



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DE microRNAs EN PLASMA DE RATONES 3xTg-AD
COMO POSIBLES BIOMARCADORES MOLECULARES
DE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. SYLVIA PATRICIA GARZA MANERO

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. MARIA DEL LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MÉXICO, D. F. Agosto, 2014



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca estudiantil otorgada para la realización del presente estudio.

A los proyectos de CONACyT 155242 y 176589, DGAPA-UNAM IN209413 y PAPIIT IA200312 por el sustento al presente estudio.

A mi tutora principal la Dra. Angélica Zepeda Rivera por la dirección del proyecto de investigación, las enseñanzas, guía y apoyo durante mi formación académica y mi crecimiento personal.

Al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez y la Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez por la asesoría, apoyo y disposición durante el desarrollo del proyecto de investigación.

A la C. Dra. Perla del Rocío Moreno Castilla, la Q.F.B. Patricia Suyapa Ferrera Boza y el Biol. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo por el asesoramiento técnico en el presente estudio.

A los miembros de mi Comité Tutor, Dra. María de Lourdes Massieu Trigo y Dr. Juan Miranda Ríos, por las observaciones y críticas durante el desarrollo del proyecto de investigación y la participación en mi formación académica.

A los miembros del Jurado de Examen de Grado, Dr. Félix Recillas Targa, Dr. Karen Manoutcharian Airapetian, Dr. Federico Bermúdez Rattoni, Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova y Dra. Gohar Gevorgyan Markosian, por los comentarios y sugerencias dirigidos a la mejora del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres,

A Paulina y Raúl,

A Mauricio,

A mis amigas y amigos,

A mis profesores,

Al laboratorio C-213 del Instituto de Investigaciones Biomédicas,

Al laboratorio 126 Norte del Instituto de Fisiología Celular,

Al laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian y del Dr. Federico Bermúdez Rattoni,

Por compartir conmigo esta experiencia, por las valiosas enseñanzas, por el apoyo brindado, por los ánimos transmitidos y por su cariño incondicional.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	4
Introducción	6
I. Enfermedad de Alzheimer	6
I.1. Epidemiología	7
I.2. Componentes histopatológicos	9
Proteína precursora del amiloide y péptido β -amiloide	9
Marañas neurofibrilares y tau	12
Pérdida neuronal y sináptica	14
I.3. Etiología	15
Factores genéticos	15
Factores celulares y moleculares	16
Factores ambientales de riesgo	20
I.4. Modelos transgénicos	21
3xTg-AD	22
I.5. Diagnóstico	23
I.6. Tratamiento	25
II. MicroRNAs	27
II.1. Biogénesis	28
II.2. Mecanismo de acción	29
II.3. Mecanismos de transferencia	30
II.4. MicroRNAs circulantes como biomarcadores moleculares	32
II.5. MicroRNAs asociados a la Enfermedad de Alzheimer	33
Justificación del trabajo experimental	36
Hipótesis	37
Objetivo general	37
Objetivos particulares	37
Esquema metodológico	38
Materiales y métodos	39

Animales	39
I. Análisis genético	39
II. Análisis histológico	40
III. Determinación de los perfiles de microRNAs en plasma	41
Resultados	44
I. Análisis genético	44
II. Análisis histológico	45
III. Determinación de los perfiles de microRNAs en plasma	48
III.1. Abundancia de los microRNAs en el plasma de ratones	53
III.2. Cambios en los niveles de los microRNAs plasmáticos relacionados con el envejecimiento	55
III.3. Diferencias particulares de los microRNAs plasmáticos asociadas al envejecimiento de los ratones 3xTg-AD	57
III.4. Variaciones en el contenido de microRNAs circulantes asociadas a la patología	58
Discusión	60
Conclusiones	67
Perspectivas	68
Referencias	69
Anexo I	85
Anexo II	94

ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no traducida del RNA mensajero
3xTg-AD	Modelo murino triple transgénico de AD
A β	Péptido β -amiloide
A β ₄₀	Péptido β -amiloide de 40 aminoácidos
A β ₄₂	Péptido β -amiloide de 42 aminoácidos
AD	Enfermedad de Alzheimer
APOE	Apolipoproteína E
APOE ₂	Alelo 2 de la apolipoproteína E
APOE ₃	Alelo 3 de la apolipoproteína E
APOE ₄	Alelo 4 de la apolipoproteína E
APP	Proteína precursora del amiloide
ATP	Adenosín trifosfato
cDNA	DNA complementario
CFH	Factor H del complemento
CNS	Sistema nervioso central
CSF	Líquido cefalorraquídeo
Ct	Ciclo umbral de amplificación
Δ Ct	$Ct_{miR} - Ct_{miR-39}$
$\Delta\Delta$ Ct	$(Ct_{miR} - Ct_{miR-39})_{Caso2} - (Ct_{miR} - Ct_{miR-39})_{Caso1}$
dl-P-bodies	Estructuras dendríticas semejantes a los cuerpos de procesamiento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECF	Líquido extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF4E	Factor eucariótico de inicio de la traducción 4E
FAD	Enfermedad de Alzheimer familiar
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FDG	Fluorodesoxiglucosa
fMRI	Resonancia magnética funcional

GSK-3	Glicógeno sintasa cinasa 3
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
iACh	Inhibidores de la acetilcolinesterasa
IF	Inmunofluorescencia
IHC	Inmunohistoquímica
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MCI	Impedimento cognitivo leve
MRE	Elemento de reconocimiento para miRNA
MRI	Resonancia magnética
miRISC	Complejo de silenciamiento RNA-inducido conteniendo al miRNA
miRNA	microRNA
miRTC	Control positivo de la retrotranscripción
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
MVB	Cuerpos multivesiculares
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NFT	Marañas neurofibrilar
NGS	Suero normal de cabra
NMDA	N-metil-D-aspartato
NTP	Nucleótido trifosfato
PB	Buffer de fosfatos
P-bodies	Cuerpos de procesamiento
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía de emisión de positrones
PFA	Paraformaldehído

PHF	Filamentos helicoidales apareados
PIB	Compuesto B de Pittsburgh
PPC	Control positivo de la PCR
pre-miRNA	Precursor del miRNA
pri-miRNA	Transcrito primario del miRNA
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
ptau	Proteína tau fosforilada
qPCR	PCR cuantitativa
qRT-PCR	RT: transcripción reversa
Ran-exp 5	Complejo GTP dependiente exportina 5
RISC	Complejo de silenciamiento RNA-inducido
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAD	Enfermedad de Alzheimer esporádica
snRNA	RNA pequeño nuclear
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
TA	Temperatura ambiente
WT	Ratones silvestres o controles cepa 129/C57BL6

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo caracterizado clínicamente por el deterioro progresivo de los procesos cognitivos, tales como la memoria y el aprendizaje, e histológicamente por la presencia y distribución en regiones cerebrales vulnerables de dos elementos principales: las placas neuríticas formadas a partir de la acumulación anormal del péptido β -amiloide ($A\beta$) y las marañas neurofibrilares (NFTs) compuestas de la proteína tau modificada patológicamente a nivel post-traducciona. El diagnóstico definitivo se realiza mediante el análisis *post mortem* del tejido cerebral en base a la identificación de los dos elementos mencionados, así que resulta necesario el desarrollo de biomarcadores que permitan detectar la enfermedad previamente.

Los hallazgos que describen la presencia de microRNAs (miRNAs) en circulación sanguínea, cuyo análisis es accesible a través de técnicas convencionales, proponen su funcionamiento como biomarcadores moleculares en una muestra no invasiva. Los miRNAs constituyen una clase de pequeñas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) no codificante que participan en la regulación post-transcripcional de diversos RNAs mensajeros (mRNAs) a base de su silenciamiento o degradación. Estas moléculas viajan en la sangre contenidas en complejos proteicos y vesículas especializadas, tales como los exosomas, y muestran perfiles específicos en suero/plasma asociados a diversas patologías.

El presente estudio se centra en la evaluación del contenido en circulación sanguínea de 84 miRNAs previamente reportados alterados en cerebro y líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes y modelos experimentales de algunas neuropatologías, incluida la AD. La determinación del contenido de miRNAs circulantes se realizó en un modelo murino de AD, el triple transgénico (3xTg-AD), que desarrolla agregados del péptido $A\beta$ y NFTs de la proteína tau de manera dependiente del envejecimiento, en dos diferentes etapas de la evolución de la histopatología: la primera en la que los rasgos característicos no están presentes y la segunda en la que se manifiestan. Se obtuvieron muestras de sangre de

ratones 3xTg-AD y controles o silvestres (WT) de 2-3 meses y 14-15 meses de edad, 6-7 muestras por cada uno de los 4 grupos experimentales, con la finalidad de realizar la comparación entre los genotipos en diferentes puntos temporales de la progresión de la histopatología característica de los 3xTg-AD. Se separó el plasma de cada muestra de sangre y se formaron 3 *pools* por grupo a partir del plasma de 2-3 ratones del mismo grupo. Posteriormente se llevó a cabo el aislamiento del RNA de cada *pool* a partir del cual se sintetizó el ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) que sirvió como templado para la detección y cuantificación de los 84 miRNAs mediante una plataforma múltiple que emplea la variante cuantitativa de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR).

No se observaron diferencias entre los perfiles de miRNAs circulantes de ratones 3xTg-AD y WT de 2-3 meses de edad. Al realizar las comparaciones entre ratones jóvenes y viejos, un grupo particular de miRNAs se modificó hacia los 14-15 meses, tanto en el caso de los 3xTg-AD como en el de los WT, fenómeno que se asocia al proceso de envejecimiento. Sin embargo, otro grupo de miRNAs mostró variaciones entre ratones jóvenes y viejos selectivamente en el caso de los 3xTg-AD, sugiriendo alteraciones particulares en el proceso de envejecimiento de estos ratones. En este sentido, se encontraron disminuciones estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos del miR-132, miR-138, miR-139, miR-146a, miR-146b, miR-22, miR-24, miR-29a y miR-29c, así como el aumento en los niveles del miR-346, entre ratones 3xTg-AD y WT de 14-15 meses de edad. En conclusión, la simple presencia de los transgenes en los ratones 3xTg-AD no modifica el perfil de los miRNAs circulantes, sino es la interacción de los transgenes acarreados por estos ratones con el proceso de envejecimiento la que ocasiona las alteraciones. El seguimiento de estas alteraciones en los niveles de los microRNAs mencionados podría resultar en una herramienta molecular de soporte al diagnóstico de la histopatología presentada por los ratones 3xTg-AD.

INTRODUCCIÓN

I. Enfermedad de Alzheimer

La AD es un desorden neurodegenerativo descrito por primera vez en 1907 por el médico alemán Alois Alzheimer quien reportó el caso de una paciente de 51 años de edad con un tipo particular de demencia, no antes visto, caracterizado por el notable deterioro de la memoria, la incapacidad para retener información y la progresiva pérdida de las funciones intelectuales. El análisis *post mortem* del tejido cerebral reveló la presencia de arreglos desordenados de fibrillas intracelulares, de focos de almacenamiento de material extracelular y la desaparición de numerosas células (Alzheimer, 1907).

A nivel macroscópico, el encéfalo con AD muestra reducción en peso y volumen, la corteza se nota adelgazada, la formación hipocampal atrofiada y los ventrículos ampliados (Figura 1).

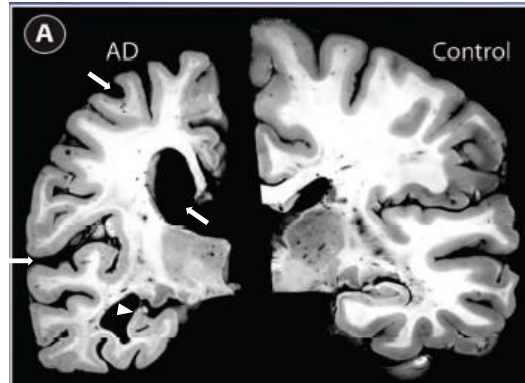


Figura 1. Comparación de cortes coronales de cerebros *post mortem* con AD (izquierda) y con función cognitiva normal (derecha). Se evidencia el encogimiento del cerebro, la ampliación de las fisuras y ventrículos (flechas) y la atrofia hipocampal (cabeza de flecha) (modificada de Holtzman, et. al. 2011).

A nivel microscópico se reconocen tres rasgos histopatológicos de la enfermedad, descritos previamente por Alois Alzheimer: las NFTs formadas por filamentos helicoidales apareados (PHF) de la proteína tau, una proteína de unión a microtúbulos, en un estado patológico de hiperfosforilación; los acúmulos

extracelulares del péptido A β , producto proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP), insolubles y agregados; y la pérdida neuronal masiva en las regiones cerebrales vulnerables como lo son el sistema límbico y paralímbico (hipocampo, amígdala, *nucleus basalis* de Meynert, corteza entorrinal y transentorrinal), los lóbulos temporales y parietales, principalmente en cortezas de asociación.

Las estructuras mencionadas están altamente involucradas en procesos de memoria y aprendizaje. Como resultado ocurre un notable deterioro de las funciones cognitivas que inicia con el impedimento para almacenar nuevas memorias y continúa con la alteración del aprendizaje, el razonamiento y la abstracción, conduciendo a un estado de demencia en el que el paciente es incapaz de valerse por sí mismo.

1.1. Epidemiología

La AD es la enfermedad neurodegenerativa más común durante la vejez y la principal forma de demencia abarcando del 50-75% de todos los casos (World Alzheimer Report, 2009). La prevalencia de la demencia aumenta con la edad, siendo el envejecimiento el principal factor de riesgo: se calcula que en adultos menores a los 65 años es del 1%, cifra que se duplica cada 5 años alcanzando el 30% en personas mayores de 85 años (World Alzheimer Report, 2009).

En el año 2010 se calculaba que existían 35.6 millones de personas con demencia en el mundo. El fenómeno de envejecimiento de las sociedades y el aumento en la esperanza de vida, éstos principalmente dados en los países en vías de desarrollo, ocasionarán un incremento exponencial en la presentación de casos de demencia. A la vez, la mayor información y reconocimiento de la demencia influirá en el registro de un mayor número. Se calcula que para 2030 habrán 65.7 millones de afectados en el mundo, mientras que para 2050, 115.4 millones (Figura 2) (World Alzheimer Report, 2009). Es decir, el número de enfermos calculado en 2010 se duplicará aproximadamente cada 20 años.

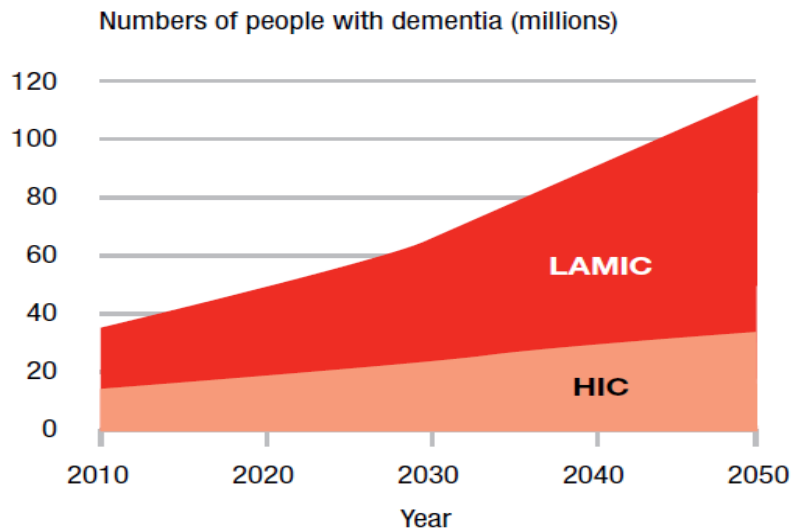


Figura 2. Estimación de personas con demencia en los próximos años, considerando la contribución diferencial de los países desarrollados (en claro) y en vías de desarrollo (en oscuro) (World Alzheimer Report, 2009).

Cabe mencionar que Latinoamérica es una de las regiones con mayor prevalencia media de casos de demencia a nivel mundial (Figura 3).

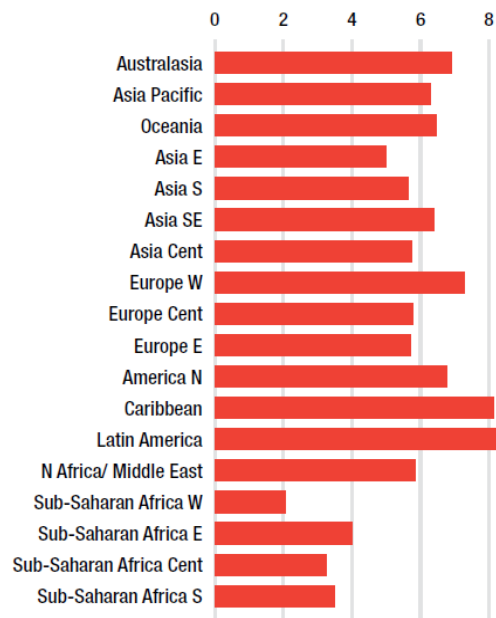


Figura 3. Prevalencia media de casos de demencia en mayores de 65 años (World Alzheimer Report, 2009).

Así que, tanto en México como en el mundo, la AD constituye un creciente problema de salud pública.

1.2. Componentes histopatológicos

Proteína precursora del amiloide y péptido β -amiloide

La APP es una proteína transmembranal codificada por el gen *app* localizado en el cromosoma 21 con funciones fisiológicas importantes durante el desarrollo y en el cerebro adulto (Thinakaran y Koo, 2008). Las más estudiadas se atribuyen a su dominio trófico mediante el que promueve el crecimiento y la diferenciación neuronal (Saitoh, et. al. 1989), la sobrevivencia celular (Whitson, et. al. 1989), la extensión neurítica (Jin, et. al. 1994), la formación de sinapsis y los procesos de memoria y aprendizaje (Roch, et. al. 1994; Huber, et. al. 1997). De hecho, los ratones deficientes de APP presentan una reducción de marcadores sinápticos, déficits en plasticidad sináptica y en tareas de memoria y aprendizaje (Dawson, et. al. 1999).

El procesamiento de la APP puede seguir dos vías: la amiloidogénica y la no amiloidogénica (Figura 4). En la vía amiloidogénica, la APP sufre un primer corte proteolítico realizado por la β -secretasa (Vassar, et. al. 1999), seguido de un segundo corte a cargo de la γ -secretasa, cuyo sitio catalítico está conformado por las presenilinas PS1 y PS2 (De Strooper, et. al. 1998), generándose el péptido $A\beta$. Dependiendo de la región en la que realice el corte, se pueden obtener fragmentos cortos de 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$) e incluso menores, o fragmentos largos e insolubles de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) y mayores. En la vía no amiloidogénica, el primer corte lo realiza la α -secretasa dentro de la secuencia del péptido $A\beta$ por lo que en su lugar se produce el péptido P3 de menor tamaño y mayor solubilidad (Koike, et. al. 1999). El procesamiento amiloidogénico es más frecuente en membranas de organelos intracelulares, principalmente en endosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, mientras que en la membrana plasmática predomina la vía de la α -secretasa (Thinakaran y Koo, 2008). Además, la generación del péptido $A\beta$ se asocia a microdominios membranales ricos en colesterol y esfingolípidos denominados balsas lipídicas (Riddell, et. al. 2001; Ehehalt, et. al. 2003).

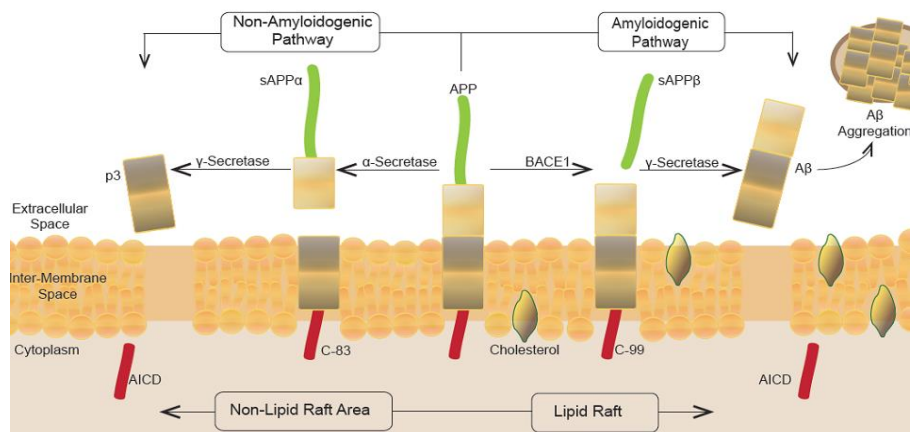


Figura 4. Procesamiento de la APP. Izquierda: la α -secretasa realiza un primer corte proteolítico seguido de un segundo por la γ -secretasa generando el péptido soluble P3. Derecha: los cortes proteolíticos los efectúan la β y la γ -secretasa liberando al péptido β -amiloide, lo que ocurre preferencialmente en regiones membranales ricas en colesterol o balsas lipídicas (Read y Suphioglu, 2013).

El péptido A β es el principal componente de los depósitos extracelulares o placas características de la AD (Glenner y Wong, 1984). Dependiendo de su densidad y composición, se pueden clasificar como placas difusas o neuríticas (Figura 5A). Las neuríticas están compuestas por agregados densos principalmente de A β , entre otras proteínas, de neuritas distróficas, de microglía activada y de astrocitos reactivos que las rodean (Figura 5A) (Dickson, 1997). Los agregados fibrilares encontrados en este tipo de placas inducen cambios neurodegenerativos evidenciados por la presencia de neuritas distróficas, muerte neuronal, pérdida sináptica y neuroinflamación (Kowall, et. al. 1991; Pike, et. al. 1993; Lorenzo y Yankner, 1994; Knowles, et. al. 1999).

