante rol en el desarrollo embrionario del oído externo normal de ratón; ya que la expresión de los miRNAs demostró tener un patrón específico de expresión y ser espacio-temporal. Por lo cual nos da pie a concluir que la inadecuada expresión o la ausencia de alguno de estos miRNAs probablemente pueden generar alguna malformación congénita como la microtia.

9.- Conclusiones

Se encontró un patrón espacio-temporal de expresión de los miRNAs, en dos diferentes etapas de desarrollo del oído externo en ratón.

Los resultados muestran la probable participación de nuevos genes candidato como *Zeb1*, *Zeb2*, *Tob1*, *Snai1*, *Smad5*, *Runx1*, *Runx2*, *Crim1* y *Dicer1* para el desarrollo del oído externo.

Encontramos que el mmu-miR-200c y el mmu-miR-205 tienen una expresión a la alta, contrario a lo reportado en condiciones patológicas en humano, donde estos dos miRNAs tienen una expresión disminuida en pacientes con microtia, esto es explicable con nuestros datos obtenidos en desarrollo normal del oído externo.

Este trabajo es el primer reporte sobre el perfil de expresión de microRNAs en el desarrollo del oído externo en ratón y en general, en mamíferos.

10.- Perspectivas

Este trabajo es la base para diversas investigaciones futuras. Ya que una vez identificados los miRNAs involucrados en el desarrollo del oído externo se podrán realizar análisis funcionales que permitan determinar cuáles son las posibles consecuencias de la modificación como el silenciamiento o sobreexpresión de estos elementos regulatorios.

Por otra parte, consideramos que este estudio sienta las bases para poder realizar investigación en humanos que presenten alteraciones en el desarrollo del oído externo, tal como la microtia, malformación cuya frecuencia es tan importante, que es la tercera causa de consulta en los servicios de Genética de los principales Institutos y Hospitales de Alta Especialidad de nuestro país.

11.- Literatura citada

- Akerblom, M., R. Sachdeva, I. Barde, S. Verp, B. Gentner, D. Trono, and J. Jakobsson, 2012, MicroRNA-124 Is a Subventricular Zone Neuronal Fate Determinant: *Journal of Neuroscience*, v. 32, p. 8879-8889.
- Alasti, F., A. Sadeghi, M. H. Sanati, M. Farhadi, E. Stollar, T. Somers, and G. Van Camp, 2008, A mutation in HOXA2 is responsible for autosomal-recessive microtia in an Iranian family: *American Journal of Human Genetics*, v. 82, p. 982-991.
- Alasti, F., and G. Van Camp, 2009, Genetics of microtia and associated syndromes: *Journal of Medical Genetics*, v. 46, p. 361-369.
- Alvarez, L. L., and H. G. Pardo, 1997, Guide for the care and use of laboratory animals - Natl-Res-Council: *Psicothema*, v. 9, p. 232-234.
- Amaral, P. P., and J. S. Mattick, 2008, Noncoding RNA in development: *Mammalian Genome*, v. 19, p. 454-492.
- Bian, S., J. Hong, Q. Li, L. Schebelle, A. Pollock, J. L. Knauss, V. Garg, and T. Sun, 2013, MicroRNA Cluster miR-17-92 Regulates Neural Stem Cell Expansion and Transition to Intermediate Progenitors in the Developing Mouse Neocortex: *Cell Reports*, v. 3, p. 1398-1406.
- Brown, K. K., L. M. Viana, C. C. Helwig, M. A. Artunduaga, L. Quintanilla-Dieck, P. Jarrin, G. Osorno, B. McDonough, S. R. DePalma, R. D. Eavey, J. G. Seidman, and C. E. Seidman, 2013, HOXA2 Haploinsufficiency in Dominant Bilateral Microtia and Hearing Loss: *Human Mutation*, v. 34, p. 1347-1351.
- Cao, L., L.-P. Kong, Z.-B. Yu, S.-P. Han, Y.-F. Bai, J. Zhu, X. Hu, C. Zhu, S. Zhu, and X.-R. Guo, 2012, microRNA expression profiling of the developing mouse heart: *International Journal of Molecular Medicine*, v. 30, p. 1095-1104.
- Chen, Y., and T. Gridley, 2013, Compensatory regulation of the Snai1 and Snai2 genes during chondrogenesis: *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 28, p. 1412-1421.
- Drake, K. M., E. C. Ruteshouser, R. Natrajan, P. Harbor, J. Wegert, M. Gessler, K. Pritchard-Jones, P. Grundy, J. Dome, V. Huff, C. Jones, and M. A. Aldred, 2009, Loss of Heterozygosity at 2q37 in Sporadic Wilms' Tumor: Putative Role for miR-562: *Clinical Cancer Research*, v. 15, p. 5985-5992.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser, and E. Izaurralde, 2009, Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation: *Rna-a Publication of the Rna Society*, v. 15, p. 21-32.
- Gurtan, A. M., and P. A. Sharp, 2013, The Role of miRNAs in Regulating Gene Expression Networks: *Journal of Molecular Biology*, v. 425, p. 3582-3600.
- Hackler, L., Jr., J. Wan, A. Swaroop, J. Qian, and D. J. Zack, 2010, MicroRNA Profile of the Developing Mouse Retina: *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 51, p. 1823-1831.
- Hansen, T. B., T. I. Jensen, B. H. Clausen, J. B. Bramsen, B. Finsen, C. K. Damgaard, and J. Kjems, 2013, Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges: *Nature*, v. 495, p. 384-388.
- Heffer, A., and L. Pick, 2013, Conservation and Variation in Hox Genes: How Insect Models Pioneered the Evo-Devo Field: *Annual Review of Entomology*, Vol 58, v. 58, p. 161-179.
- His, W., 1882, Aufstellung von Entwicklungsnormen: *Zweit. Monat. Anat. Menschlich Embryonen*, v. 2, p. 55.
- Hu, H., and R. A. Gatti, 2011, MicroRNAs: new players in the DNA damage response: *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 3, p. 151-158.