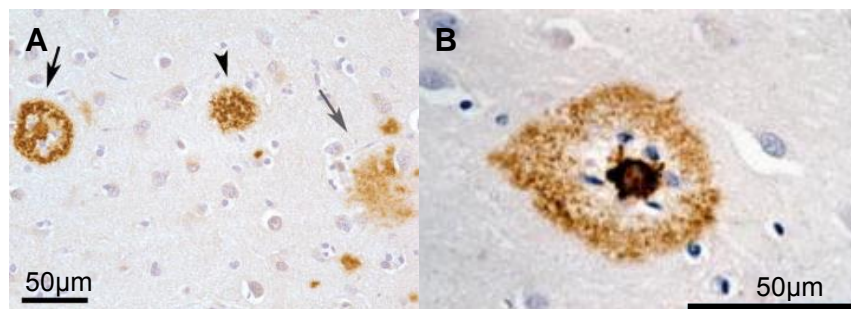


Figura 5. Inmunotinciones anti-A β en casos de AD. A: placa madura identificada por un core denso (flecha negra), placa primitiva (punta de flecha) y agregados difusos del péptido (flecha gris) (modificada de Heuer, et. al. 2012). B: placa neurítica, el core denso de péptido A β y los núcleos gliales (azules) rodeados por agregados difusos del péptido (modificada de Eisenberg y Jucker, 2012).

La distribución de los agregados densos abarca corteza prefrontal, temporal, parietal, occipital, giro parahipocampal, hipocampo y amígdala, mientras que los agregados difusos se encuentran también en regiones tales como caudado y cerebelo. La formación de depósitos es un evento temprano en la patología que se detecta en tejido cerebral de sujetos con impedimento cognitivo leve (MCI). Sin embargo, no se encuentran diferencias entre la cantidad de depósitos de estos sujetos con respecto a los casos de AD, lo que indica una pobre relación entre la carga de A β y la evolución de la enfermedad (Savva, et. al. 2009). En efecto, el patrón de distribución de los agregados de A β no es constante entre los pacientes ni exclusivo de los circuitos alterados en la AD, tampoco la carga de A β coincide con el deterioro cognitivo ni con la pérdida neuronal o la atrofia cerebral presentes en la AD (Gómez-Isla, et. al. 1997; Savva, et. al. 2009), cuestionando su relevancia en la patología. No obstante, los hallazgos que describen la capacidad de los oligómeros solubles del péptido A β de inducir pérdida neuronal (Lambert, et. al. 1998), de impedir la potenciación a largo plazo (LTP) en hipocampo (Walsh, et. al. 2002) y otros procesos de plasticidad sináptica como la memoria (Shankar, et. al. 2008), en conjunto con estudios realizados en modelos transgénicos que revelan déficits en la transmisión sináptica hipocampal previos a la formación de placas (Hsia, et. al. 1999), fundamentan la importancia del péptido A β durante la patología. Se ha propuesto que las placas no son neurotóxicas por sí solas, sino que actúan como fuentes o reservorios de estas estructuras solubles de A β (Koffie, et. al. 2009).

Por otro lado, la producción del péptido A β y su liberación al fluido intersticial son promovidas por la actividad sináptica inducida mediante estímulos electrofisiológicos (Cirrito, et. al. 2005), implicando funciones fisiológicas del péptido. Diversos estudios han propuesto que A β reduce la excitabilidad postsináptica formando parte de un feedback negativo en la postsinapsis, mientras que participa en uno positivo en la presinapsis modulando la liberación de glutamato. El efecto en presinapsis requiere de niveles particulares de A β , siendo insuficientes los bajos e inhibidores los altos. De producirse en exceso el péptido, se bloquea la transmisión glutamatérgica desde presinapsis y la respuesta

excitadora postsináptica se impide, generando frecuentemente depresión a largo plazo (LTD), eventos que están presentes en la AD (Palop y Mucke, 2010a y b).

Marañas neurofibrilares y tau

Tau es una proteína de unión a microtúbulos expresada predominantemente en el axón neuronal. Su función como moduladora de la dinámica de microtúbulos se regula mediante fosforilación y desfosforilación, siendo su estado desfosforilado el que permite su unión a microtúbulos y por lo tanto la estabilización de los mismos. Tau es fundamental en procesos de desarrollo, crecimiento axónico y transporte axonal (Billingsley y Kincaid, 1997; Lovestone y Reynolds, 1997). Sin embargo, en la AD es el componente mayoritario de las NFTs (Grundke-Iqbal, et. al. 1986a). Las NFTs son agregados intraneuronales complejos, en los que tau se encuentra en un estado patológico de hiperfosforilación (Figura 6) (Grundke-Iqbal, et. al. 1986b), que en un inicio interrumpen las funciones neuronales normales al secuestrar a otras proteínas, impedir el transporte axonal e interferir con el sistema ubiquitina-proteosoma, provocando posteriormente la muerte neuronal. Las NFTs están presentes en las neuritas distróficas y son responsables de las lesiones llamadas fantasmas celulares, ambas características de la AD (Figura 6).

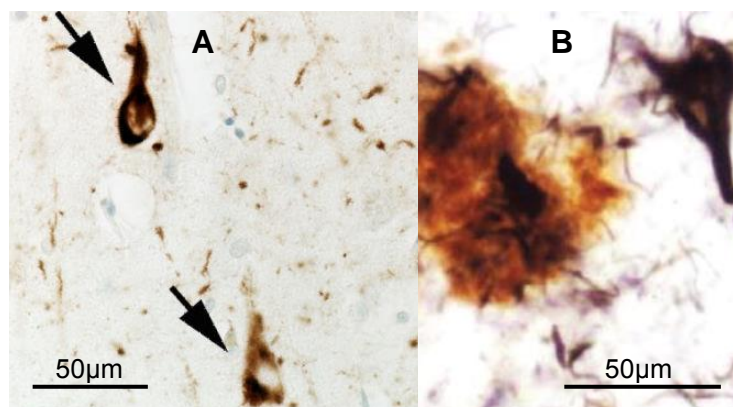


Figura 6. Inmunotinciones de cerebros de AD para la proteína tau fosforilada. A: marañas neurofibrilares intraneuronales (flecha de arriba) y fantasmas celulares (flecha de abajo) (modificada de Kövari, et. al. 2011). B: a la derecha marañas neurofibrilares intraneuronales y a la izquierda placa neurítica (péptido A β en café) con neuritas distróficas inmunopositivas (en negro) (modificada de Nelson, et. al. 2012).

Se ha sugerido que durante la evolución de la AD tau se encuentra río abajo de A β . Las alteraciones en tau que llevan a su agregación en otras patologías, como es el caso de un tipo particular de demencia frontotemporal consecuencia de mutaciones en el gen de esta proteína, *mapt*, son suficientes para causar neurodegeneración, pero en ningún caso se ha encontrado amiloidosis (Hardy, et. al. 1998). En este sentido, al llevar a cabo una cruce entre dos ratones transgénicos, uno que acarrea una mutación en el gen de tau produciendo agregados intraneuronales y otro que contiene la APP mutada sobreproduciendo A β y formando depósitos extracelulares, se genera un mayor número de agregados intraneuronales de tau que en el transgénico simple correspondiente, mientras que la patología amiloide se mantiene en los mismos niveles (Lewis, et. al. 2001). Se ha probado también que este péptido induce tanto la hiperfosforilación de tau, como su agregación en NFTs (Götz, et. al. 2001). Además, tau ha demostrado ser necesaria para la neurotoxicidad de A β desde que en ratones transgénicos tau-deficientes el péptido es incapaz de promover efectos neurodegenerativos y el déficit en la memoria se reestablece (Roberson et. al. 2007). No obstante, ni el patrón de distribución de las placas de A β ni su número total están relacionados con los de las NFTs (Braak y Braak, 1991).

La taupatía, en contraste con la patología amiloidea, muestra un patrón temporal y espacial constante entre los pacientes con AD y relacionado tanto a las regiones alteradas en la patología, como a la severidad de la enfermedad. Las NFTs aparecen sucesivamente en corteza transentorrinal, corteza entorrinal, hipocampo y finalmente en neocorteza, en especial, en áreas asociativas (Braak y Braak, 1991). Aun cuando la taupatía es responsable de la pérdida neuronal observada en la demencia frontotemporal con mutaciones en el gen *mapt*, en la AD no parece ser la única causante. Estudios *post mortem* en cerebros con AD y controles prueban que, si bien tau y la pérdida neuronal aumentan en paralelo con la evolución de la enfermedad, el número de neuronas perdidas excede la presentación de las NFTs (Gómez-Isla, et. al. 1997).

Pérdida neuronal y sináptica

La pérdida neuronal detectada por Alois Alzheimer en sus estudios *post mortem* fue posteriormente confirmada por varios grupos que estudiaron regiones cerebrales como la neocorteza y el hipocampo (Terry, et. al. 1981; Mountjoy, et. al. 1983; Mann et. al. 1985; Neary, et. al. 1986) encontrando una disminución principalmente en el número de neuronas piramidales. La correlación entre la pérdida neuronal y el curso de la enfermedad evidencian su contribución en el deterioro cognitivo (Neary, et. al. 1986; Gómez-Isla, et. al. 1997). Sin embargo, estudios ultraestructurales (Davies, et. al. 1987; DeKosky, et. al. 1990) y mediciones de los niveles de sinaptofisina (Masliah, et. al. 1989; Heinonen, et. al. 1995) realizados en biopsias y/o autopsias de pacientes con AD en comparación con muestras control, revelan que la reducción en el número de sinapsis excede a la del número de neuronas lo que se refleja en el decremento del número de sinapsis por neurona. Este suceso es notable en corteza y drástico en hipocampo.

El análisis estadístico entre los diferentes marcadores histopatológicos y la sintomatología clínica de la AD indica que la disminución en la densidad sináptica es el mejor correlato del deterioro cognitivo (DeKosky, et. al. 1990; 1996; Terry, et. al. 1991). Además, se trata de un evento temprano evidente en pacientes con MCI (Scheff, et. al. 2006). Las sinapsis representan sitios vulnerables en la AD (Selkoe, 2002), previamente a la pérdida ocurren alteraciones a nivel local que comprometen su función. La evaluación de autopsias de pacientes con AD revela niveles inferiores de proteínas asociadas a vesículas sinápticas tales como sinaptobrevina, sinaptotagmina y sinaptofisina, que son necesarias para los procesos de exocitosis durante la liberación de los neurotransmisores (Sze, et. al. 2000). Por otro lado, existen mecanismos de compensación observados en etapas tempranas de la patología probablemente encaminados a restaurar la disfunción. El aumento del área de contacto sináptico (DeKosky y Scheff, 1990), de los niveles de proteínas asociadas a plasticidad (Counts, et. al. 2006; Leuba, et. al. 2008) y de la actividad sináptica medida a través de resonancia magnética

funcional (fMRI) bajo paradigmas de memoria y aprendizaje, representan algunos de éstos (Sperling, et. al. 2007).

1.3. Etiología

Factores genéticos

La AD se asocia a una forma familiar (FAD) con un patrón de herencia autosómico dominante en menos del 1% de todos los casos. Se han identificado tres genes que contienen todas las mutaciones reportadas para la FAD: el gen que codifica para la APP ubicado en el cromosoma 21 (Goate, et. al. 1991), el que codifica para la PS1 en el cromosoma 14 (Sherrington, et. al. 1995) y el que codifica para la PS2 en el cromosoma 1 (Levy-Lahad, et. al. 1995; Rogaev, et. al. 1995). Los efectos de las mutaciones recaen en el procesamiento de la APP influyendo o no en los niveles generados del péptido A β , pero incrementando la relación A β_{42} /A β_{40} de relevancia desde que el A β_{42} ha probado ser más insoluble y propenso a agregación (Kim, et. al. 2007; Welander, et. al. 2009). El procesamiento alterado de la APP resulta en la presentación temprana de la sintomatología clínica antes de los 60 años.

La mayor parte de los casos cursan con un inicio clínico tardío y no se asocian a eventos familiares. Esta forma de la AD se conoce como esporádica (SAD) y, el principal factor de riesgo genético reconocido es la presencia del alelo 4 (APOE₄) de la apolipoproteína E (APOE). En evaluaciones epidemiológicas se ha encontrado que la frecuencia del APOE₄ en pacientes con SAD es mayor al 50-60%, duplicando o triplicando la cifra de 16-30% de prevalencia en sujetos control (Strittmatter, et. al. 1993; Corder, et. al. 1993). El riesgo de padecer Alzheimer en personas mayores a los 60 años aumenta del 20% para portadores de los alelos APOE₂ y/o APOE₃, al 47% para portadores de un solo alelo APOE₄ y al 91% para portadores del alelo APOE₄ en estado homocigoto (Corder, et. al. 1993). Además del incremento en la susceptibilidad de padecer AD, la variante APOE₄ correlaciona con la disminución en la edad de inicio de presentación de los

síntomas, mas no tiene influencia alguna en el curso ni la duración de la enfermedad (Corder, et. al. 1993; Gómez-Isla, et. al. 1996). Los cerebros de pacientes con AD portadores del alelo APOE₄ muestran una mayor cantidad de depósitos de A β con respecto a los sujetos APOE₃/APOE₃ (Schmechel, et. al. 1993). De hecho, la presencia de APOE₄ en los casos de AD no correlaciona con la progresión de la demencia ni con las NFTs, sino únicamente con la cantidad de depósitos de A β (Gómez-Isla, et. al. 1996). En un modelo de amiloidosis transgénico para las diferentes isoformas de la APOE, se probó que éstas no tienen influencia alguna sobre la producción del péptido A β , pero que regulan diferencialmente su depuración, siendo APOE₄ la que posee menor eficiencia (Castellano, et. al. 2011).

Factores celulares y moleculares

La etiología de la AD no se ha resuelto todavía. La hipótesis que reúne mayor evidencia, aunque se mantiene controversial, es la llamada cascada β -amiloide que propone como evento desencadenante el desbalance entre la producción y la depuración del péptido A β ocasionando la elevación de sus niveles y su deposición. Propone la teoría que el resto de los elementos de la AD, incluidas las NFTs, son resultado de este desbalance (Hardy y Selkoe, 2002). La genética involucrada en la AD aporta fuerte sustento puesto que los casos familiares están relacionados con el metabolismo de la APP y el principal factor genético de riesgo con la depuración de A β . Uno de los argumentos más sólidos contra la teoría es la, antes mencionada, ausencia de correlación entre la distribución y cantidad de depósitos con el deterioro cognitivo. Si bien la toxicidad sináptica y neuronal que han mostrado tener los oligómeros solubles del péptido A β pudieran ser la explicación, los mecanismos por los que A β ocasiona pérdida sináptica y muerte neuronal, así como las razones de su desregulación en los casos esporádicos, no se han esclarecido por completo y otros factores deben ser considerados.

La actividad sináptica aumenta la demanda de adenosín trifosfato (ATP) y por lo tanto del metabolismo oxidante de la glucosa, principalmente de manera local en los contactos sinápticos. Una medida de la actividad sináptica es la tomografía por

emisión de positrones (PET) utilizando como ligando a la fluorodesoxiglucosa (FDG). Mediante esta aproximación se ha demostrado que los pacientes que cursan con AD presentan una disminución progresiva en la utilización de la glucosa en regiones susceptibles para la patología (Pietrini, et. al. 2000). El metabolismo oxidante de la glucosa tiene lugar en la mitocondria. Diversas alteraciones mitocondriales se han observado en los casos de AD, entre ellas, la reducción en la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria (Mutisya, et. al. 1994), mutaciones en el ADN mitocondrial (mtDNA) asociadas a los casos de SAD (Coskun, et. al. 2004) y mitocondrias anormales en cuanto a número y tamaño lo que sugiere una dinámica mitocondrial de fusión-fisión afectada que impacta en términos de producción energética, pero también de localización subcelular (Hirai, et. al. 2001). De hecho, en la patología hay un menor número de mitocondrias en los procesos neuronales lo que compromete la demanda energética local y por ende el funcionamiento sináptico (Wang, et. al. 2009).

Además, en citoplasma se encuentran productos mitocondriales de degradación implicando procesos alterados del sistema autofagia-lisosoma (Hirai, et. al. 2001; Moreira, et. al. 2007). En efecto, se ha reportado la presencia de vacuolas autofágicas defectuosas en neuritas de células vulnerables en los casos de AD (Nixon, et. al. 2005), evento de gran relevancia para la enfermedad ya que la depuración de proteínas dañadas o agregadas se lleva a cabo mediante este sistema autofagia-lisosoma. De manera interesante, mutaciones en PS1 asociadas a la FAD interfieren con la acidificación de los lisosomas lo que conduce a la acumulación de vacuolas autofágicas en los procesos neuronales conteniendo proteínas sinapto y neurotóxicas (Lee, et. al. 2010).

Otro elemento importante de la AD es el estrés oxidante, definido como el desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su remoción mediante antioxidantes. Una de las principales fuentes de generación de ROS es la fosforilación oxidante que ocurre en la mitocondria. Como consecuencia de la alta demanda energética de las sinapsis y el mal funcionamiento mitocondrial, aumentan los niveles de ROS produciendo daño oxidante a biomoléculas. El mal

funcionamiento de las enzimas mitocondriales dañadas y las mutaciones en el mtDNA conducen a la disfunción mitocondrial e, inclusive, a la activación de las cascadas apoptóticas. Se ha encontrado en cerebros de pacientes con AD que los niveles de 4-hidroxi-nonenal, 3-nitrotirosina y de 8 hidroxideoxiguanosina, productos de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente, están elevados (Subbarao, et. al. 1990; Smith, et. al. 1991; Mecocci, et. al. 1994). De manera interesante, los marcadores de daño oxidante están acentuados en la sinapsis con respecto al soma neuronal, sugiriendo el papel del estrés oxidante en la pérdida sináptica observada en la AD (Ansari, et. al. 2010; Quiroz-Baez, et. al. 2013).

Asociada al estrés oxidante y a la disfunción mitocondrial, la alteración de la homeostasis intracelular del calcio también se ha reportado para la AD, incluyendo casos de FAD que acarrean mutaciones en PS1 (Bezprozvanny y Mattson, 2008). El flujo de calcio se controla mediante los canales iónicos que responden a neurotransmisores y los organelos que admiten el calcio como el retículo endoplásmico y la mitocondria. El calcio tiene diversas funciones a nivel sináptico: controla la excitabilidad de la membrana plasmática, la liberación de los neurotransmisores desde presinapsis, algunos cambios en la expresión génica asociados a actividad neuronal y la apoptosis. Los niveles exacerbados de calcio ocasionan la apertura del poro mitocondrial y la subsecuente activación de las cascadas apoptóticas y las fallas en el control del calcio intracelular comprometen la función sináptica dada la alta sensibilidad de estas estructuras hacia este catión (Bezprozvanny y Mattson, 2008).

A la vez, el desbalance de los procesos de plasticidad encargados de la remodelación morfológica y funcional de las sinapsis como respuesta adaptativa a la experiencia y al daño, podría desencadenar la disfunción sináptica (Arendt, 2000; 2001; Teter y Ashford, 2002). La distribución espacial de la AD abarca regiones que en el cerebro adulto conservan alta capacidad plástica, sugiriendo que la neuroplasticidad pudiera estar relacionada con la vulnerabilidad particular de estas regiones (Mesulam, 2000; Arendt, 2001). De hecho, durante la AD se

aprecian estructuras que asemejan a los conos de crecimiento axónico formados durante el desarrollo (Cotman, et. al. 1990) y otros indicios de plasticidad estructural aberrante, tanto en axones como en dendritas, que contribuyen a la formación de neuritas distróficas (Arendt, 2001). Además, algunas proteínas involucradas en la AD como APP, presenilinas, APOE y tau, participan en la modificación de las conexiones sinápticas y se regulan mediante vías de señalización en común con los procesos de desarrollo. Los eventos que demandan en demasía respuestas plásticas son capaces de inducir la expresión patológica de proteínas que participan en el desarrollo e, inclusive, de mediadores y moduladores del ciclo celular como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y las ciclinas, lo que conduce a una re-entrada al ciclo que en células diferenciadas culmina en muerte celular (Arendt, 2000; 2001; Teter y Ashford, 2002).

El metabolismo del colesterol también se ha relacionado con la AD y se ha encontrado que los niveles del principal metabolito cerebral, 24-S-hidroxicolesterol, están incrementados en CSF de pacientes. El colesterol es importante no sólo para la sinaptogénesis, los mecanismos de exocitosis involucrados en la liberación del neurotransmisor y la optimización de la función de los receptores mediante su agrupación (Koudinov y Koudinova, 2001), sino también para el procesamiento amiloidogénico de la APP (Ehehalt, et. al. 2003). Se ha propuesto que los niveles elevados de colesterol, además de aumentar la producción de A β , permiten que los procesos de plasticidad sináptica aberrante se lleven a cabo: de no haber colesterol tanto la remodelación del citoesqueleto como la sinaptogénesis se verían comprometidas (Teter y Ashford, 2002).

Acompañando a toda la histopatología de una enfermedad crónica, la inflamación se manifiesta desde etapas tempranas de la AD por la activación glial, principalmente de la microglía, el aumento de citosinas pro-inflamatorias y de otras moléculas señalizadoras y proteínas que participan en el proceso inflamatorio, lo que podría tener efectos sobre la función sináptica (Sastre, et. al. 2011; Ferreira, et. al. 2014).

Las alteraciones bioquímicas, moleculares y celulares anteriormente mencionadas evidencian la complejidad de la AD y la necesidad del establecimiento de las interconexiones entre los diversos factores partícipes para un mejor entendimiento de los mecanismos que subyacen a la patología.

Factores ambientales de riesgo

Consistente con la propuesta en la que la alta demanda de plasticidad pudiera dar lugar a la presentación de los eventos patológicos observados en la AD, la evidencia epidemiológica sugiere que el daño cerebral aumenta el riesgo de la presentación de la AD (Roberts, et. al. 1990; Mortimer, et. al. 1991; Rasmusson, et. al. 1995). En este sentido, tras ocasionar un daño excitotóxico que induce la pérdida del contacto sináptico entre dos regiones cerebrales interconectadas, la corteza entorrinal y el giro dentado del hipocampo, se activa la vía mitogénica p21ras/MAPK y aumentan los niveles de las ciclinas D1 y B, así como de los marcadores de AD, APP y tau hiperfosforilada (Hernández-Ortega, et. al. 2011).

También el padecimiento de desórdenes vasculares se considera un factor de riesgo para desarrollar AD (Kalaria, 2000; World Alzheimer Report, 2009). Eventos de isquemia, embolias y paros cardiacos, ocasionan un bajo suministro energético semejante a las condiciones de baja utilización de glucosa observadas en la AD, lo que desencadena la generación de ROS, alteraciones en la homeostasis del calcio y disfunción mitocondrial conduciendo a la muerte celular. Cada vez se reúne mayor evidencia epidemiológica que liga las alteraciones metabólicas con la AD: la hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes son las mejor sustentadas (Ott, et. al. 1999; Tan, et. al. 2003; Yaffe, et. al. 2004). La resistencia a la insulina parece jugar un papel importante desde que se le han atribuido funciones sinápticas importantes como la regulación del metabolismo energético y la activación de cascadas moleculares que desencadenan procesos de neuroplasticidad (Calvo-Ochoa y Arias, 2014).

El principal factor de riesgo para desarrollar la AD es el envejecimiento (World Alzheimer Report, 2009). Se ha propuesto que esto ocurre a partir del declive de

funciones celulares como el déficit en la regulación de los niveles del calcio, el deterioro de la función mitocondrial, el incremento en la generación de ROS, la disfunción del sistema inmune y la alteración en los mecanismos de neuroplasticidad, que, entre otros eventos, se asocian al envejecimiento (Brewer, 2000). El objetivo del campo de investigación es diferenciar las situaciones en las que los procesos cursan naturalmente, de las que subyacen a los eventos histopatológicos característicos de la AD.

1.4. Modelos transgénicos

Considerando las mutaciones reportadas de los casos de FAD, se han desarrollado modelos transgénicos a partir de la introducción de variantes humanas que reproducen las alteraciones en el metabolismo de la APP observadas durante la AD. La formación de depósitos de A β en los ratones transgénicos es resultado de la sobreproducción ocasionada por el aumento en el número de copias del gen de la APP o por mutaciones en esta proteína que facilitan el corte proteolítico realizado por la β -secretasa. También del incremento de la relación A β_{42} / A β_{40} dado por mutaciones en la PS1 o en la secuencia de la APP próxima al corte de la γ -secretasa. Incluso del aumento de la capacidad agregativa del péptido A β a causa de mutaciones dentro de su secuencia.

Los modelos que acarrean variantes humanas de la APP desarrollan depósitos amiloides y defectos en la memoria, pero no presentan NFTs ni pérdida neuronal. Además, cursan generalmente con impedimento cognitivo leve, mientras que los datos correspondientes al análisis electrofisiológico de la LTP y que reflejan una forma de plasticidad sináptica, son inconsistentes. Los modelos que acarrean variantes de PS1 no generan neuropatología, sin embargo, exacerban la formación de depósitos en los ratones transgénicos de APP. Hasta la fecha, aun cuando en humanos las mutaciones antes descritas son suficientes para reproducir la sintomatología característica de la AD: placas, marañas, pérdida sináptica y neuronal y deterioro cognitivo, las variantes humanas en ratón no la replican por completo (Ashe y Zahs, 2010).

El empleo de ratones que acarrean las variantes de tau características de la demencia frontotemporal, pretende complementar la información obtenida a partir de los estudios en los transgénicos construidos en base a las mutaciones de la FAD con los efectos de la taupatía. Por lo tanto, la introducción de transgenes humanos de tau que promueven la fosforilación de la proteína y la formación de NFTs, también constituye un modelo de AD (Ashe y Zahs, 2010).

3xTg-AD

Con la finalidad de estudiar la interacción de la patología amiloide y la taupatía y evaluar sus efectos en la función sináptica, Oddo y colaboradores (2003) generaron un ratón triple transgénico como modelo de la AD (3xTg-AD). El ratón acarreaba tres transgenes correspondientes a las variantes humanas: $PS1_{M146V}$, $APP_{Swe(KM670/671NL)}$ y τ_{P301L} , que se introdujeron a partir de la microinyección de dos transgenes independientes codificantes para las variantes humanas APP_{Swe} y τ_{P301L} , bajo el elemento regulador Thy1.2, en un embrión de una sola célula homocigoto para la variante $PS1_{M146V}$ (Figura 7) (Oddo, et. al. 2003). Ambos transgenes se integraron en un mismo *locus* garantizando la segregación conjunta en las próximas generaciones. El elemento regulador Thy1.2 dirige la expresión de los transgenes a linaje neuronal y en etapas postnatales (Caroni, 1997).

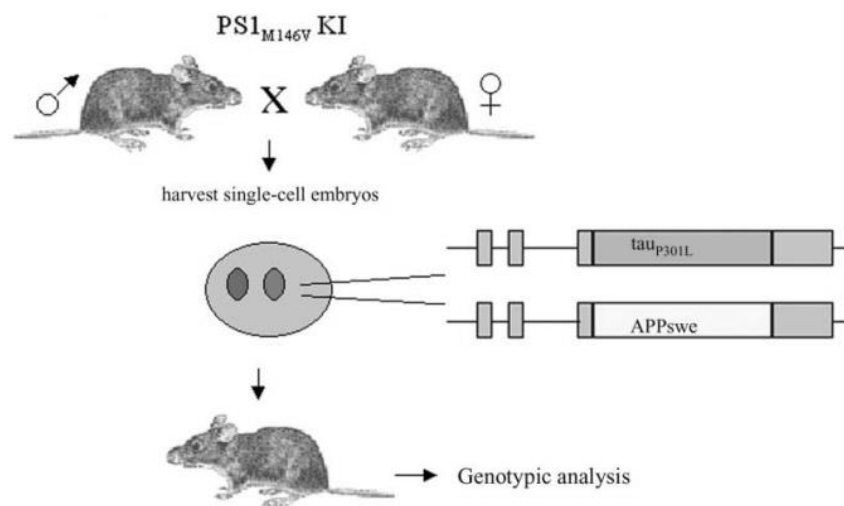


Figura 7. Generación del ratón 3xTg-AD. Introducción de dos transgenes independientes en un embrión de una sola célula homocigota para la variante $PS1_{M146V}$ (Oddo, et. al. 2003).

Los autores midieron la expresión de los transgenes encontrando que, si bien es exclusiva del sistema nervioso central (CNS), tiene un patrón región-específico predominante en estructuras involucradas en la AD, como hipocampo y corteza, e imperceptible en estructuras como cerebelo (Oddo, et. al. 2003). Los ratones 3xTg-AD desarrollan progresivamente agregados de A β intra y extracelulares y de la proteína tau, la cual también se encuentra fosforilada en residuos característicos de la AD. Además presentan disfunción sináptica, incluyendo déficits en la LTP, de manera dependiente de la edad, pero previa a la formación de agregados extracelulares de A β e intraneuronales de tau (Oddo, et. al. 2003).

1.5. Diagnóstico

En la actualidad, el diagnóstico definitivo de la AD se lleva a cabo durante el análisis *post mortem* del tejido cerebral, basándose en la presencia de las lesiones histológicas características de la enfermedad: placas extracelulares compuestas por agregados del péptido A β y marañas neurofibrilares de la proteína tau en un estado patológico de hiperfosforilación. Sin embargo, un diagnóstico probable puede realizarse considerando la sintomatología clínica que incluye la aplicación de herramientas como el examen Mini-mental, la escala de la evaluación cognitiva en la AD (ADAS-cog), la escala del estudio cooperativo de las actividades de la vida diaria en la AD (ADCS-ADL) y la escala del estudio cooperativo de la impresión global del cambio clínico (ADCS-CGIS), para acceder al estado cognitivo y al desempeño en las tareas de la vida cotidiana que tienen los pacientes (Rosen, et. al. 1984; Galasko, et. al. 1997; Schneider et. al. 1997).

El avance científico y tecnológico ha permitido detectar anomalías que acompañan a la AD y que pudieran representar un apoyo para la clínica con la finalidad de proponer un diagnóstico más certero. La atrofia cerebral de los pacientes con AD puede visualizarse a través de técnicas de imagenología (MRI) que son capaces de distinguirla de la presentada naturalmente en el envejecimiento (Fox, et. al. 1999), pero no de otras enfermedades neurodegenerativas (Perrin, et. al. 2009).

La disfunción sináptica se evidencia por medio de una variación de la técnica que permite el análisis funcional (fMRI) y muestra la hipoactivación de las áreas de interés en los pacientes con AD (Buckner, et. al. 2005), dato consistente con las observaciones a partir de FDG-PET del hipometabolismo de la glucosa en estas regiones (Pietrini, et. al. 2000).

El uso de ligandos revelados mediante PET como el Compuesto B de Pittsburgh (PIB), un análogo de la tioflavina T, permite detectar agregados del péptido A β . Estudios de PIB-PET realizados en pacientes con AD muestran un patrón de distribución de placas que coincide con el reportado, sin embargo, un porcentaje alto de individuos con función cognitiva adecuada también son positivos, lo cual compromete la especificidad de la técnica, o bien, podría implicar un alcance preclínico de la misma (Perrin, et. al. 2009).

El CSF se encuentra en contacto directo con el espacio extracelular del tejido cerebral por lo que cambios bioquímicos interesantes pueden reflejarse en este tipo de muestra. Conforme aumentan los depósitos de A β medidos a través de PIB-PET, los niveles de A β_{42} en CSF disminuyen, indicando que la cantidad de péptido libre es cada vez menor (Fagan, et. al. 2006). A medida que avanza el proceso neurodegenerativo y aumenta la cantidad de NFTs, se incrementan los niveles de tau total y de tau fosforilada (ptau) en CSF (Tapiola, et. al.1997). La evaluación de estos tres marcadores en CSF predice la progresión de pacientes con MCI hacia demencia de tipo AD (Hansson, et. al. 2006).

El análisis de biomarcadores de AD en muestras sanguíneas permitiría la integración de paneles adecuados para el diagnóstico de rutina en los laboratorios clínicos. De especial interés son aquellos que permitieran el diagnóstico en etapas tempranas o preclínicas de la patología. Sin embargo, hasta el momento los esfuerzos dirigidos al establecimiento de biomarcadores en muestras sanguíneas no han tenido resultados claros, consistentes, ni satisfactorios (Blennow, et. al. 2010).

1.6. Tratamiento

Hasta la fecha no existe ningún tratamiento que prevenga, cure o detenga el progreso de la AD. Los únicos fármacos aprobados actualmente por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) son los inhibidores de la acetilcolinesterasa (iACh): donepezilo, galantamina y rivastigmina, y el antagonista de baja afinidad para los receptores glutamatérgicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA): memantina. Los iACh incrementan los niveles del neurotransmisor acetilcolina, lo que pretende aminorar el déficit observado en los pacientes con AD provocado por la profunda pérdida neuronal en el *nucleus basalis* de Meynert, que provee a la corteza e hipocampo del neurotransmisor (Whitehouse, et. al. 1982). La memantina bloquea parcialmente a los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, lo que previene la estimulación aberrante de los mismos (Lipton, 2005). El efecto terapéutico de ambos fármacos es modesto y pasajero (Lanctot, et. al. 2003; Reisberg, et. al. 2003), sin embargo, la combinación de ambos parece tener efectos sinérgicos aminorando la progresión de la enfermedad (Lopez, et. al. 2009).

Desde la postulación de la cascada β -amiloide, se han implementado y diseñado numerosos fármacos que interfieren con el metabolismo de $A\beta$. Los inhibidores de las secretasas intentan disminuir la producción del péptido. La γ -secretasa participa en el procesamiento proteolítico de otras proteínas transmembranales tales como Notch, lo que la posiciona como un blanco farmacológico arriesgado que pudiera generar diversos efectos adversos. De hecho, un estudio clínico de un inhibidor de la γ -secretasa se frenó en fase III debido a efectos secundarios que incluían empeoras en la función cognitiva (Schor, 2011). El diseño de inhibidores de la β -secretasa ha resultado bastante complicado debido a que el sitio catalítico es muy grande y las moléculas que son efectivas no atraviesan la barrera hematoencefálica (Carter, et. al. 2010).

La inmunoterapia ante $A\beta$, tanto activa como pasiva, es una de las estrategias más utilizadas tanto para la prevención de la agregación del péptido, como para disolver los depósitos ya formados. En fases preclínicas, la inmunoterapia ha

demostrado tener efectos positivos ante la agregación de A β y en la función cognitiva, sin embargo, en fases clínicas se han tenido que suspender protocolos de inmunoterapia debido a los efectos secundarios que se presentan, incluyendo microhemorragias cerebrales y meningoencefalitis (Gilman, et. al, 2005; Salloway et al., 2009).

De igual manera, se han probado agentes que interfieren con la agregación de la proteína tau. Debido a que la forma hiperfosforilada de la proteína es más propensa a agregación, las cinasas que la fosforilan constituyen posibles blancos farmacológicos. El ácido valpórico y el litio son inhibidores de la glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3), una de las cinasas que fosforila a tau, pero no hay reportes de estos u otros inhibidores en fases clínicas avanzadas (Huang y Mucke, 2012). Por otro lado, el azul de metileno ha demostrado disminuir la agregación de la proteína tau, estudios en pacientes con AD tratados con dicho compuesto muestran además mejora cognitiva (Gura, 2008) ante lo que se esperan resultados positivos de la fase III.

Otro blanco farmacológico abordado en estudios clínicos es el estrés oxidante. El uso de antioxidantes tales como la vitamina E o la selegilina, no ha mostrado tener efecto alguno en el deterioro cognitivo de los pacientes con AD sometidos al estudio (Pratico, 2008).

Los estudios de fMRI y FDG-PET, así como las mediciones de los niveles de A β ₄₂ y tau en CSF, evidencian que las modificaciones histopatológicas características de la AD comienzan su desarrollo varios años antes de que la sintomatología clínica se presente. Los múltiples fracasos observados durante las fases clínicas, si bien pueden indicar la necesidad de replantear las hipótesis que conducen al desarrollo de los fármacos probados, también pueden ser resultado de la intervención tardía (Das, et. al. 2001; Oddo et. al. 2004) dado que los estudios en fases clínicas se llevan a cabo en pacientes sintomáticos. Por lo tanto, es preciso identificar biomarcadores más sensibles y específicos que puedan detectarse en estudios de rutina y que permitan el diseño de estudios clínicos preventivos.

Los reportes recientes de la existencia de moléculas pequeñas de RNA no codificante, llamadas microRNAs, que son estables y detectables mediante técnicas convencionales de biología molecular y que además presentan perfiles específicos asociados a condiciones fisiológicas y patológicas, introducen la posibilidad de su funcionamiento como biomarcadores moleculares de diversas patologías en distintos tipos de muestras biológicas incluyendo muestras accesibles y no invasivas como la sangre.

II. MicroRNAs

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de cadena sencilla de 19-22 nucleótidos de largo que actúan como reguladores post-transcripcionales reconociendo y uniéndose a través de complementariedad de bases generalmente a la región 3' no traducida (3'UTR) de los mRNA blanco (Bartel, 2009), bloqueando su traducción e induciendo su degradación (Fabian y Sonenberg, 2012).

Fueron descritos por primera vez en el año de 1993 cuando Lee y colaboradores investigaban el desarrollo larvario de *C. elegans*. La proteína LIN14 se expresa de manera importante al inicio de la etapa larvaria 1 y su decaída permite el cambio a la siguiente etapa de desarrollo. El descenso en los niveles de la proteína LIN14 depende de la presencia de dos RNAs que provienen de un transcrito de una secuencia intrónica que no requieren de su traducción para ser funcionales. Estos RNAs de 61 y 22 nucleótidos consisten, respectivamente, en la forma precursora y la madura del lin-4 que reconoce la región 3'UTR del mRNA-LIN14 impidiendo su traducción y promoviendo su degradación (Lee, et. al. 1993). No fue sino hasta 7 años después que se publicó otro reporte describiendo el papel del miRNA let-7 en la regulación de la transición de la etapa larvaria tardía de *C. elegans* a la célula adulta (Reinhart, et. al. 2000; Slack, et. al. 2000). Desde entonces, comenzaron a identificarse homólogos en *Drosophila*, humanos y otras especies de los entonces ya nombrados miRNAs (Pasquinelli, et. al. 2000).

La secuencia y función de los miRNAs están altamente conservadas en especies filogenéticamente cercanas (Bartel, 2004). Muestran un patrón de expresión espacio-temporal definido, es decir, su presencia y niveles varían conforme al tipo celular y momento de desarrollo (Miska, et. al. 2004; Sempere, et. al. 2004). Se estima que más del 50% de los transcritos codificantes para proteínas están sujetos a la regulación post-transcripcional a base de miRNAs (Krol, et. al. 2010), lo que resulta indispensable para el correcto funcionamiento de procesos celulares esenciales como la autorrenovación de las células embrionarias, el desarrollo, la diferenciación y la sobrevivencia.

II.1. Biogénesis

Los microRNAs son productos funcionales codificados en el genoma de plantas y animales, principalmente a partir de regiones intergénicas aunque también provienen de regiones intrónicas (Bartel, 2009). La transcripción depende de promotores para la RNA Pol II y genera un transcrito primario (pri-miRNA) mayor a una kilobase de largo capaz de formar estructuras secundarias de tipo tallo-asa. En el caso de las células animales, en núcleo, el microprocesador integrado por la endonucleasa de tipo III Drosha y la proteína Pasha se encarga de liberar las estructuras tallo-asa contenidas en el pri-miRNA. Los precursores de 60-80 nucleótidos (pre-miRNAs) se exportan a citoplasma a través del complejo GTP-dependiente exportina 5 (Ran-Exp5) (Ameres y Zamore, 2013).

En citoplasma, el complejo Dicer-TRBP integrado por otra endonucleasa de tipo III, Dicer, procesa a los pre-miRNAs generando un producto de doble cadena del tamaño original del miRNA. La doble cadena se transfiere al complejo de silenciamiento inducido mediante miRNA-RNA (miRISC), formado por la proteína Argonata y otras proteínas, en donde se degrada la llamada cadena pasajera y se establece la cadena sencilla del miRNA maduro (Figura 8) (Iwasaki, et. al. 2010).

II.2. Mecanismo de acción

El miRNA aporta variabilidad y selectividad al complejo miRISC debido a que se encarga del reconocimiento de los diferentes mRNAs blanco mediante interacciones imperfectas de tipo Watson-Crick con el sitio de unión complementario llamado elemento de reconocimiento para miRNAs (MRE) (Bartel, 2009). El apareamiento de bases sucede a través de la secuencia semilla del miRNA, que comprende los nucleótidos 2-8 del extremo 5', y el MRE ubicado en la región 3'UTR del mensajero, aunque se ha observado que el miRNA puede unirse a otras regiones del mensajero (Orom, et. al. 2008).

Una vez formado el dúplex, miRISC ejerce un efecto inhibitorio de la traducción a nivel de inicio o de elongación, lo que ocasiona el desacoplamiento del ribosoma (Fabian y Sonenberg, 2012). Los mRNAs se trasladan entonces hacia organelos no membranosos llamados cuerpos de procesamiento (P-bodies) dentro de los que se promueve la degradación de los mensajeros, mecanismo que ha mostrado ser el mayor efector en la regulación post-transcripcional a base de miRNAs (Guo, et. al. 2010).

De manera interesante, se ha demostrado que el apareamiento miRNA-mRNA constituye un proceso reversible que responde a ciertos estímulos y señales, lo que habilita la traducción del mRNA una vez liberado del complejo miRISC (Bhattacharyya, et. al. 2006). En este sentido, estructuras localizadas en los procesos dendríticos neuronales que asemejan en forma a los P-bodies (di-P-bodies), pudieran participar en la regulación de la traducción inducida bajo estimulación de un neurotransmisor (Cougot, et. al. 2008), por lo tanto, las funciones de los P-bodies abarcan degradación, almacenamiento y reincorporación de los mensajeros al proceso de traducción (Brenques, et. al. 2005; Bhattacharyya, et. al. 2006; Cougot, et. al. 2008).

II.3. Mecanismos de transferencia

Evidencia reciente sugiere que los miRNAs podrían representar una forma de intercambio intercelular de RNA vía exosomas. Los exosomas son vesículas membranales de origen endocítico que se liberan al espacio extracelular a partir de la fusión de los cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática y se introducen en la célula receptora a través de interacciones de tipo ligando-receptor, mecanismos de endocitosis o simple fusión con la membrana plasmática de la célula receptora (Figura 8). Valadi y colaboradores (2007) demostraron que los exosomas contienen moléculas de RNA, tanto mRNAs como miRNAs, que se empaquetan selectivamente por lo que el análisis del contenido de RNA en exosomas resulta diferente al de la célula donadora. Además probaron que la transferencia de material genético es tipo celular específico, es decir, no todas las células son capaces de recibir el contenido de los exosomas (Valadi, et. al. 2007). Finalmente, el RNA transferido es funcional en la célula receptora y mRNAs exclusivos de los exosomas de la célula donadora se traducen a proteína en la receptora (Valadi, et. al. 2007). Los miRNAs provenientes de exosomas son capaces de disminuir la traducción de sus mRNAs blanco, por lo que también son moléculas funcionales en la célula receptora (Montecalvo, et. al. 2011; Xu, et. al. 2013).