- Hu, R., W. Liu, H. Li, L. Yang, C. Chen, Z.-Y. Xia, L.-J. Guo, H. Xie, H.-D. Zhou, X.-P. Wu, and X.-H. Luo, 2011, A Runx2/miR-3960/miR-2861 Regulatory Feedback Loop during Mouse Osteoblast Differentiation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 286.
- Huntzinger, E., and E. Izaurralde, 2011, Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay: *Nature Reviews Genetics*, v. 12, p. 99-110.
- Jones, F. W., and W. I. Chuan, 1934, The development of the external ear: *Journal of Anatomy*, v. 68, p. 525-533.
- Kaikkonen, M. U., M. T. Y. Lam, and C. K. Glass, 2011, Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics: *Cardiovascular Research*, v. 90, p. 430-440.
- Kobayashi, S., T. Takebe, Y.-W. Zheng, M. Mizuno, Y. Yabuki, J. Maegawa, and H. Taniguchi, 2011, Presence of Cartilage Stem/Progenitor Cells in Adult Mice Auricular Perichondrium: *Plos One*, v. 6.
- Kolle, G., K. Georgas, G. P. Holmes, M. H. Little, and T. Yamada, 2000, CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis: *Mechanisms of Development*, v. 90, p. 181-193.
- Kozomara, A., and S. Griffiths-Jones, 2011, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data: *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. D152-D157.
- Kozomara, A., and S. Griffiths-Jones, 2014, miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data: *Nucleic Acids Research*, v. 42, p. D68-D73.
- Kuhn, S., S. L. Johnson, D. N. Furness, J. Chen, N. Ingham, J. M. Hilton, G. Steffes, M. A. Lewis, V. Zampini, C. M. Hackney, S. Masetto, M. C. Holley, K. P. Steel, and W. Marcotti, 2011, miR-96 regulates the progression of differentiation in mammalian cochlear inner and outer hair cells: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 2355-2360.
- Lewis, E. B., 1978, GENE COMPLEX CONTROLLING SEGMENTATION IN DROSOPHILA: *Nature*, v. 276, p. 565-570.
- Li, C., S. Hao, H. Wang, L. Jin, F. Qing, F. Zheng, P. Zhang, L. Chen, D. Ma, and T. Zhang, 2013, MicroRNA expression profiling and target genes study in congenital microtia: *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 77, p. 483-487.
- Li, X.-Y., K. Zhang, Z.-Y. Jiang, and L.-H. Cai, 2014, miR-204/miR-211 downregulation contributes to Candidemia-induced kidney injuries via derepression of Hmx1 expression: *Life Sciences*, v. 102, p. 139-144.
- Lin, L., B. Pan, H. Jiang, H. Zhuang, Y. Zhao, D. Guo, and D. Yu, 2011, Mutational Analysis of PACT Gene in Chinese Patients With Microtia: *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 155A, p. 906-910.
- Liu, G., J. S. Mattick, and R. J. Taft, 2013, A meta-analysis of the genomic and transcriptomic composition of complex life: *Cell Cycle*, v. 12, p. 2061-2072.
- Llano-Rivas, I., A. Gonzalez-del Angel, V. del Castillo, R. Reyes, and A. Carnevale, 1999, Microtia: A clinical and genetic study at the National Institute of Pediatrics in Mexico city: *Archives of Medical Research*, v. 30, p. 120-124.
- Luquetti, D. V., C. L. Heike, A. V. Hing, M. L. Cunningham, and T. C. Cox, 2012, Microtia: *Epidemiology and Genetics: American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 158A, p. 124-139.
- Maragkakis, M., T. Vergoulis, P. Alexiou, M. Reczko, K. Plomaritou, M. Gousis, K. Kourtis, N. Koziris, T. Dalamagas, and A. G. Hatzigeorgiou, 2011, DIANA-microT Web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association: *Nucleic Acids Research*, v. 39, p. W145-W148.