Se ha propuesto que los MVB se asocian a los componentes del miRISC y que participan en la regulación de su función en el silenciamiento (Gibbings, et. al. 2009; Lee, et. al. 2009), lo que sugiere que estas asociaciones pudieran promover también el empaquetamiento de ciertos miRNAs en los exosomas. Diversos linajes celulares son capaces de liberar exosomas de manera constitutiva. De particular interés son las células tumorales, en las que la liberación de exosomas parece dirigirse a que las células receptores den soporte al tumor (Skog, et. al. 2008) y las neuronas, en las que la actividad sináptica modula la liberación de exosomas sugiriendo que este proceso forma parte de la fisiología sináptica (Lachenal, et. al. 2011).

Se ha descrito que la transferencia de miRNAs entre células conectadas puede ocurrir a través de uniones comunicantes (Katakowski, et. al. 2010), o de otros mecanismos de exportación en los que los miRNAs se liberan acoplados a proteínas (Figura 8) o a lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Arroyo, et. al. 2011; Vickers, et. al. 2011).

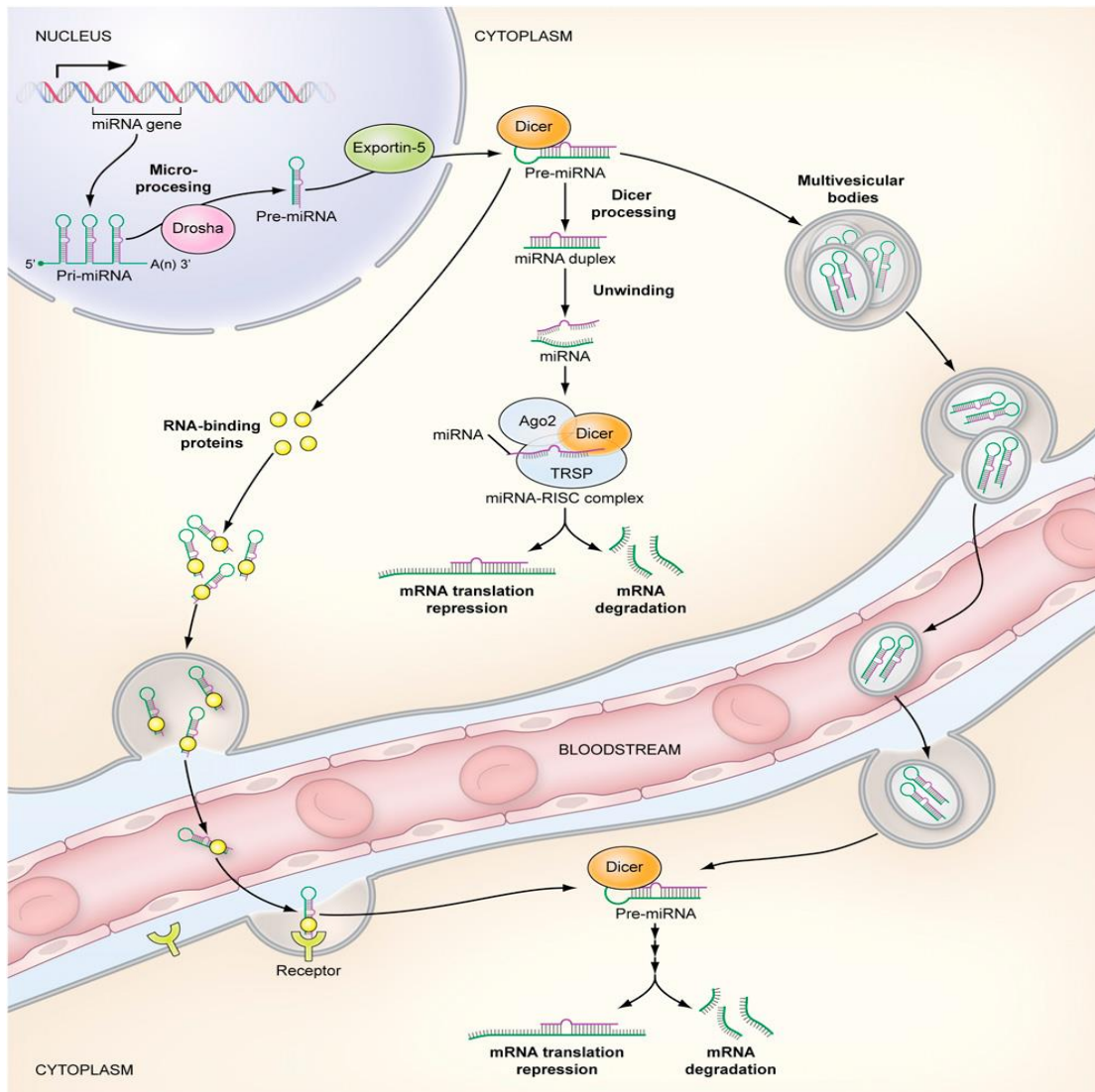


Figura 8. Biogénesis y función de los miRNAs. El pri-miRNA es transcrito del genoma y procesado en núcleo por la endonucleasa Drosha para generar al pre-miRNA, el cual se transporta a citoplasma a través del complejo ran-exp 5, donde la endonucleasa Dicer forma la doble cadena a partir de la cual se integra el miRNA maduro de cadena sencilla al complejo RISC. El miRISC interfiere con la traducción de los mRNAs y promueve su degradación. Tanto los precursores como las formas maduras de los miRNAs son secretados por la célula donadora acoplados a ribonucleoproteínas (parte izquierda) o contenidos en exosomas originados en los MVB (parte derecha). Los miRNAs circulantes son introducidos y funcionales en la célula receptora (Ross y Davis, 2011).

II.4. MicroRNAs circulantes como biomarcadores moleculares

El hallazgo de la existencia de mecanismos celulares de secreción de miRNAs concuerda con numerosos reportes de la presencia de estas moléculas en diferentes fluidos biológicos tales como el plasma/suero, orina, saliva, lágrimas, leche, líquido amniótico y CSF (Figura 8). Mitchell y colaboradores (2008) condujeron un estudio en el que demostraron que los miRNAs endógenos se encuentran circulando en la sangre de manera extracelular y son detectables en plasma a partir de metodologías tradicionales como qRT-PCR. En efecto, los miRNAs son altamente estables en plasma/suero aun bajo condiciones adversas capaces de degradar a los RNAs largos (Chen, et. al. 2008).

El origen de los miRNAs circulantes no se ha esclarecido por completo, sin embargo, Chen y colaboradores (2008) estudiaron el perfil de miRNAs de las células sanguíneas nucleadas en comparación con el obtenido en suero, tanto en estado de salud como de enfermedad, para lo que utilizaron muestras de sangre de donadores sanos y de pacientes de cáncer de pulmón y colon, y de diabetes. En sujetos sanos, la mayoría de los miRNAs detectados coincidieron en ambas muestras, sin embargo, en sujetos enfermos menos de la mitad de los miRNAs presentes en el suero se encontraron en las células sanguíneas nucleadas sugiriendo que los miRNAs circulantes derivan de otros tejidos y órganos, en especial, en estado de enfermedad.

Vasta evidencia experimental muestra que las alteraciones en el perfil de expresión de miRNAs en los tejidos afectados se asocian a diversas patologías. En este sentido, los estudios de Lawrie, Mitchell, Chen y colaboradores (2008) probaron que es posible distinguir una huella de miRNAs circulantes para una enfermedad en particular. La posibilidad de que los miRNAs puedan funcionar como biomarcadores en plasma/suero resulta atractiva para la mejora del diagnóstico de enfermedades debido a que involucra una toma no invasiva de muestra, técnicas accesibles para los laboratorios, resultados pronto y la posibilidad de establecer pruebas de rutina que detecten anomalías en etapas tempranas e, inclusive, el monitoreo de los tratamientos aplicados. Las

publicaciones que asocian a los miRNAs circulantes con enfermedades crónicas como diversos tipos de cáncer (Schwarzenbach, et. al 2014), diabetes y obesidad (Pescador, et. al. 2013), desórdenes neurodegenerativos (Grasso, et. al. 2014) e infecciones víricas (Pacifi, et. al. 2013; Tambyah, et. al. 2013); eventos agudos como embolias (Sepramaniam, et. al. 2014) y ataques cardiacos (Kinet, et. al. 2013); y condiciones fisiológicas como el envejecimiento (Dhahbi, 2014), se han incrementado en los últimos años y han confirmado el potencial de los miRNAs como biomarcadores de diversas patologías.

II.5. MicroRNAs asociados a la Enfermedad de Alzheimer

La primera evidencia de alteraciones en la expresión de miRNAs asociadas a la AD surgió tras las comparaciones realizadas por Lukiw (2007) entre muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes con AD y controles, que revelaron niveles incrementados del miR-9, miR-125b y miR-128 en los casos de la enfermedad. Desde entonces se han reportado análisis de los perfiles de miRNAs de corteza cerebral, hipocampo, CSF, líquido extracelular de tejido cerebral (ECF) y torrente sanguíneo que han corroborado la existencia de diferencias en los niveles de miRNAs en los casos de AD (Schipper, et. al. 2007; Cogswell, et. al. 2008; Hébert, et. al. 2008; Wang, et. al. 2008; Nunez-Iglesias et. al. 2010; Wang, et. al. 2011; Alexandrov, et. al. 2012; Kumar, et. al. 2013; Leidinger, et. al. 2013; Burgos, et. al. 2014).

La especificación de perfiles de miRNAs en AD ha permitido el desarrollo de estudios dirigidos a la indagación en los niveles de miRNAs particulares a partir de muestras de pacientes o modelos de AD, su participación en las cascadas moleculares involucradas en la enfermedad, la predicción y validación de sus posibles mensajeros blanco.

El análisis de la literatura señala algunos miRNAs interesantes para la patología entre los que destacan los siguientes: miR-9, miR-15, miR-29, miR-34, miR-101, miR-106, miR-107, miR-125, miR-146 y miR-181. El miR-9 se expresa

especialmente en neuronas y está involucrado en procesos de desarrollo, diferenciación y sobrevivencia celular, alteraciones en sus niveles tanto a la alta como a la baja se han asociado constantemente a la AD (Lukiw, 2007; Cogswell, et. al. 2008; Hébert, et. al. 2008; Geekiyanage, et. al. 2011; Wang, et. al. 2011; Alexandrov, et. al. 2012; Tan, et. al. 2013; Burgos, et. al. 2014). La familia del miR-181 está enriquecida en el compartimento sináptico neuronal y participa en procesos de plasticidad sináptica; la disminución de los niveles del miR-181c es repetidamente reportada en muestras de pacientes con AD (Cogswell, et. al. 2008; Hébert, et. al. 2008; Geekiyanage, et. al. 2011; Tan, et. al. 2013; Burgos, et. al. 2014). La expresión de los miembros de la familia del miR-15 como miR-15a, miR-15b y miR-16, se encuentra reducida en muestras de casos de AD (Cogswell, et. al. 2008; Hébert, et. al. 2008; Wang, et. al. 2011), lo que pudiera relacionarse con la hiperfosforilación de tau y el incremento en los niveles de APP desde que el mensajero de una de las cinasas que fosforilan a tau en residuos característicos de la AD y el de la APP misma, contienen sitios de reconocimiento para estos miRNAs (Hébert, et. al. 2010; Liu, et. al. 2012). En efecto, algunos estudios han asociado la expresión de los miRNAs con la de las proteínas relevantes para la AD, el miR-101 y miembros de la familia del miR-106, miR-106a, miR-106b y miR-20a, que en los casos de AD se presentan con menor abundancia (Hébert, et. al. 2008; Wang, et. al. 2011; Burgos, et. al. 2014), son capaces de modular los niveles de la APP (Hébert, et. al. 2009; Vilardo, et. al. 2010). Tanto la familia del miR-29 integrada por miR-29a, miR-29b y miR-29c, como el miR-103 y el miR-107, comparten uno de sus mRNAs blanco: el de la β -secretasa (Hébert, et. al. 2008; Wang, et. al. 2008) y en concordancia con los niveles aumentados de β -secretasa en pacientes con AD, estos miRNAs se manifiestan consistentemente disminuidos (Hébert, et. al. 2008; Wang, et. al. 2008; Shioya, et. al. 2010; Geekiyanage, et. al. 2011; Wang, et. al. 2011; Leidinger, et. al. 2013; Müller, et. al. 2014). El incremento del miR-34a se ha relacionado previamente con el envejecimiento (Li, et. al. 2011; Liu, et. al. 2012), el principal factor de riesgo para desarrollar AD, lo que pudiera explicar las alteraciones en los niveles del miR-34a, el miR-34b y el miR-34c observados en la patología (Schipper, et. al. 2007;

Cogswell, et. al. 2008; Alexandrov, et. al. 2012; Bhatnagar, et. al. 2014; Burgos, et. al. 2014; Kiko, et. al. 2014; Müller, et. al. 2014). La inflamación constituye otro evento relevante en la AD, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) promueve la transcripción de los miR-125b, miR-146a que junto con el miR-146b se reconocen por su participación en la respuesta inmune y se reportan desregulados en la AD (Lukiw, 2007, Cogswell, et. al. 2008; Lukiw, et. al. 2008; Cui, et. al. 2010; Alexandrov, et. al. 2012; Burgos, et. al. 2014, Kiko, et. al. 2014, Müller, et. al. 2014). Cabe mencionar que uno de los mRNAs blanco del miR-125b y miR-146a es el factor H del complemento (CFH), encargado de la represión de la respuesta inflamatoria innata y que se encuentra disminuido en cerebros de pacientes con AD (Lukiw, et. al. 2008; Lukiw y Alexandrov, 2012).

Los estudios que evalúan a los miRNAs en AD sustentan que existen alteraciones en estas moléculas relacionadas con la patología. Sin embargo, la participación de los miRNAs no está esclarecida por completo ni los mecanismos moleculares están bien definidos. Además, los resultados no siempre son congruentes, en algunos trabajos encuentran niveles disminuidos de ciertos miRNAs, mientras que en otros, aumentados. El mayor número de reportes podría contribuir a establecer un conjunto de miRNAs específicos y consistentes. Los reportes sobre modelos animales son escasos, en la mayoría de los casos se utilizan muestras de pacientes con AD probable. Una ventaja de trabajar con modelos animales, específicamente modelos transgénicos, es que estos permiten investigar las etapas preclínicas de la histopatología y, a pesar de las limitaciones que puedan presentar, resultan favorables para realizar las primeras aproximaciones que contribuyan a definir la relevancia de los miRNAs en la AD en cuanto a los mecanismos moleculares y en cuanto a su funcionamiento como biomarcadores.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

La AD constituye un problema relevante de salud a nivel mundial para el que no existe un tratamiento curativo ni que detenga su progreso. Se ha propuesto que el fracaso de las nuevas estrategias terapéuticas se debe en parte a la intervención tardía. El diagnóstico definitivo se realiza *post mortem* y, aun con el desarrollo de técnicas que apoyando a la clínica permiten dar un diagnóstico probable, éste es posible hasta que la histopatología se encuentra avanzada.

La existencia de miRNAs circulantes que han demostrado ser estables, detectables y presentar perfiles específicos asociados a diversas patologías, viabilizan su funcionamiento como biomarcadores moleculares en una muestra no invasiva abriendo la posibilidad de establecer pruebas de diagnóstico de rutina en los laboratorios clínicos.

El análisis de los miRNAs como posibles biomarcadores de la AD se sustenta en evidencias en las que los niveles de algunos miRNAs de tejido cerebral, líquido intersticial, CSF y torrente sanguíneo difieren entre pacientes con AD y controles. Aun cuando algunas de estas moléculas podrían a la vez relacionarse con otras patologías, el establecimiento de un perfil de miRNAs circulantes, a diferencia de los cambios individuales, resultaría más específico.

Los estudios de miRNAs en modelos animales de AD son escasos, así como la información acerca de estas moléculas en etapas preclínicas de la enfermedad.

Considerando lo anterior, el presente trabajo propone una estrategia experimental para determinar el perfil de miRNAs circulantes en un modelo murino de AD que pudiera asociarse a la patología en dos diferentes etapas de evolución de la patología: una en la que no haya cambios conductuales e histológicos de tipo AD aparentes y otra en la que se manifiesten.

HIPÓTESIS

El perfil de miRNAs circulantes del modelo murino de AD estará relacionado con la histopatología característica del mismo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar posibles diferencias entre el perfil de miRNAs circulantes de ratones 3xTg-AD y controles, en dos distintas etapas de evolución, que pudieran asociarse a la patología de tipo AD que presentan los ratones transgénicos.

Objetivos particulares

Realizar el análisis genético de los ratones 3xTg-AD para la identificación de los transgenes correspondientes a las variantes humanas PS1_{M146V}, APP_{Swe} y tau_{P301L}.

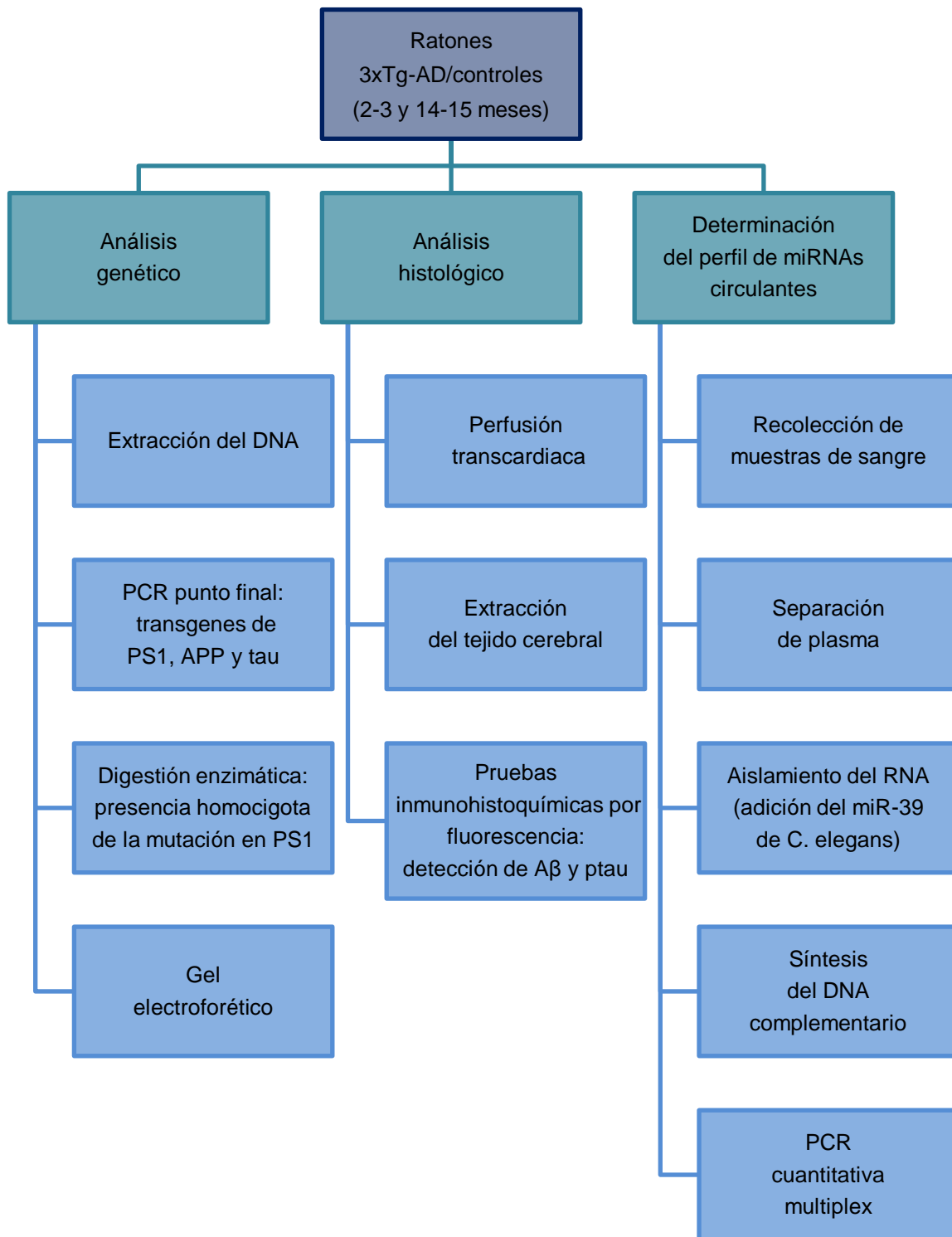
Realizar el análisis histológico de los ratones 3xTg-AD en las etapas de estudio para la detección de agregados del péptido A β y de la proteína ptau.

Seleccionar miRNAs previamente vinculados con la AD para su evaluación en plasma de ratones 3xTg-AD y controles.

Determinar el contenido en plasma de los miRNAs seleccionados en los ratones 3xTg-AD y controles en dos diferentes etapas de evolución de la patología: una en la que no haya cambios conductuales e histológicos de tipo AD aparentes y otra en la que se manifiesten.

Identificar posibles diferencias en el perfil plasmático de miRNAs de ratones 3xTg-AD y controles que pudieran asociarse a la patología de tipo AD.

ESQUEMA METODOLÓGICO



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los ratones 3xTg-AD (Oddo, et. al. 2003) fueron donaciones de la Dra. Gohar Gevorgyan del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Dr. Federico Bermúdez del Instituto de Fisiología Celular y, los ratones WT cepa 129/C57BL6, del Dr. Federico Bermúdez. El análisis genético incluyó las muestras de todos los ratones incluidos en el estudio. Para el análisis histológico se recolectaron los tejidos cerebrales de 2 ratones 3xTg-AD de 2-3 meses y de 14-15 meses. Para la determinación de los perfiles plasmáticos de miRNAs se integraron 4 grupos experimentales de 6-7 ratones: el primero de ratones WT de 2-3 meses, el segundo de ratones 3xTg-AD de 2-3 meses, el tercero de ratones WT de 14-15 meses y el cuarto de ratones 3xTg-AD de 14-15 meses.

I. Análisis genético

Se realizó la genotipificación de todos los ratones incluidos en el estudio para la confirmación del genotipo WT o 3xTg-AD en estado homocigoto.

Obtención de la muestra: se recolectaron cortes de 2-3 mm de la parte final de la cola de cada ratón. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Extracción de DNA por el método de Hot-Shot: las muestras se homogenizaron con buffer de lisis (NaOH 25 mM y EDTA 0.2 mM, pH 12) mediante acción mecánica y se incubaron durante una hora en baño María a 95°C. En seguida se les añadió buffer de neutralización (Tris-HCl 40 mM, pH 5) y se centrifugaron a 12500 rpm y 4°C durante 2 min. Las muestras se almacenaron a -20°C.

PCR punto final: se llevaron a cabo dos reacciones de PCR de punto final. La primera para la determinación del genotipo de los ratones a partir de oligonucleótidos específicos que amplifican los transgenes de las proteínas APP_{Swe} y tau_{P301L} humanas. La segunda para la determinación del estado

homocigoto de los ratones transgénicos en base a una amplificación de la secuencia del transgén que codifica para el exón 5 de la proteína PS1_{M146V}, y una digestión enzimática del producto de PCR en la que la endonucleasa BSTE-II, que reconoce como sitio de corte a la mutación acarreada por el transgén de la PS1_{M146V}, genera dos productos de digestión.

Gel electroforético: los productos de PCR y de la digestión se corrieron en geles independientes de agarosa al 2% durante 1 h a 90 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y mediante luz UV se identificaron, por un lado, las bandas correspondientes a *app* y *tau* humanas de 500 pb y 320 pb, respectivamente (en el caso de los ratones 3xTg-AD), y por el otro, la banda propia del transgén del exón 5 de la PS1_{M146V} previa a la digestión, que permitía corroborar la presencia del producto de PCR de 530 pb, y las bandas resultantes de la digestión enzimática de 350 pb y 180 pb (en el caso de los ratones 3xTg-AD que acarrean el transgén humano del exón 5 de la PS1_{M146V} en estado homocigoto). De haberse encontrado las 3 bandas en una misma muestra, se hubiera tratado de ratones 3xTg-AD heterocigotos.

II. Análisis histológico

Se realizaron pruebas de inmunohistoquímica por fluorescencia en ratones 3xTg-AD de 2-3 meses y 14-15 meses para la detección del péptido A β humano y de un epítipo fosforilado de la proteína tau humana relevante para la AD.

Extracción del tejido cerebral: los ratones fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico intraperitoneal previamente a la perfusión transcárdica con disolución salina al 0.9% (NaCl) y disolución de paraformaldehído al 4% (PFA), para la extraer los tejidos cerebrales y almacenarlos en PFA al 4% durante 24 h.

Obtención de los cortes cerebrales: los tejidos cerebrales se trataron con gradientes de sacarosa al 15 y 30% durante 24 h por concentración. En el criostato se congelaron a -20°C y se realizaron cortes coronales de 30 μ m de

grosor. Los cortes se almacenaron en disolución de crioprotección (50% de PB 0.1 M pH 7.4, 25% de glicerol y 25% de etilenglicol) a 4°C hasta su uso.

Inmunofluorescencias de flotación: se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios: MAB1560, clona 6E10, Chemicon, que reconoce los aminoácidos 1-17 del péptido A β humano; y anti-p-PHF-tau, clona AT8, Pierce, Thermo Scientific MN1020, que reconoce a la proteína tau fosforilada en la serina 202 y la treonina 205, los que fueron revelados con los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo: Alexa-488 anti-mouse (verde) y Alexa-555 anti-mouse (rojo). Los cortes se lavaron por triplicado con PBS. En el caso de la IF para el péptido A β , se incubaron con ácido fórmico al 70% en PBS 0.15 M durante 20 min. Los cortes se lavaron tres veces con PBS-tritón al 0.4%. Se incubaron con disolución de bloqueo (NGS al 3% en PBS-tritón al 0.4%) durante 2 h a temperatura ambiente (TA) y toda la noche bajo agitación a 4°C en una dilución 1:500 del anticuerpo primario en disolución de bloqueo. Al día siguiente se lavaron los cortes por triplicado con PBS-tritón al 0.4% y se incubaron a TA en agitación durante dos horas en una dilución 1:250 del anticuerpo secundario. De nuevo se realizaron lavados por triplicado con PBS-tritón al 0.4%. Después los cortes se incubaron con DAPI 30 nM durante 30 s y finalmente se lavaron por triplicado con PBS 0.15 M, se montaron en portaobjetos preparados con poli-L-lisina y se analizaron en el microscopio de epifluorescencia.

III. Determinación de los perfiles de microRNAs en plasma

A partir de muestras de sangre de los ratones, se evaluó el contenido de miRNAs en plasma de ratones 3xTg-AD y WT de 2-3 meses y de 14-15 meses, en colaboración con el Dr. Luis Vaca del Instituto de Fisiología Celular utilizando el sistema miScript miRNA PCR Arrays de Qiagen.

Separación del plasma: se recolectaron las muestras de sangre (~500 μ L) a partir de la vena facial de los ratones en tubos para centrífuga de 1.5 mL nuevos y estériles, empleando EDTA como anticoagulante. Las muestras se almacenaron

en hielo por no más de 30 min y se sometieron a dos centrifugaciones. La primera realizada a 3000 rpm y 4°C durante 10 min para separar el plasma (~200 µL) del paquete celular. La segunda a 13000 rpm y 4°C por 10 min con la finalidad de remover el debris celular. En seguida se efectuó el aislamiento del RNA total.

Aislamiento de RNA total: se mezclaron partes iguales del plasma de 2-3 ratones del mismo grupo para formar un *pool* de ~300 µL de plasma y realizar el análisis de miRNAs en un total de 3 *pools* por grupo. Para el aislamiento de RNA se siguió el protocolo indicado empleando el kit miRNeasy para suero y plasma de Qiagen. Se partió de 200 µL de *pool* de plasma. Se agregó Qiazol a cada muestra para realizar la homogenización y lisis, posteriormente se añadió un miRNA sintético que mimetiza al miR-39 de *C. elegans* con el fin de normalizar los datos. Se llevó a cabo una extracción fenol-cloroformo, de la que se recuperó la fase acuosa y se mezcló con etanol al 100% para pasarla a través de una columna RNeasy MinElute que retiene las moléculas de RNA. Se realizaron los lavados indicados en los protocolos de Qiagen con los buffers que contiene el kit y con etanol al 80%. Posteriormente se eluyó el RNA total en 14 µL de agua libre de RNasas y se continuó con el protocolo de síntesis de DNA complementario.

Síntesis del DNA complementario: se utilizaron el kit miScript II RT Kit de Qiagen y el protocolo propuesto por el fabricante. El kit contiene las disoluciones y reactivos necesarios para realizar en una sola reacción la poliadenilación del RNA total y la retrotranscripción (RT) universal: los dNTPs, el cofactor Mg²⁺, la enzima poliA transferasa, el oligo-dT universal, la enzima transcriptasa reversa, el RNA sintético empleado como control positivo de la RT (miRTC) y el buffer adecuado. Se preparó la mezcla de reacción añadiendo las cantidades de reactivos, disoluciones y templado sugeridas por el fabricante y se incubó durante una hora a 37°C y, al finalizar, por 5 min a 95°C para inactivar a la enzima. Se realizó una dilución de la mezcla de reacción agregando 200 µL de agua libre de RNasas y se almacenaron alícuotas de 110 µL a -20°C, una a manera de reserva y la otra para su análisis.

Cuantificación de microRNAs: se siguieron los protocolos correspondientes utilizando los kits miScript SYBR Green PCR Kit y miScript miRNA PCR Array

“Desarrollo y Enfermedad Neurológicos” de Qiagen. El primero se utilizó para formular la mezcla de reacción de PCR cuantitativa (qPCR) a partir de los reactivos y disoluciones contenidos que proveen de los dNTPs, el cofactor (Mg^{2+}), el oligo universal, el templado de DNA sintético empleado como control positivo de la qPCR (PPC), la DNA polimerasa, el SYBR Green para la detección del producto, el ROX para la estandarización de la señal, y del cDNA sintetizado en el paso anterior. Se añadieron 20 μ L a cada uno de los pozos del arreglo proporcionado en el segundo kit. El arreglo contiene 84 pruebas diferentes conformadas por el oligonucleótido que reconoce a un miRNA en específico, permitiendo la determinación del contenido de 84 miRNAs en cada muestra mediante una sola reacción. Además contiene las pruebas que detectan al miR-39 de *C. elegans*, al miRTC y al PPC. Las reacciones de qPCR se corrieron en el equipo Rotor Gene 6000 bajo las condiciones sugeridas por el fabricante que incluyen un paso previo de incubación a 95°C para la activación de la enzima polimerasa, 40 ciclos de desnaturalización-alineamiento-elongación y un protocolo para obtener las curvas de disociación.

Análisis de datos: se observaron las gráficas de amplificación de cada reacción de qPCR y, considerando las recomendaciones del fabricante, se fijó la línea base en 10 y la línea umbral en 0.02 en todas. Se revisaron los datos de Ct de los controles PPC y miRTC para verificar el desempeño de las reacciones. Asociada a cada qPCR, se formuló una curva patrón de detección del miR-39 con la que se accedió al rendimiento del sistema. Se analizaron las curvas de disociación de los 84 productos de reacción y las de los controles para descartar la formación de productos inespecíficos de PCR. Los datos se normalizaron a partir del miR-39 de *C. elegans* añadido durante el protocolo de aislamiento de RNA, neutralizando variaciones que pudieran existir en el desarrollo del protocolo entre una y otra determinación. Los datos se examinaron con apoyo del software de análisis provisto por el fabricante que emplea el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para identificar los posibles cambios entre grupos y una prueba “t” de dos colas para determinar la significancia estadística.

RESULTADOS

I. Análisis genético

Se analizaron muestras de DNA de los ratones incluidos en el estudio con la finalidad de confirmar los genotipos WT y 3xTg-AD en estado homocigoto. La determinación del genotipo se realizó a partir de una reacción de PCR que amplifica secuencias específicas de los transgenes codificantes para las variantes humanas APP_{Swe} y tau_{P301L}. Los productos se corrieron en un gel electroforético de agarosa. En el caso de los ratones 3xTg-AD se identificaron dos bandas de 500 pb y 320 pb correspondientes a los transgenes de APP_{Swe} y tau_{P301L} humanas, respectivamente, mientras que en el caso de los WT no se observó banda alguna confirmando el genotipo supuesto (Figura 9A). Para los ratones 3xTg-AD confirmados en la reacción anterior, se preparó otra que amplifica una secuencia codificante de la proteína PS1, seguida de la digestión del producto de PCR en la que la endonucleasa reconoce como sitio de corte a la mutación M146V. Los productos de PCR y digestión se corrieron en un gel electroforético de agarosa y se corroboró la presencia de una banda de 530 pb correspondiente al producto de PCR previo a la digestión y de únicamente dos bandas de 350 pb y 180 pb tras ésta, implicando el estado homocigoto de los ratones 3xTg-AD (Figura 9B).

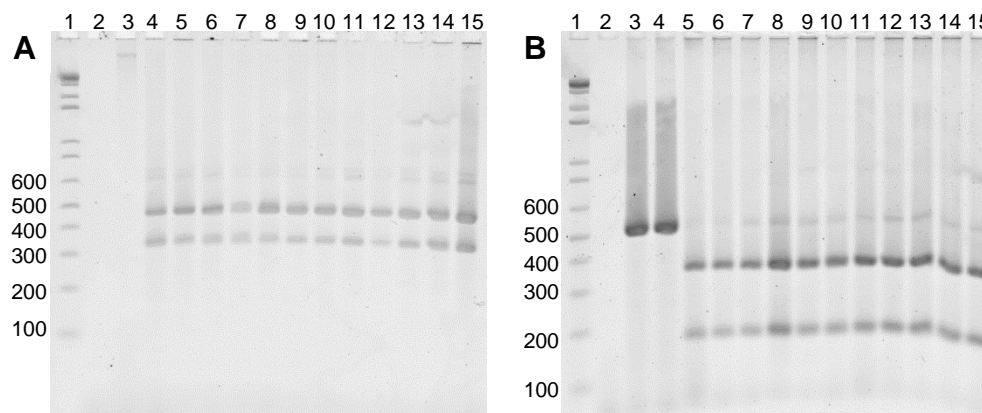
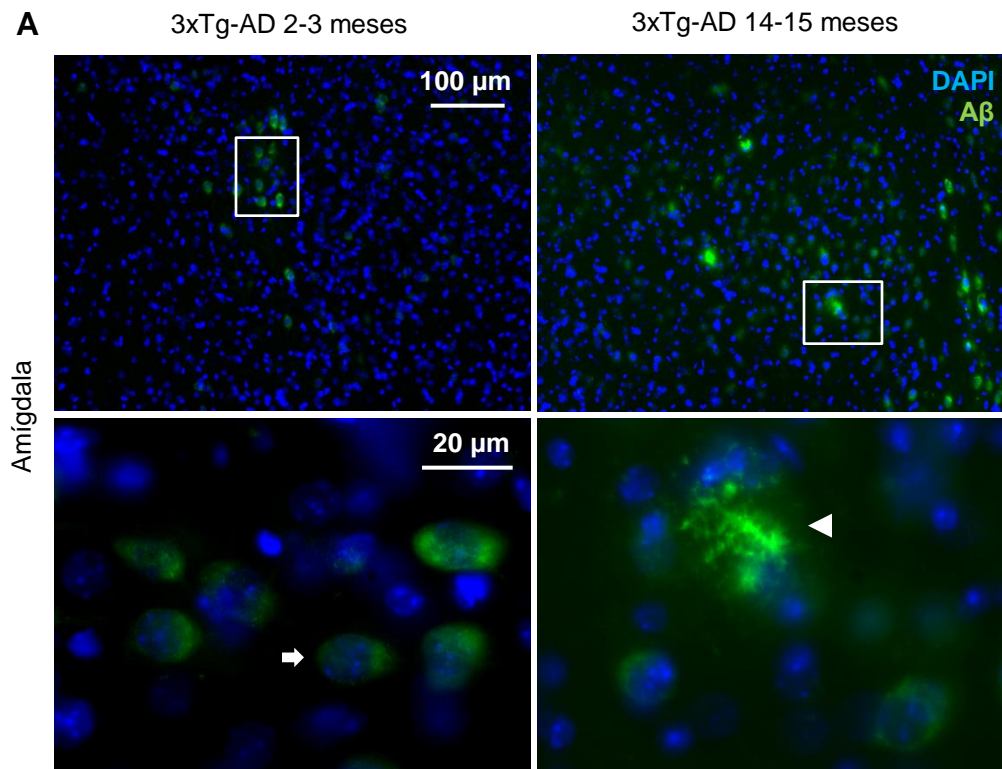


Figura 9. Geles electroforéticos de los productos de PCR y digestión. En ambos: carril 1, marcador de peso molecular y 2, control negativo (sin DNA). A: carril 3, ratón WT que no contiene los transgenes; carriles 4-15, ratones 3xTg-AD que contienen ambos transgenes identificados por las bandas de 500 pb (APP_{Swe}) y 320 pb (tau_{P301L}). B: carril 3-4, producto de PCR de 530 pb previo a la digestión; carriles 5-15, ratones 3xTg-AD homocigotos identificados por la presencia de únicamente dos bandas correspondientes a los productos de digestión de 350 y 180 pb.

II. Análisis histológico

Se evaluaron las manifestaciones histopatológicas de los ratones 3xTg-AD en las dos diferentes edades seleccionadas para el estudio mediante el análisis inmunohistoquímico por fluorescencia (IF) dirigido a la detección del péptido A β humano y la proteína tau humana fosforilada en residuos relevantes para la AD.

La APP humana se expresa en los ratones 3xTg-AD de ambas edades analizadas (Figura 10). Dado que esta proteína y el péptido A β comparten la secuencia reconocida por el anticuerpo primario, es imposible distinguir si la señal detectada es ocasionada por el A β o la APP. Sin embargo, la diferencia entre los 2-3 meses y los 14-15 meses es notoria. Si bien a los 2-3 meses hay marcaje inmunopositivo (visible en color verde), la señal de APP y A β se limita a los cuerpos celulares (flechas), mientras que a los 14-15 meses de edad el número de células inmunopositivas es mayor y la señal más significativa se observa en el espacio extracelular indicando la presencia de agregados o placas en regiones como la amígdala (A) y el hipocampo (B) (cabezas de flecha).



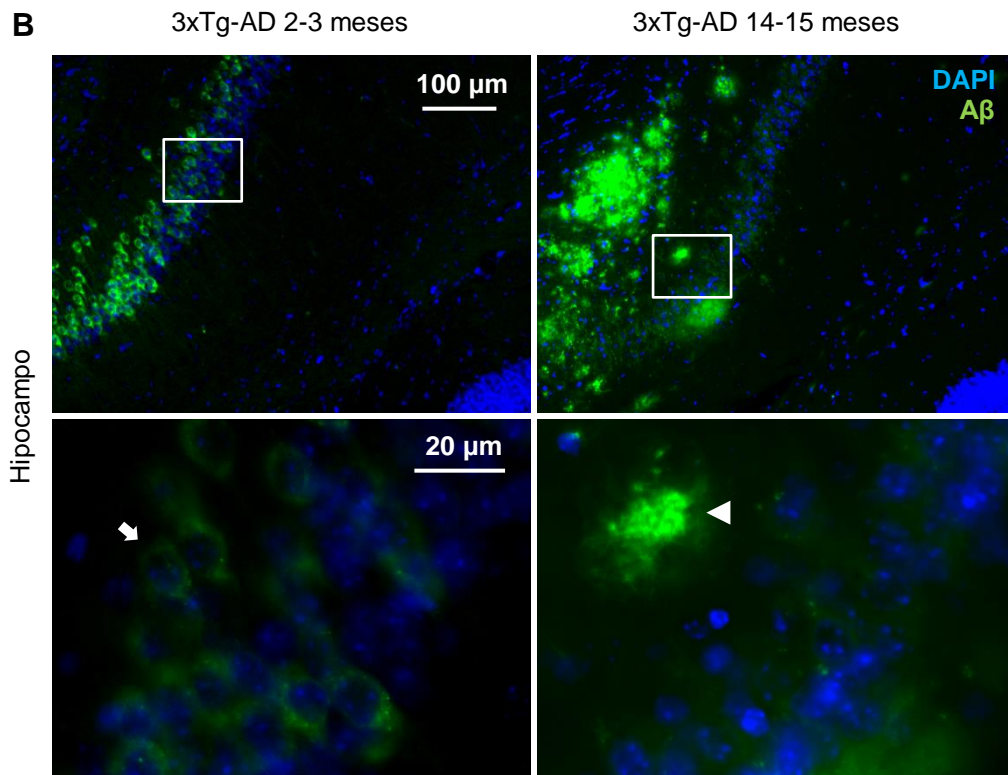


Figura 10. IF del péptido A β en ratones 3xTg-AD de 2-3 meses y 14-15 meses. Se exponen cortes coronales representativos de amígdala (A) e hipocampo (B) de IF del péptido A β humano realizadas con el mab-1560 clona 6E10. En todos los casos se demuestra la expresión de la proteína APP humana y/o la presencia del péptido A β . A los 2-3 meses la señal se limita a los cuerpos celulares (flechas) y a los 14-15 meses aumenta el número de células inmunopositivas y se aprecian agregados extracelulares (cabezas de flechas). Los paneles inferiores de cada estructura cerebral corresponden a la magnificación del recuadro dibujado.

La proteína tau humana fosforilada en residuos relevantes para la AD, como lo son la serina 202 y la treonina 205, se detecta en los ratones 3xTg-AD tanto a los 2-3 meses como a los 14-15 meses de edad implicando la expresión del transgén humano en ambas edades (Figura 11). No obstante, a los 2-3 meses la intensidad de señal es baja, difusa y perceptible únicamente en el soma neuronal bajo exposición y aumento mayores en el microscopio de fluorescencia (flechas), no se distinguen procesos neuríticos que presenten ptau. En cambio, a los 14-15 meses la intensidad de señal es mayor, al igual que el número de neuronas inmunopositivas. En regiones como la amígdala (A) e hipocampo (B), ptau se encuentra en soma y preferentemente en procesos neuríticos (cabezas de flecha) desde que es posible identificarlos como ptau-positivos sin necesidad de que el soma neuronal lo sea y no así viceversa.