- McGinnis, W., and R. Krumlauf, 1992, HOMEBOX GENES AND AXIAL PATTERNING: *Cell*, v. 68, p. 283-302.
- Memczak, S., M. Jens, A. Elefsinioti, F. Torti, J. Krueger, A. Rybak, L. Maier, S. D. Mackowiak, L. H. Gregersen, M. Munschauer, A. Loewer, U. Ziebold, M. Landthaler, C. Kocks, F. le Noble, and N. Rajewsky, 2013, Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency: *Nature*, v. 495, p. 333-338.
- Minoux, M., C. F. Kratochwil, S. Ducret, S. Amin, T. Kitazawa, H. Kurihara, N. Bobola, N. Vilain, and F. M. Rijli, 2013, Mouse *Hoxa2* mutations provide a model for microtia and auricle duplication: *Development*, v. 140, p. 4386-4397.
- Moore, K. L., and T. V. N. Persaud, 2008, EMBRIOLOGÍA CLÍNICA: ESPAÑA, ELSEVIER SAUNDERS, 536 p.
- Mortensen, R. D., M. Serra, J. A. Steitz, and S. Vasudevan, 2011, Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs): *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 8281-8286.
- Neilson, J. R., and P. A. Sharp, 2008, Small RNA regulators of gene expression: *Cell*, v. 134, p. 899-902.
- Paraskevopoulou, M. D., G. Georgakilas, N. Kostoulas, I. S. Vlachos, T. Vergoulis, M. Reczko, C. Filippidis, T. Dalamagas, and A. G. Hatzigeorgiou, 2013, DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows: *Nucleic Acids Research*, v. 41, p. W169-W173.
- Pasquinelli, A. E., 2012, NON-CODING RNA MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship: *Nature Reviews Genetics*, v. 13, p. 271-282.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, J. Pelletier, and P. A. Sharp, 2006, Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells: *Molecular Cell*, v. 21, p. 533-542.
- Petri, R., J. Malmevik, L. Fasching, M. Akerblom, and J. Jakobsson, 2014, miRNAs in brain development: *Experimental Cell Research*, v. 321, p. 84-89.
- Pitts, M.**, 2002, A guide to the new ARENA/OLAW IACUC guidebook: USA.
- Porter, C. J. W., and S. T. Tan, 2005, Congenital auricular anomalies: Topographic anatomy, embryology, classification, and treatment strategies: *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 115, p. 1701-1712.
- Quintana, M., and S. Canún, 2006, Espectro facio-aurículo-vertebral y frecuencia de malformaciones asociadas: *Revista Hospital General Dr. Manuel Gea González*, v. 7 (1), p. 6-12.
- Rudnicki, A., and K. B. Avraham, 2012, microRNAs: the art of silencing in the ear: *Embo Molecular Medicine*, v. 4, p. 849-859.
- Sacheli, R., L. Nguyen, L. Borgs, R. Vandenbosch, M. Bodson, P. Lefebvre, and B. Malgrange, 2009, Expression patterns of miR-96, miR-182 and miR-183 in the developing inner ear: *Gene Expression Patterns*, v. 9, p. 364-370.
- Santagati, F., M. Minoux, S. Y. Ren, and F. M. Rijli, 2005, Temporal requirement of *Hoxa2* in cranial neural crest skeletal morphogenesis: *Development*, v. 132, p. 4927-4936.
- Sanuki, R., A. Onishi, C. Koike, R. Muramatsu, S. Watanabe, Y. Muranishi, S. Irie, S. Uneo, T. Koyasu, R. Matsui, Y. Cherasse, Y. Urade, D. Watanabe, M. Kondo, T. Yamashita, and T. Furukawa, 2011, miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through *Lhx2* suppression: *Nature Neuroscience*, v. 14, p. 1125-U177.
- Shibata, M., H. Nakao, H. Kiyonari, T. Abe, and S. Aizawa, 2011, MicroRNA-9 Regulates Neurogenesis in Mouse Telencephalon by Targeting Multiple Transcription Factors: *Journal of Neuroscience*, v. 31, p. 3407-3422.