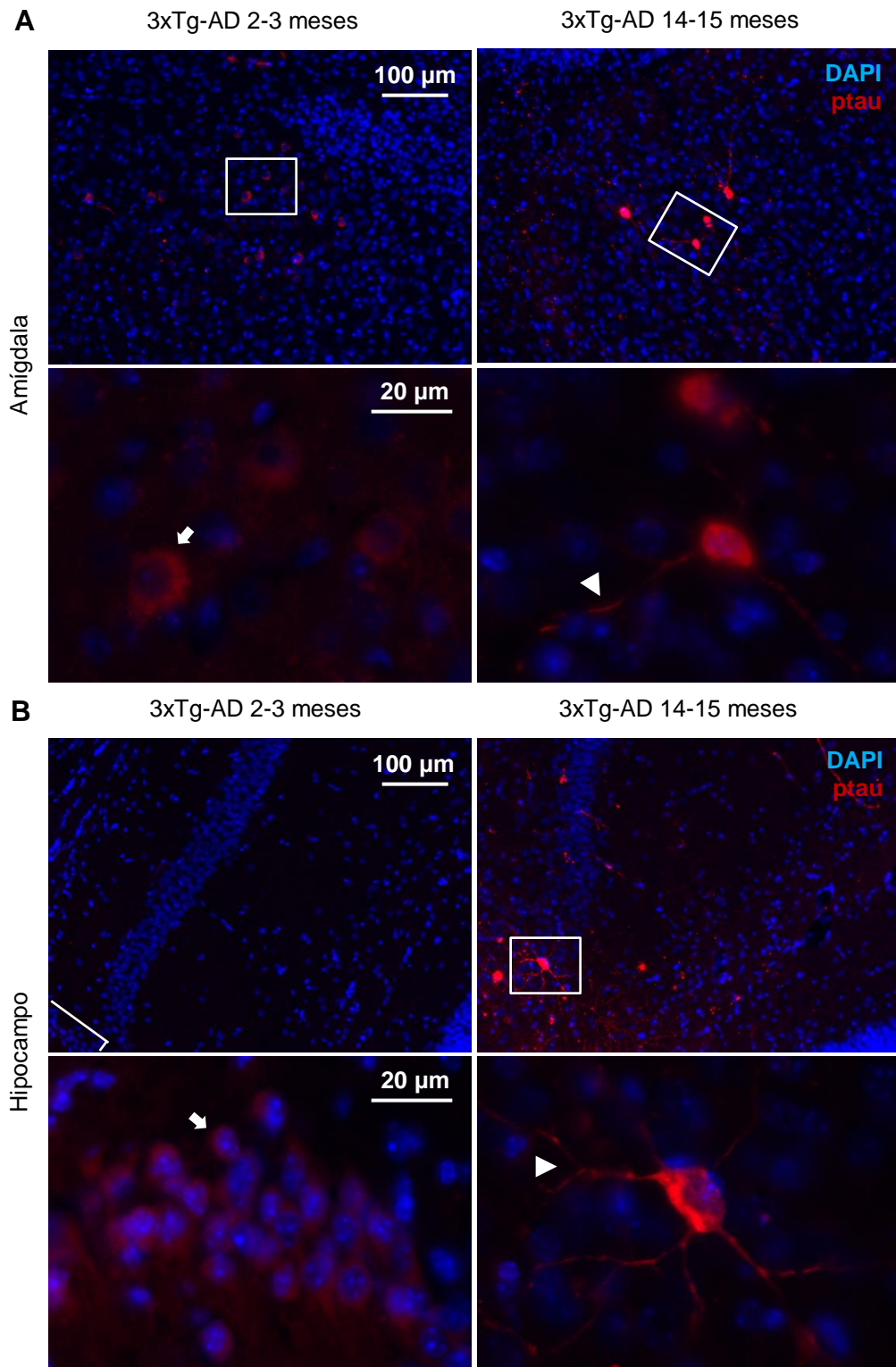


Figura 11. IF de ptau en ratones 3xTg-AD de 2-3 meses y 14-15 meses. Se exponen cortes coronales representativos de amígdala (A) e hipocampo (B) de IF realizadas con el anticuerpo anti-p-PHF-tau clona AT8. En todos los casos se confirma la expresión del transgén humano. A los 2-3 meses la señal es en baja, difusa y detectable en el soma neuronal con exposición y aumento mayores en el microscopio (flechas). A los 14-15 meses aumenta la señal, el número de células inmunopositivas y el número de procesos neuronales que contienen ptau (cabezas de flecha). Los paneles inferiores de cada estructura corresponden a la magnificación del recuadro dibujado.

III. Determinación de los perfiles de microRNAs en plasma

Se recolectaron muestras de sangre de 25 ratones 3xTg-AD y WT de 2-3 meses y 14-15 meses durante diferentes sesiones, utilizando EDTA como anticoagulante. Inmediatamente después de la recolección, se separó el plasma de cada muestra mediante dos centrifugaciones, una a baja velocidad para separar el plasma del paquete celular y otra a alta velocidad para remover los restos celulares y el material genético asociado a estos. Se formaron 3 diferentes *pools* por cada grupo experimental a partir del plasma de 2-3 ratones. A continuación se presentan los datos de los grupos experimentales y los ratones incluidos en el estudio:

GRUPO	POOL	RATÓN	GENOTIPO	EDAD (meses)
WT 2-3 meses	Wt-2/3m-I	11	WT	2.4
		13	WT	2.4
		9	WT	2.6
	Wt-2/3m-II	12	WT	2.6
		10	WT	2.7
	Wt-2/3m-III	14	WT	2.7
3xTg-AD 2-3 meses	Tg-2/3m-I	7	3xTg-AD	3.4
		8	3xTg-AD	3.4
		1	3xTg-AD	3.0
	Tg-2/3m-II	6	3xTg-AD	3.5
		2	3xTg-AD	2.5
	Tg-2/3m-III	3	3xTg-AD	2.5
WT 14-15 meses	Wt-14/15m-I	13	WT	14.7
		22	WT	14.7
	Wt-14/15m-II	15	WT	14.7
		16	WT	14.7
	Wt-14/15m-III	14	WT	15
		19	WT	15
21	WT	15		
3xTg-AD 14-15 meses	Tg-14/15m-I	1	3xTg-AD	14
		8	3xTg-AD	14.4
	Tg-14/15m-II	3	3xTg-AD	14
		7	3xTg-AD	14.6
	Tg-14/15m-III	2	3xTg-AD	14.2
		6	3xTg-AD	14.2

Tabla 1. Datos generales de los ratones incluidos en el estudio. Se presenta el grupo experimental, la denominación de cada *pool* integrante y la información de los ratones estudiados: número de identificación, genotipo y edad al momento de la toma de muestra.

Una vez formados los *pools* se continuó, para cada uno, con el aislamiento del RNA total durante el que se adicionó un miRNA sintético que mimetiza al miR-39 de *C. elegans* y no presenta homología con ningún miRNA murino. El miR-39 se

empleó en la normalización de los datos ya que los comúnmente utilizados con este fin a partir de muestras de tejido, como lo son los RNAs pequeños nucleares (snRNA) y nucleolares (snoRNA), son poco abundantes en plasma. Posteriormente se efectuó la síntesis del cDNA y el producto se almacenó a -20°C . Cabe señalar que en todos los casos se trabajó con muestras de sangre frescas que se obtenían en cada día de trabajo a partir de ratones pertenecientes a grupos diferentes, evitando el sesgo de los datos.

Al día siguiente se montaron y corrieron las qPCRs correspondientes. El perfil de miRNAs de cada uno de los *pools* se determinó a partir de una plataforma que, en base a reacciones independientes de qPCR, es capaz de detectar simultáneamente en la muestra la presencia y niveles de 84 miRNAs murinos diferentes previamente asociados a procesos de neurodesarrollo y neuropatías. El diseño de la plataforma se muestra en la Figura 12.

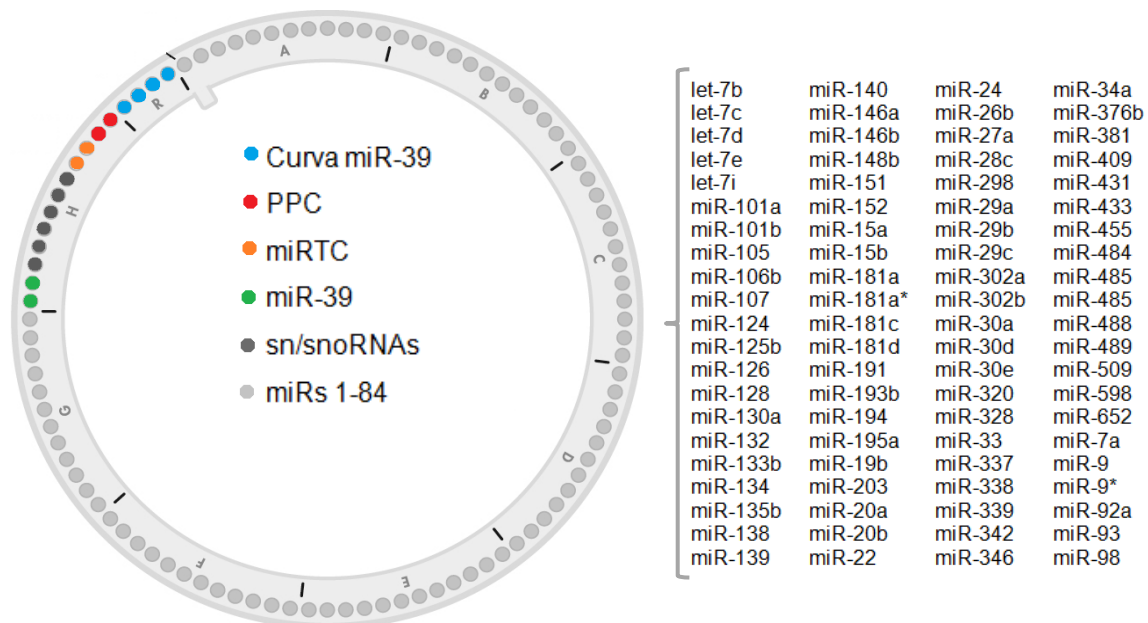


Figura 12. Diseño de la plataforma. Se presenta la distribución de las reacciones independientes de qPCR dentro del arreglo miScript miRNA PCR Array formato Rotor Gene, Qiagen. En azul: los pozos utilizados para la construcción de una curva patrón de detección del miR-39 de *C. elegans*. En rojo: pruebas para el control positivo de PCR (PPC: un DNA sintético introducido durante la PCR). En naranja: pruebas para el control positivo de la reacción de retrotranscripción (miRTC: un RNA sintético en la mezcla de síntesis del cDNA). En verde: pruebas para el miR-39 de *C. elegans* añadido durante el aislamiento del RNA. En gris oscuro: pruebas para snRNAs y snoRNA. En gris claro: pruebas para los 84 miRNAs indicados a la derecha de la imagen, previamente relacionados con procesos de neurodesarrollo y neuropatías (modificada del miScript miRNA PCR Array Handbook, Qiagen, 2012).

Para todas las corridas de qPCR se revisaron los valores del ciclo umbral (Ct) de los controles positivos de la PCR (PPC) y de la reacción de retrotranscripción (miRTC), así como sus curvas de disociación (Figura 13), con la finalidad de corroborar que ambas reacciones hubieran ocurrido con eficacia y especificidad. Las condiciones del fabricante establecen que el Ct del PPC debe encontrarse en valores de 15 (+/- 2) ciclos, y que el Ct del miRTC no debe exceder un valor de 7 ciclos posteriores. Estas dos condiciones se cumplieron en todos los casos, generando los siguientes valores promedio:

PPC		miRTC	
Ct	s	Ct	s
14.96	0.21	16.89	0.53

Tabla 2. Valores promedio del Ct de los controles PPC y miRTC.

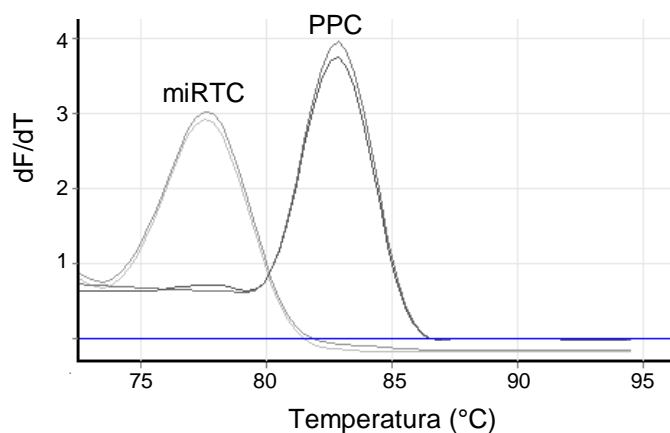


Figura 13. Curvas de disociación de los controles miRTC y PPC. En el eje de las abscisas: la temperatura en escala Celsius. En el eje de las ordenadas: la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura. La gráfica representativa presenta las curvas de disociación de los controles miRTC y PPC e indica la presencia de un único producto de PCR en ambos casos.

Además en todas las corridas de qPCR se incluyó una curva patrón de detección del miR-39 de *C. elegans* como una herramienta de seguimiento del adecuado y consistente desempeño del sistema y de su rendimiento. De igual forma, se realizó el análisis de las curvas de disociación del miR-39 originadas tanto de la curva patrón como de la muestra, encontrándose en todos los casos un único pico

correspondiente al producto de PCR (Figura 15). La siguiente tabla presenta la información obtenida a través del análisis de los datos generados por el miR-39:

Curva patrón miR-39			miR-39 en las muestras		Rendimiento del sistema	
Copias	Ct	s	Ct	s	Rendimiento	S
1000000	15.11	0.54	17.91	0.22	37.52%	7.00
100000	17.95	0.45				
10000	20.80	0.51				
1000	23.18	0.54				

Tabla 3. Análisis de datos a partir del miR-39 de *C. elegans*. Izquierda: las copias del miR-39 añadidas en la curva patrón, el promedio de los respectivos Ct y la desviación estándar (s) asociada. Centro: el promedio de los Ct del miR-39 detectado en las muestras tras su adición durante el aislamiento del RNA. Derecha: el rendimiento promedio del sistema considerando el total de las reacciones realizadas y que, de llevarse a cabo con 100% de eficiencia el aislamiento del RNA y la síntesis del cDNA, se añadirían a la PCR un total de 270000 copias del miR-39.

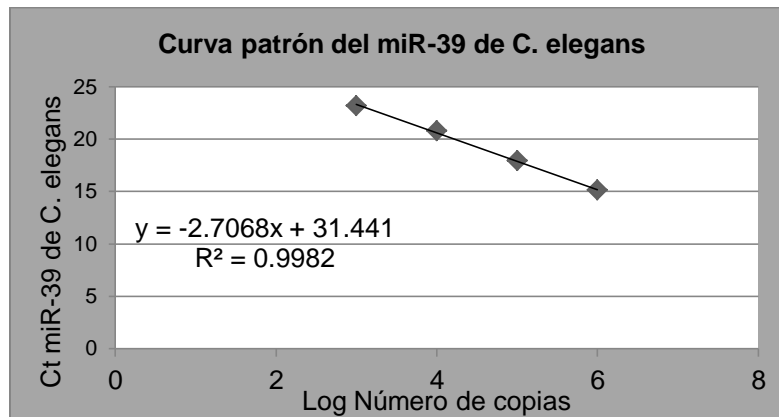


Figura 14. Curva patrón del miR-39 de *C. elegans*. En el eje de las abscisas: el logaritmo base 10 del número de copias añadido a cada tubo de PCR de la curva. En el eje de las ordenadas: el Ct promedio para cada tubo. En la parte central: la curva representada por la ecuación de la recta y su respectivo coeficiente de correlación, a partir de la que se calculó el rendimiento del sistema.

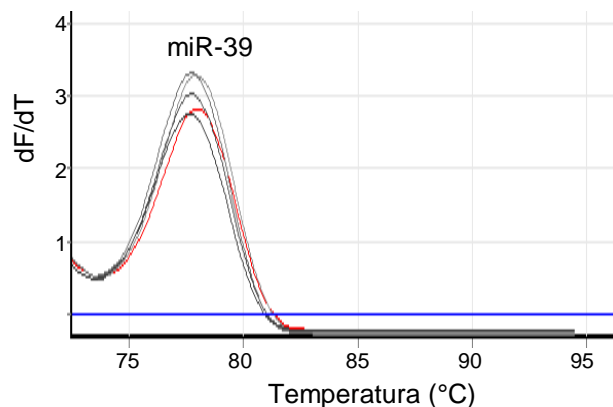


Figura 15. Curvas de disociación del miR-39 originadas a partir de la curva patrón y de la muestra. En el eje de las abscisas: la temperatura en escala Celsius. En el eje de las ordenadas: la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura. La gráfica representativa indica la presencia de un único producto de PCR en ambos casos.

El análisis de curvas de disociación también incluyó cada uno de los 84 miRNAs evaluados. Las gráficas generadas consistieron en un único pico correspondiente a la presencia de un producto de PCR para la mayoría de los miRNAs detectados, como en el caso del miR-106b; en los no detectados, como el miR-302a, no se observó ningún pico (Figura 16). Se encontraron algunas excepciones, por ejemplo, el miR-302b supuestamente se detectó con un Ct<25 pero no presenta una curva de disociación característica de un producto de PCR (Figura 16A), y el miR-9-5p amplifica aparentemente en ciclos posteriores al 30 en los grupos de ratones viejos, pero en la gráfica de curvas se revela la ausencia de un producto (Figura 16B). En los grupos de ratones jóvenes, el miR-9-5p amplifica y se detecta, sugiriendo diferencias en la abundancia de este miRNA relacionadas al envejecimiento (Figura 16A). Los miRNAs que no presentaron curvas de disociación características a las de un producto de PCR se excluyeron del análisis.

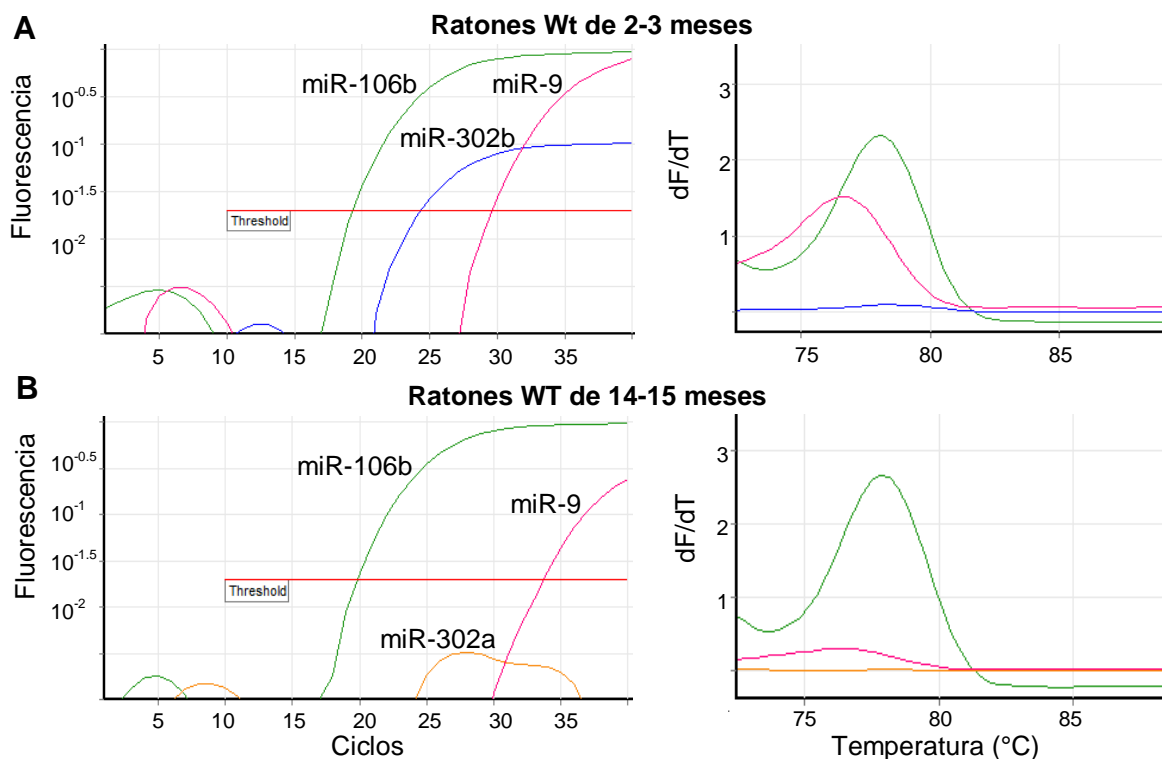


Figura 16. Análisis de curvas de disociación. Se presentan gráficas de amplificación (izquierda) y de curvas de disociación (derecha) representativas obtenidas de la qPCR de ratones WT de 2-3 meses (A) y de 14-15 meses (B) del miR-106b (verde) detectado en ciclos menores a 25 y con un único pico correspondiente a un producto de PCR; del miR-302b (azul) que, si bien amplifica en ciclos menores a 25, la curva de disociación indica la ausencia de un producto de PCR; del miR-302a (naranja) no detectado; y del miR-9-5p (rosa) detectado solo en ratones jóvenes.

III.1. Abundancia de los microRNAs en el plasma de ratones

La mayoría de los 84 miRNAs probados en el estudio se detectaron en todas las corridas (Figura 17 y Anexo I). Dentro de una misma muestra se observaron abundancias específicas de cada miRNA. Los miembros de las familias del let-7, miR-30, miR-29, miR-24-27, miR-15, miR-17-92 y sus parálogos miR-106a-363 y miR-106b-25, amplificaron en ciclos menores a 20 en todos los grupos experimentales resultando ser los de mayor abundancia. En contraste, otros miRNAs se encontraron en bajas abundancias o ausentes del plasma, tal es el caso del miR-105, miR-135b, miR-302a/b, miR-488, miR-489, miR-509 y miR-9-5p, miR-9-3p que, debido a su no detección, detección en ciclos superiores a 30 o la ausencia de un producto de PCR revelada mediante el análisis de curvas de disociación, generaron datos dispersos entre un mismo grupo experimental y no se consideraron en los análisis posteriores.

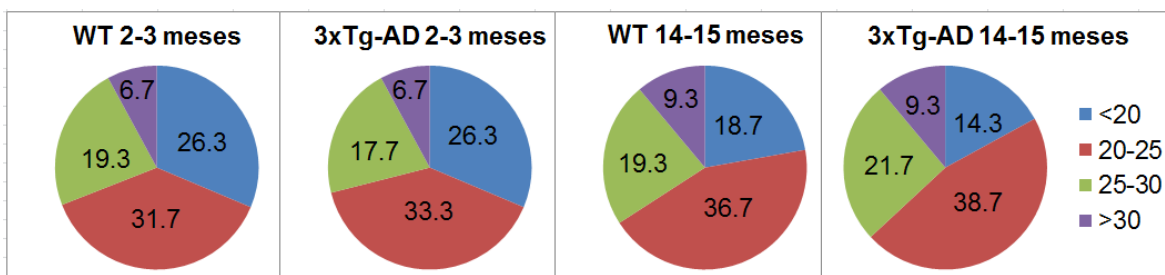


Figura 17. Detección de miRNAs en los distintos grupos experimentales. Se presenta el promedio del número de miRNAs por grupo experimental detectados en ciclos menores a 20 (azul), entre 20-25 (rojo), 25-30 (verde) y mayores a 30 o no detectados (morado); se observa que en ratones de 14-15 meses disminuye la abundancia de miRNAs en general denotada por la disminución de miRNAs detectados en ciclos menores a 20 y el aumento en ciclos mayores a 30 o no detectados.

De manera interesante, en los grupos de 14-15 meses ocurre un corrimiento de todos los miRNAs identificado por una reducción en el número de detecciones en ciclos menores a 20 y un aumento en ciclos mayores 30 o no detectados (Figura 16). En efecto, al comparar la distribución de miRNAs entre los diferentes grupos experimentales se observa que los ratones jóvenes presentan, en general, cantidades similares de todos los miRNAs (Figura 18A). Lo mismo ocurre con los ratones viejos (Figura 18B). Sin embargo, al comparar ratones jóvenes y viejos se

evidencia una disminución de la abundancia global de los miRNAs asociada al envejecimiento (Figuras 18C y D).

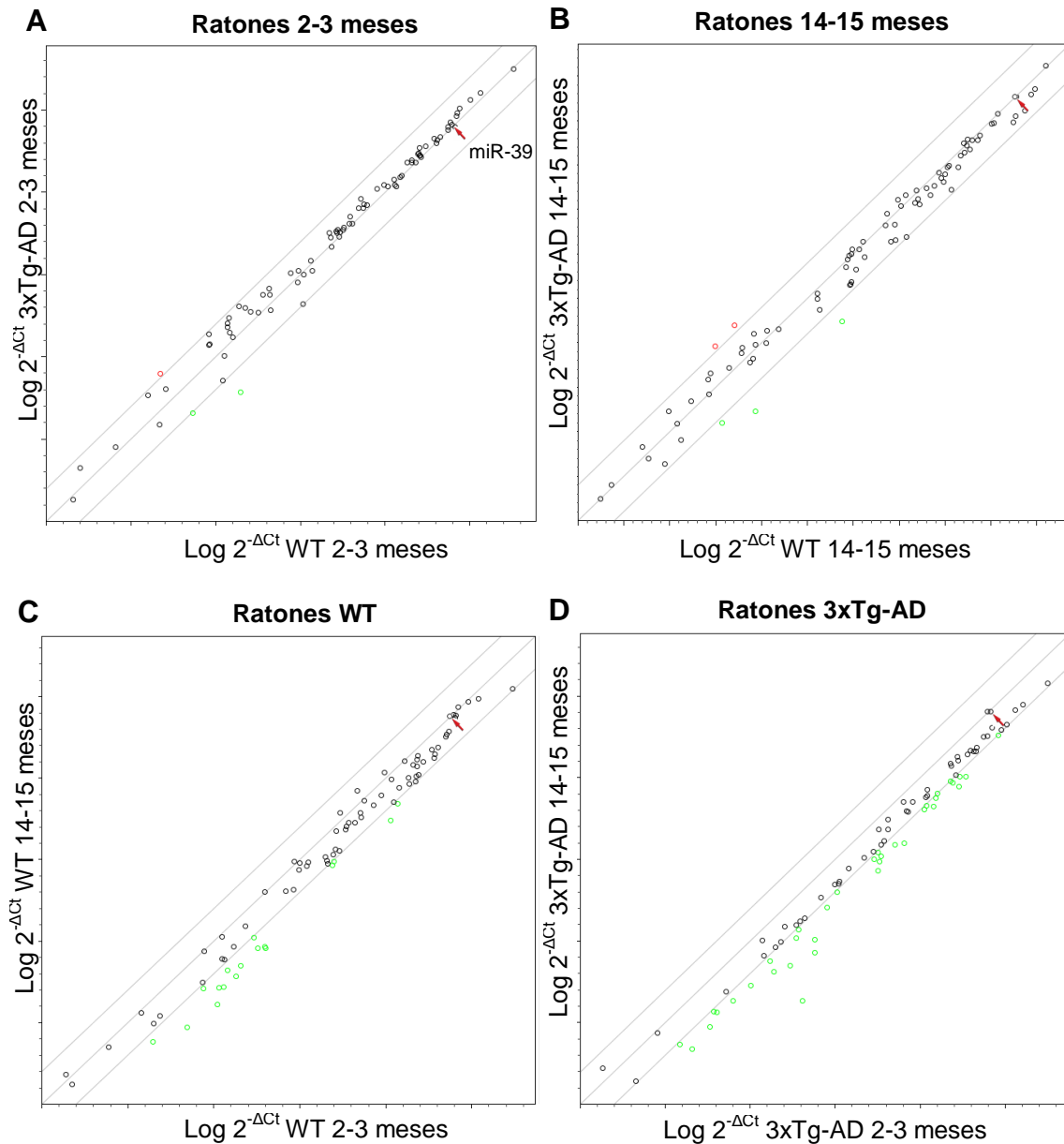


Figura 18. Comparación de la abundancia de miRNAs entre grupos. En el eje de las abscisas: el logaritmo base 10 de 2 elevado a la potencia $-\Delta Ct$ (diferencia negativa de cada uno de los miRNAs y el miR-39, es decir, datos normalizados) del grupo señalado en cada caso. En el eje de las ordenadas: el logaritmo base 10 de $2^{\Delta Ct}$ del grupo a comparar. A: comparación entre ratones jóvenes WT y 3xTg-AD. B: comparación entre ratones viejos WT y 3xTg-AD. C: comparación entre ratones WT jóvenes y viejos. D: comparación entre ratones 3xTg-AD jóvenes y viejos. De encontrarse en abundancias generales semejantes, los miRNAs deberían posicionarse sobre la diagonal media marcada, tal como sucede con el miR-39 de *C. elegans* en todos los casos (flecha roja), o bien, distribuirse de igual manera entre las dos barreras como sucede en A y B. En cambio en C y D, los miRNAs se desplazan únicamente hacia un lado de la diagonal central indicando una disminución global de la abundancia de los miRNAs durante la vejez.

III.2. Cambios en los niveles de los microRNAs plasmáticos relacionados con el envejecimiento

A la par del fenómeno global anteriormente descrito, se identificaron cambios individuales en la abundancia de ciertos miRNAs entre los grupos experimentales. La primera comparación que se llevó a cabo fue de los perfiles de miRNAs circulantes de ratones jóvenes y viejos, tanto de genotipo WT como 3xTg-AD. Se detectaron variaciones en los niveles de 33 miRNAs entre ratones jóvenes y viejos WT y de 40 miRNAs en el caso de los 3xTg-AD, de los cuales 19 coincidieron en ambos genotipos, sugiriendo asociaciones entre el envejecimiento y la abundancia en plasma de estos miRNAs (Figura 19A y B).

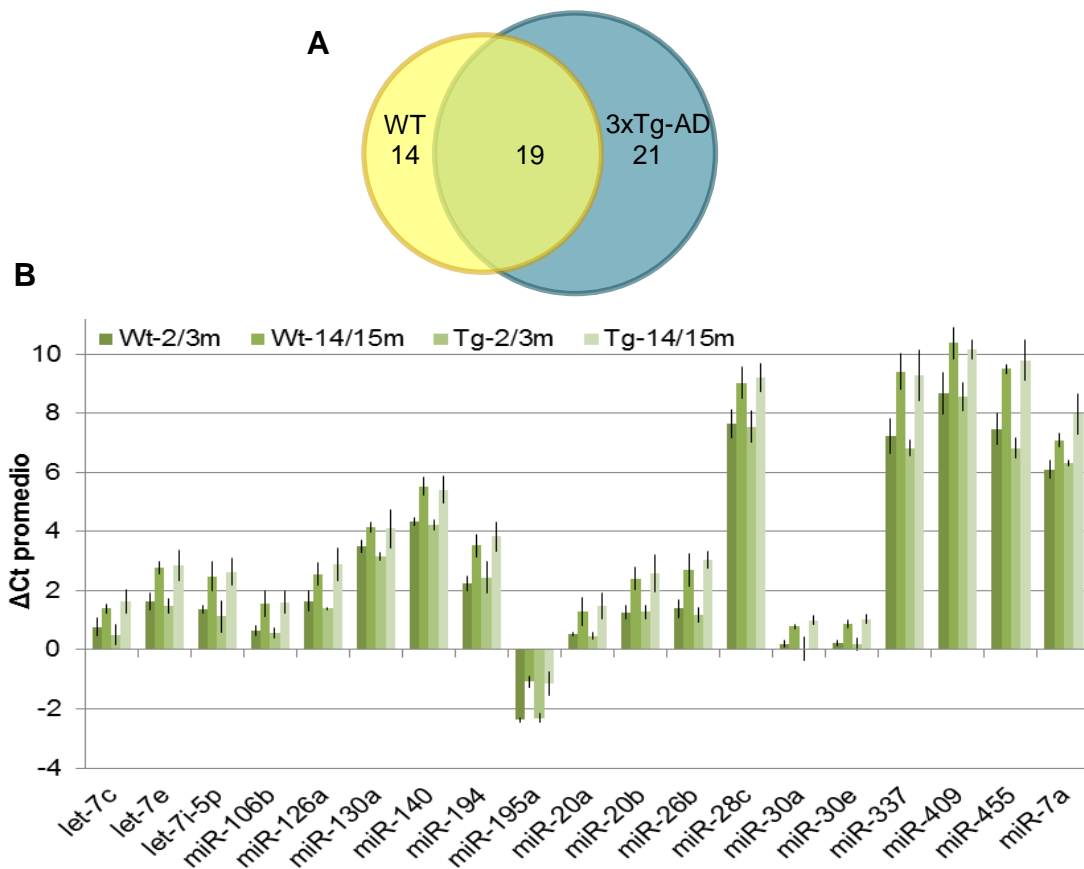


Figura 19. Efectos del envejecimiento en los perfiles de miRNAs circulantes. A: el diagrama de Venn muestra el número de miRNAs con niveles plasmáticos estadísticamente distintos entre ratones jóvenes y viejos WT y 3xTg-AD, 19 de los cuales coincidieron en ambos genotipos. B: se presentan para los 4 grupos los promedios de los datos normalizados de Ct ($Ct_{miR} - Ct_{miR-39}$) correspondientes a cada uno de los 19 miRNAs con cambios en común en ambos genotipos entre los 2-3 meses y los 14-15 (eje de las ordenadas), incluyendo su desviación estándar. En todos los casos se determinó la significancia estadística mediante una prueba "t" de dos colas: $p < 0.05$.

De manera interesante, a excepción del miR-146a, los miRNAs que mostraron cambios estadísticamente significativos en sus niveles plasmáticos de ratones viejos con respecto a los jóvenes WT, mantuvieron la tendencia en el caso de los 3xTg-AD (Figura 20A). De igual manera, un grupo de miRNAs con niveles estadísticamente distintos entre ratones jóvenes y viejos 3xTg-AD, también conservaron la tendencia en el caso de los WT, aunque estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística (Figura 20B).

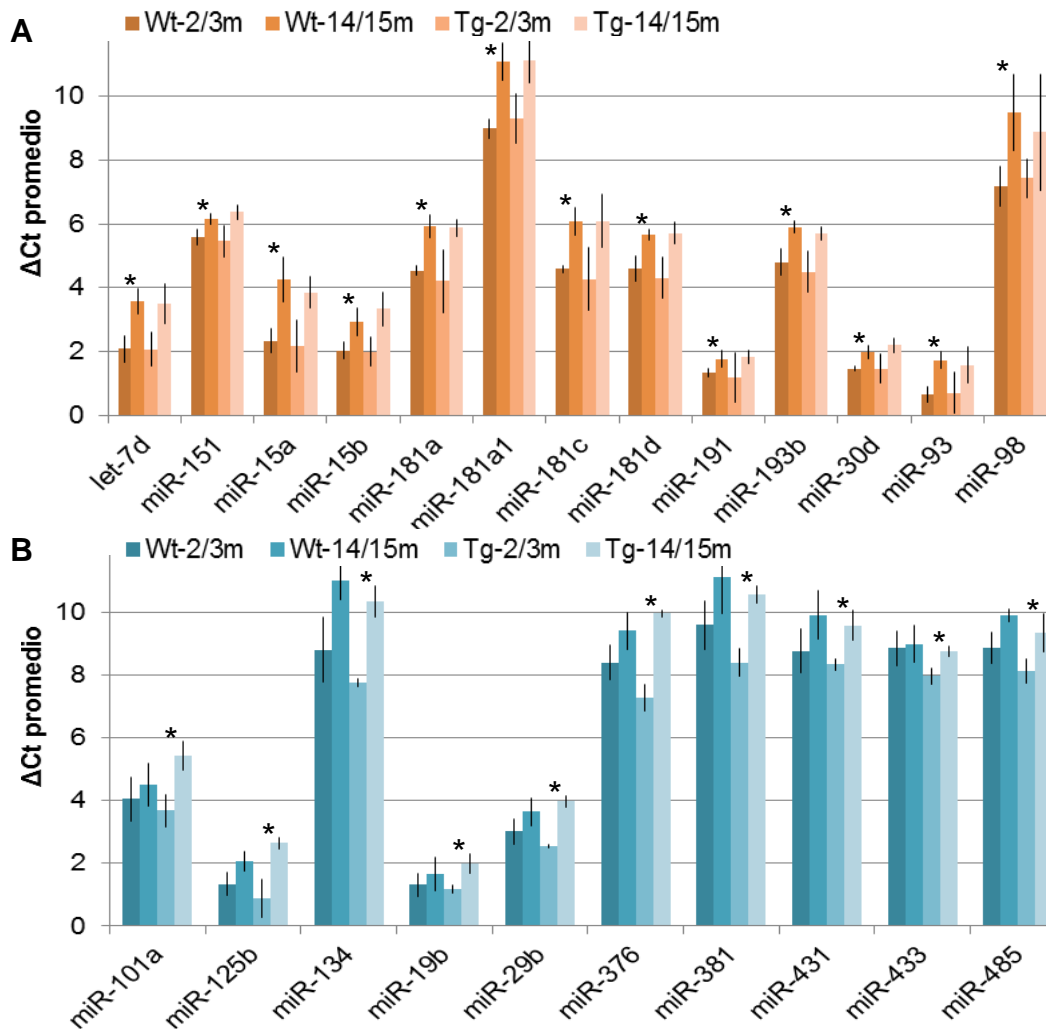


Figura 20. Variaciones en los niveles de miRNAs circulantes entre ratones jóvenes y viejos. Se presentan los promedios de los datos normalizados de Ct ($Ct_{miR} - Ct_{miR-39}$) (eje de las ordenadas), y su respectiva desviación estándar, de los miRNAs indicados (eje de las abscisas). A: las diferencias observadas entre los niveles de los miRNAs en plasma de ratones WT y los de jóvenes conservan la tendencia en los 3xTg-AD, aunque en este caso no alcanzan la significancia estadística. B: los cambios en los niveles plasmáticos de miRNAs entre ratones viejos y jóvenes 3xTg-AD, también mantienen la tendencia en los WT, aunque no constituyen cambios significativos. El asterisco (*) indica una $p < 0.05$ correspondiente a una prueba "t" de dos colas.

III.3. Diferencias particulares de los microRNAs plasmáticos asociadas al envejecimiento de los ratones 3xTg-AD

Otro grupo de miRNAs circulantes tuvieron un comportamiento distinto durante el envejecimiento de los ratones WT y de los 3xTg-AD. En el caso de los transgénicos, se presentó una reducción en los niveles del miR-132, miR-138, miR-146a, miR-146b, miR-22, miR-24, miR-27a, miR-29a, miR-29c, miR-34a y miR-338; mientras que en los ratones WT se mantuvieron sin cambios o, inclusive, aumentaron. Tal fue lo ocurrido en el miR-146a en el que se observaron diferencias estadísticamente significativas de sus niveles entre ratones jóvenes y viejos de ambos genotipos, pero en sentido inverso (Figura 21). En conjunto, estos miRNAs pudieran estar relacionados de manera específica con el envejecimiento de los ratones 3xTg-AD.

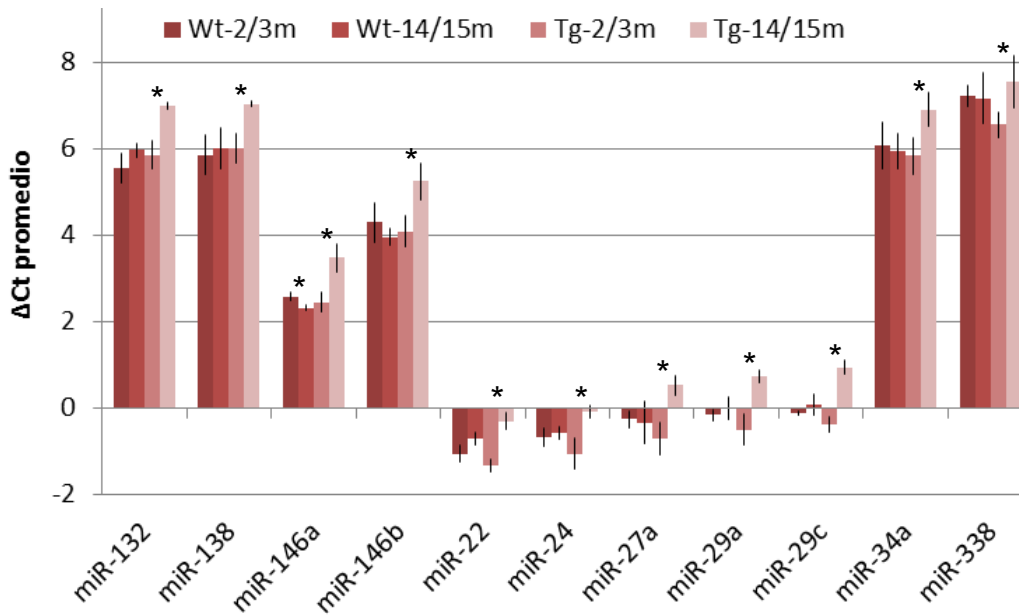


Figura 21. Cambios relacionados con el envejecimiento de los ratones 3xTg-AD. Se presentan los promedios de los datos normalizados de Ct ($Ct_{miR} - Ct_{miR-39}$) (eje de las ordenadas), y su respectiva desviación estándar, de los miRNAs indicados (eje de las abscisas). Se observan los cambios específicos en relacionados con el envejecimiento en el caso de los ratones transgénicos. El asterisco (*) indica la significancia estadística a partir de una prueba "t" de dos colas con una $p < 0.05$.

III.4. Variaciones en el contenido de microRNAs circulantes asociadas a la patología

Posteriormente se compararon los perfiles de miRNAs circulantes de ratones WT y 3xTg-AD. El análisis entre ratones jóvenes de diferentes genotipos no identificó cambios estadísticamente significativos en la abundancia de ningún miRNA, implicando que la simple presencia de los transgenes no modifica el contenido de miRNAs en plasma (Anexo I). En contraste, se identificaron variaciones con significancia estadística de los niveles de ciertos miRNAs entre ratones viejos WT y 3xTg-AD, sugiriendo la influencia de la patología que desarrollan los transgénicos en el perfil plasmático de miRNAs. El miR-132, miR-138, miR-139, miR-146a, miR-146b, miR-22, miR-24, miR-29a, miR-29c mostraron una menor abundancia en el plasma de los ratones 3xTg-AD de 14-15 meses en comparación con los WT de la misma edad; mientras que el miR-346 resultó más abundante (Figura 22). Cabe mencionar que la mayoría de estos miRNAs se encontraron modificados diferencialmente entre los ratones WT y 3xTg-AD durante el envejecimiento. Es decir, presentaron cambios de manera específica en los ratones 3xTg-AD de 14-15 meses en comparación con los de 2-3 meses, y no así en los ratones WT.