- Shin, J.-O., E.-J. Kim, K.-W. Cho, E. Nakagawa, H.-J. Kwon, S.-W. Cho, and H.-S. Jung, 2012, BMP4 signaling mediates Zeb family in developing mouse tooth: *Histochemistry and Cell Biology*, v. 137, p. 791-800.
- Smyth, G. K., 2005, *Limma: Linear models for microarray data: Bioinformatics and Computational Biology Solution Using R and Bioconductor*, p. 397-420.
- Solda, G., M. Robusto, P. Primignani, P. Castorina, E. Benzoni, A. Cesarani, U. Ambrosetti, R. Asselta, and S. Duga, 2012, A novel mutation within the MIR96 gene causes non-syndromic inherited hearing loss in an Italian family by altering pre-miRNA processing: *Human Molecular Genetics*, v. 21, p. 577-585.
- Vergoulis, T., I. S. Vlachos, P. Alexiou, G. Georgakilas, M. Maragkakis, M. Reczko, S. Gerangelos, N. Koziris, T. Dalamagas, and A. G. Hatzigeorgiou, 2012, TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support: *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. D222-D229.
- Wienholds, E., and R. H. A. Plasterk, 2005, MicroRNA function in animal development: *Febs Letters*, v. 579, p. 5911-5922.
- Xiao, W., Z.-X. Bao, C.-Y. Zhang, X.-Y. Zhang, L.-J. Shi, Z.-T. Zhou, and W.-W. Jiang, 2012, Upregulation of miR-31*Is Negatively Associated with Recurrent/Newly Formed Oral Leukoplakia: *Plos One*, v. 7.
- Yekta, S., C. J. Tabin, and D. P. Bartel, 2008, MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence: *Nature Reviews Genetics*, v. 9, p. 789-796.
- Yoshida, C. A., and T. Komori, 2005, Role of Runx proteins in chondrogenesis: *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 15, p. 243-254.
- Yoshida, Y., S. Tanaka, H. Umemori, O. Minowa, M. Usui, N. Ikematsu, E. Hosoda, T. Imamura, J. Kuno, T. Yamashita, K. Miyazono, M. Noda, T. Noda, and T. Yamamoto, 2000, Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts: *Cell*, v. 103, p. 1085-1097.
- Zhao, Y., and D. Srivastava, 2007, A developmental view of microRNA function: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 32, p. 189-197.

Páginas Consultadas

<http://php.med.unsw.edu.au/embryology/>

<http://www.mirnabodymap.org/index.php>