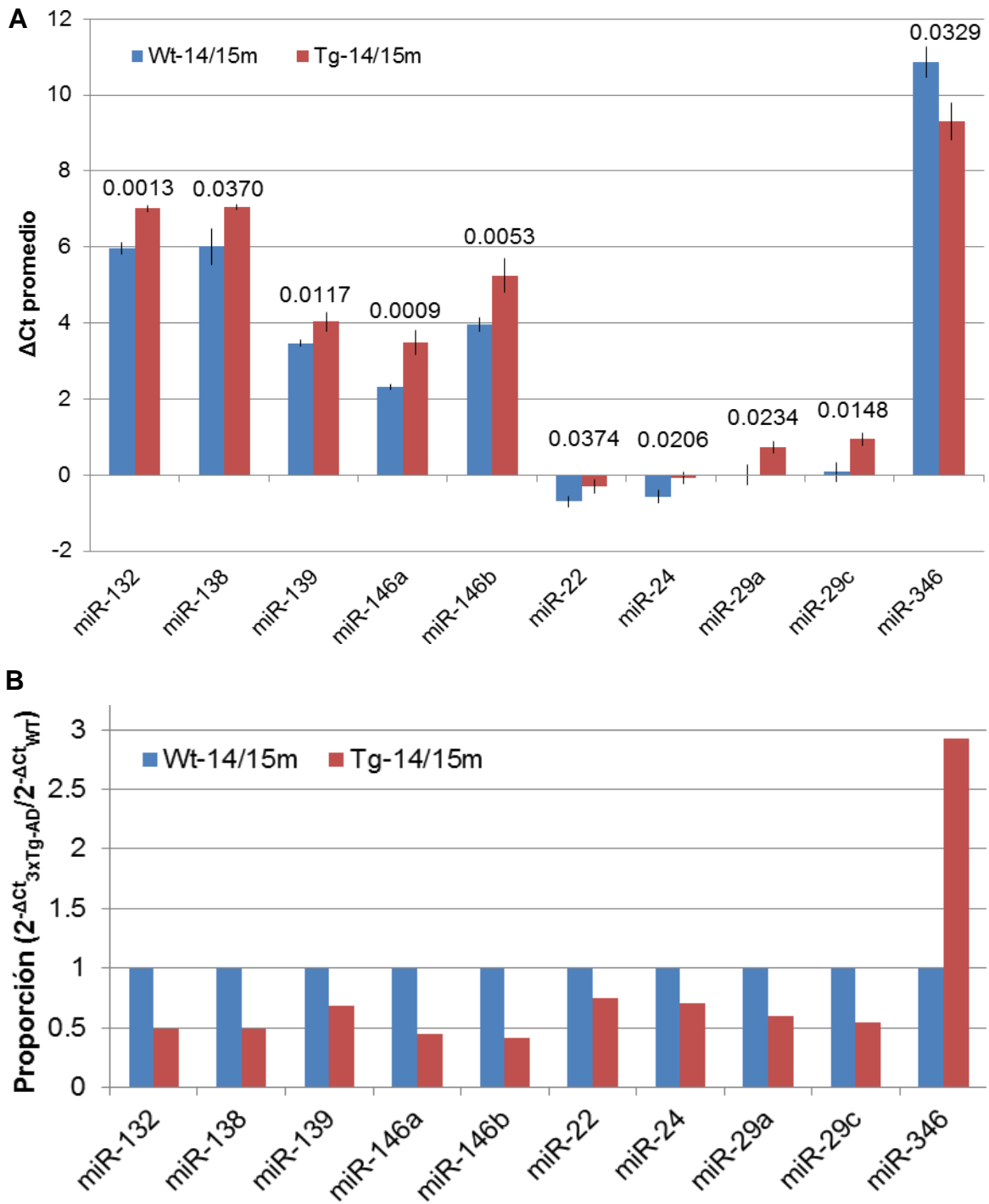


Figura 22. Comparación de ratones WT y 3xTg-AD de 14-15 meses. En el eje de las abscisas: los miRNAs cuyos niveles difirieron entre ambos grupos. A: en el eje de las ordenadas: los promedios de los datos de Ct normalizados del grupo WT (azul) y del 3xTg-AD (rojo), incluyendo su respectiva desviación estándar. En la parte superior de las barras los valores de p determinados mediante una prueba “t” de dos colas. B: en el eje de las ordenadas, la proporción en la que se encuentran los miRNAs en el plasma de ratones 3xTg-AD de 14-15 meses con respecto a la abundancia en el plasma de los ratones WT de la misma edad.

DISCUSIÓN

A partir de una plataforma capaz de analizar múltiples miRNAs originados de una misma muestra a la vez, se accedió al perfil plasmático de miRNAs previamente identificados en procesos de neurodesarrollo y neuropatías. En este trabajo se analizó dicho perfil en un modelo murino de AD durante dos diferentes etapas de la evolución de la patología en comparación con ratones WT de edad semejante. Los ratones 3xTg-AD de 2-3 meses de edad no han desarrollado las manifestaciones histológicas, electrofisiológicas ni conductuales de tipo AD (Oddo, et. al. 2003; Billings, et. al. 2005; Mastrangelo y Bowers, 2008). Estas alteraciones comienzan a evidenciarse en etapas posteriores y se encuentran presentes a los 14-15 meses, edad en la que se observan depósitos extracelulares del péptido A β y fosforilaciones de la proteína tau en residuos relevantes para la AD en las regiones vulnerables de la enfermedad.

En concordancia con las características clínicas del modelo, los perfiles de miRNAs circulantes de ratones WT y 3xTg-AD de 2-3 meses de edad coincidieron, implicando que la simple expresión de los transgenes no es suficiente para ocasionar cambios en el contenido plasmático de los miRNAs evaluados. No obstante, se realizaron comparaciones entre los perfiles de miRNAs circulantes de ratones jóvenes y viejos con la finalidad de identificar diferencias ocurridas durante el envejecimiento que revelaran alteraciones en el curso de este proceso en los ratones 3xTg-AD con respecto al presentado naturalmente por los ratones WT. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de 33 miRNAs entre ratones WT jóvenes y viejos, y de 40 miRNAs en el caso de los 3xTg-AD, de los cuales 20 coincidieron en ambos genotipos. Gran parte del resto de los miRNAs con cambios significativos propios de cualquiera de los dos grupos, mantuvieron la tendencia en el otro, es decir, mostraron diferencias hacia la misma dirección aunque éstas no alcanzaron la significancia estadística, probablemente debido a la N reducida con la que se cuenta. Las coincidencias entre los ratones WT y 3xTg-AD proponen la existencia de mecanismos relacionados con el proceso de envejecimiento capaces de alterar el perfil de miRNAs circulantes. De

hecho, la mayoría de los miRNAs pertenecientes a este grupo en común han sido anteriormente relacionados a este proceso natural. Los programas de desarrollo regulan en gran medida la expresión del let-7 en *C. elegans*, durante el envejecimiento se observa su inminente disminución aun en condiciones que lo retardan (Kato, et. al. 2011). La senescencia caracterizada por un arresto irreversible que impide la progresión del ciclo celular contribuye al envejecimiento de los tejidos, la familia de miR-17-92 y sus parálogos miR-106a-363 y miR-106b-25 se contraponen al fenómeno de senescencia y por consiguiente la elevación de sus niveles está altamente implicada en cáncer y su reducción es evidente en modelos de envejecimiento (Grillari, et. al. 2010). Otros reguladores de este fenómeno son los miembros de las familias del miR-30 y miR-29, pero en este caso su neutralización resulta en la inhibición (Martinez, et. al. 2011). La inflamación también está involucrada en la senescencia celular, uno de los miRNAs moduladores de la respuesta inflamatoria, el miR-146a, se encontró alterado tanto en ratones viejos 3xTg-AD como WT pero en direcciones opuestas, a la baja y a la alta respectivamente. De manera interesante el miR-146a se encuentra elevado en modelos de senescencia celular (Olivieri, et. al. 2013; Rippo, et. al. 2014), mientras que algunos estudios relacionados con la AD lo encuentran disminuido, especialmente en fluidos como CSF y plasma (Kiko, et. al. 2014; Müller, et. al. 2014). En el caso del miR-34a se observaron discrepancias similares, niveles significativamente reducidos en plasma de ratones 3xTg-AD viejos con respecto a los jóvenes, mientras que con tendencia a elevarse en los WT viejos. Niveles elevados del miR-34a en cerebro, células sanguíneas y plasma de ratón se relacionan con el envejecimiento (Li, et. al. 2011). La pérdida de este miRNA en *Drosophila* induce fenotipos neurodegenerativos y la sobre-expresión, longevidad (Liu, et. al. 2012). Sin embargo, en los casos de AD los reportes son inconsistentes, en células sanguíneas y en CFS han encontrado una mayor abundancia del miR-34a en los casos de enfermedad (Alexandrov, et. al. 2012; Bhatnagar, et. al. 2014), mientras que en plasma y en otro estudio realizado en CFS lo encuentran menos abundante (Kiko, et. al. 2014; Müller, et. al. 2014).

Resulta intrigante que las numerosas variaciones significativas observadas en ratones viejos con respecto a los jóvenes consistieran en la disminución de los niveles de los miRNAs circulantes, por lo que pareciera que el envejecimiento tiene efectos globales además de los particulares sobre la abundancia de los miRNAs. Algunas posibles explicaciones podrían ser en torno a situaciones metodológicas como la menor estabilidad de las muestras de ratones de 14-15 meses, o la mayor dificultad para aislar el RNA íntegro de estas muestras, incluso bajo idénticos tratamiento, manipulación, condiciones y a la misma vez que las muestras de los jóvenes (como se manejaron). Otras en torno a la composición, que realmente la abundancia de los miRNAs circulantes en ratones viejos sea menor. El trabajo de Pritchard y colaboradores (2012) demostró que los perfiles humanos de miRNAs circulantes correlacionan con los conteos de células sanguíneas, es decir, si la cuenta de un linaje celular en específico es menor en una muestra que en la otra, los miRNAs específicos de dicho linaje se encuentran disminuidos. Pudiera ser que en ratones de 14-15 meses hubiera menor cantidad de células sanguíneas, hecho que está comprobado en humanos y que se observa acentuado en pacientes con AD, al menos para algunos tipos celulares principalmente linfocitos (Speciale, et. al. 2007; Jaremo, et. al. 2013; Shad, et. al. 2013; Wang, et. al. 2013). También que de manera global las células contuvieran menores cantidades de miRNAs, o presentaran alteraciones en los mecanismos de secreción de exosomas, complejos ribonucleoproteicos, microvesículas, etc., o bien, que estos fueran más lábiles. Como primeros acercamientos se podrían hacer conteos linaje específicos de células sanguíneas comparando muestras de jóvenes y viejos, pero también analizar diferentes tipos de muestras para observar si el efecto se reproduce en otros tejidos.

De manera interesante, dentro del grupo de miRNAs modificados en ratones 3xTg-AD de 14-15 meses con respecto a los jóvenes, se incluyen cambios específicos para este genotipo, sugiriendo la interacción de los transgenes con el proceso de envejecimiento que resultan en alteraciones en su curso en comparación con el presentado naturalmente en ratones WT. Por lo tanto, el envejecimiento ocurre con ciertas particularidades en los ratones transgénicos.

En este sentido, los perfiles de miRNAs circulantes de ratones de 14-15 meses difirieron entre los WT y 3xTg-AD en cuanto a la abundancia de ciertos miRNAs. Los niveles plasmáticos de 9 miRNAs resultaron significativamente menor en muestras de ratones 3xTg-AD de 14-15 meses de edad con respecto a los WT: miR-132, miR-138, miR-139, miR-146a, miR-146b, miR-29a, miR-29c, miR-22, miR-24, y los de un miRNA fueron significativamente mayores, miR-346. La mayoría de las alteraciones en los niveles de los miRNAs previamente asociadas a la AD consisten en reducciones en muestras humanas de tejido cerebral como es el caso de la familia del miR-15, miR-29, miR-101, miR-106, miR-107 y miR-181 (Cogswell, et. al. 2008; Hébert, et. al. 2008; Wang, et. al. 2008; Geekiyanage y Chan 2011; Wang, et. al. 2011), lo cual también ha sido observado para los miRNAs estudiados en muestras humanas de CSF (Burgos, et. al. 2014) y suero/plasma (Geekiyanage, et.al. 2011; Kumar, et. al. 2013; Tan, et. al. 2013; Kiko, et. al. 2014).

Este estudio			Otros estudios		
miRNA	Muestra	Niveles	Muestra	Niveles	Referencia
miR-132	Plasma ratones 3xTg-AD y WT	-	Cerebro humano	-	Cogswell, et. al. 2008
			Corteza humana	-	Hébert, et. al. 2013
			CSF humano	-	Burgos, et. al. 2014
miR-138		-	CSF humano	+	Cogswell, et. al. 2008
CSF humano			-	Burgos, et. al. 2014	
miR-139		-	CSF humano	-	Burgos, et. al. 2014
miR-146a		-	CSF humano	+	Alexandrov, et. al. 2012
			CSF/plasma humano	-	Kiko, et. al. 2013
			CFS humano	-	Müller, et. al. 2014
			Hipocampo humano	+/-	
miR-146b	-	CSF humano	-	Cogswell, et. al. 2008	
		Cerebro humano	-		
miR-29a	-	Corteza humana	-	Hébert, et. al. 2008	
		Suero humano	-	Geekiyanage, et. al. 2011	
		CSF humano	+	Kiko, et. al. 2013	
miR-29c	-	Corteza humana	-	Hébert, et. al. 2008	

Tabla 4. MicroRNAs que mostraron niveles distintos entre ratones 3xTg-AD y WT de 14-15 meses de edad y que han sido relacionados previamente con la AD.

Dentro de los miRNAs presentados diferencialmente en el plasma de ratones 3xTg-AD con respecto a los WT de 14-15 meses, se encuentran varios que han sido relacionados previamente con la AD (Tabla 4). Tal es el caso de los miembros de la familia del miR-29, que en concordancia con los resultados del presente trabajo, se han observado disminuidos en tejido cerebral de pacientes con AD. Además, han demostrado ser capaces de regular al mRNA de la β -secretasa *in vitro*, dato interesante ya que la proteína β -secretasa se eleva en casos de AD aun cuando los niveles de su mRNA permanecen constantes sugiriendo alteraciones en el control post-transcripcional que podrían explicarse en parte, por la disminución del miR-29. De hecho, existe una correlación inversa en pacientes de los niveles del miR-29 y la β -secretasa (Hébert, et. al. 2008). En cuanto al miR-146a y miR-146b, se ha reportado que muestras de tejido cerebral y CSF de pacientes con AD muestran mayores niveles del miR-146a y menores del miR-146b con respecto a los controles (Cogswell, et. al. 2008; Lukiw, et. al. 2008; Cui, et. al. 2010; Alexandrov, et. al. 2012), sin embargo, un par de estudios recientes conducidos en hipocampo, CSF y plasma de pacientes reportaron niveles menores del miR-146a lo que concuerda con los resultados presentados en este trabajo (Kiko, et. al. 2014; Müller). Estos miRNAs participan en la regulación de la respuesta inmune y la expresión del miR-146a depende de la activación de NF κ B en respuesta a cascadas de señalización inflamatorias (Lukiw, et. al. 2008). Dado que la neuroinflamación es un proceso que acompaña a la AD, las alteraciones en estos miRNAs son de relevancia para la patología. La menor abundancia del miR-132, miR-138 y miR-139 se ha identificado en tejido cerebral (Cogswell, et. al. 2008; Hébert, et. al. 2013) y en CSF (Burgos, et. al. 2014) durante la AD. En neuronas, el miR-132 y miR-138 se expresan en respuesta a actividad sináptica y participan en la modulación de eventos morfológicos de plasticidad sináptica (Wayman, et al. 2008; Siegel et al. 2009; Hansen, et al. 2012). Los resultados del presente trabajo muestran además que tanto el miR-132, como el miR-138 están disminuidos en los ratones viejos 3xTg-AD con respecto a los jóvenes del mismo grupo, efecto que no se observa en el grupo de ratones WT. Dado que las sinapsis constituyen sitios vulnerables en la AD y varios factores o eventos importantes en

la patología comprometen su función o se modifican acorde a su disfunción, la disminución en los niveles de los miRNAs mencionados constituye un dato sobresaliente. De manera interesante, el miR-132, miR-138 y miR-139 se encuentran enriquecidos en cerebro, hecho que conduce al cuestionamiento acerca del origen de los miRNAs detectados en plasma y de los mecanismos que subyacen a las variaciones de sus niveles en estados patológicos.

En ese aspecto, Chen y colaboradores (2008) demostraron que el perfil de miRNAs circulantes refleja al de las células sanguíneas en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, en condiciones patológicas la situación anterior cambia puesto que se presentan variaciones entre el perfil de miRNAs circulantes y el de las células sanguíneas en casos de cáncer y diabetes, lo que sugiere el origen de miRNAs circulantes a partir de otros tejidos, al menos, durante procesos patológicos. Pritchard y colaboradores (2012), corroboraron la concordancia del perfil de miRNAs circulantes con el de células sanguíneas. Pero en este caso, la observaron para aquellos miRNAs con mayor abundancia en el plasma, es decir, que hay otros miRNAs circulantes que no se expresan en células sanguíneas por lo tanto originarios de otros tejidos cuyos niveles son menores pero detectables como en el caso del miRNA hepático miR-122. Acorde a esto, dentro de los miRNAs evaluados en el presente trabajo, los que se encontraron en mayor abundancia en todos los grupos experimentales fueron los miembros de las familias de let-7, miR-29, miR-30, miR-24-27, miR-17-92 y sus parálogos miR-106a-363 y miR-106b-25 reconocidos por su expresión en diversos tipos de tejidos, incluyendo células sanguíneas, y por su participación en procesos celulares básicos como el desarrollo, la proliferación, diferenciación y sobrevivencia, pero también hay basta literatura de su implicación en la hematopoyesis, el sistema inmune y diversos tipos de leucemias. Consistente con esta idea, miRNAs que son altamente tejido-específicos o momento de desarrollo específicos, no se detectaron. Tal es el caso del miR-135b y miR-302 que se expresan especialmente en células embrionarias participando en procesos de autorrenovación y mantenimiento de las mismas, y del miR-488 y miR-9 cuya presencia predomina en cerebro (Landgraf, et. al. 2007). Si bien la abundancia en

plasma de los miRNAs pudiera reflejar el perfil de las células sanguíneas, el origen de los cambios observados en los ratones 3xTg-AD con respecto a los WT continúa siendo una interrogante. La expresión de los transgenes presentes en los 3xTg-AD está dirigida al CNS donde ocurren las manifestaciones de tipo AD, abriendo la posibilidad de que los cambios de los miRNAs observados en plasma se originen en cerebro y más considerando que los exosomas son capaces de atravesar barrera hematoencefálica (Alvarez-Erviti, et. al. 2011).

Si bien resulta interesante la elucidación del origen de los cambios observados entre los ratones 3xTg-AD y los WT de 14-15 meses, el hecho de que estos sean detectables en plasma, sin influir el tejido del cual se originen, los propone como posibles biomarcadores moleculares de la patología de tipo AD que presentan los ratones 3xTg-AD.

CONCLUSIONES

No se observaron diferencias en el perfil de miRNAs circulantes entre ratones jóvenes WT y 3xTg-AD, implicando que la simple expresión de los transgenes no ocasiona variaciones directas en el contenido de miRNAs circulantes.

El proceso de envejecimiento se relaciona con la reducción de la abundancia global de los miRNAs en plasma de ratón.

Existen modificaciones de un grupo específico de miRNAs hacia los 14-15 meses, tanto en ratones WT como 3xTg-AD, asociadas al proceso anteriormente mencionado.

Otro grupo específico de miRNAs cambia selectivamente entre ratones 3xTg-AD jóvenes y viejos, sugiriendo alteraciones en el proceso de envejecimiento de los ratones transgénicos.

En este sentido, se encontraron disminuciones estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos del miR-132, miR-138, miR-139, miR-146a, miR-146b, miR-22, miR-24, miR-29a y miR-29c, así como el aumento en los niveles del miR-346 en ratones 3xTg-AD de 14-15 meses con respecto a los WT de edad semejante.

El seguimiento del estudio de estos miRNAs podría aportar mayor información acerca de su funcionamiento como biomarcadores moleculares de la patología de tipo AD que presentan los ratones 3xTg-AD.

PERSPECTIVAS

Este estudio masivo constituye el primero en su tipo dedicado a la evaluación del contenido en plasma de múltiples miRNAs a la vez realizado en un modelo transgénico murino de la AD, así que representa una primera aproximación que pretende averiguar el funcionamiento de estas moléculas como posibles biomarcadores tempranos de la histopatología característica de la enfermedad.

Los resultados indican que es posible observar diferencias en los niveles de ciertos miRNAs asociadas a la histopatología, sin embargo, hasta este punto no son concluyentes. Se requieren estudios complementarios que den validez y sumen interés a los datos presentados.

La validación mediante técnicas más sensibles y dirigidas, como la qRT-PCR oligo-específica, de los diez miRNAs presentados con niveles plasmáticos diferenciales entre ratones 3xTg-AD y WT de 14-15 meses de edad en un grupo más grande de ratones probaría la reproducibilidad de los datos. La inclusión de otros puntos temporales correspondientes a etapas previas a los 14-15 meses pero posteriores a los 2-3 meses daría información acerca del comportamiento de estos miRNAs durante la evolución de la histopatología.

Por otro lado, la evaluación de la manera anteriormente descrita de estos diez miRNAs en tejido cerebral, abordaría su relevancia en las regiones vulnerables a las que está dirigida la expresión de los transgenes y abriría puertas a la evaluación de los mecanismos moleculares que subyacen a los cambios observados en las muestras de plasma.

Es importante mencionar que la información obtenida de este estudio es proporcionada por un modelo de la AD y que la información interesante debe confirmarse en humano.

REFERENCIAS

- Alexandrov, P. N., P. Dua, et al. (2012). "microRNA (miRNA) speciation in Alzheimer's disease (AD) cerebrospinal fluid (CSF) and extracellular fluid (ECF)." *Int J Biochem Mol Biol* 3(4): 365-73.
- Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, et al. (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." *Nat Biotechnol* 29(4): 341-5.
- Alzheimer, A. (1907). "*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.*" *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychischgerichtliche Medizin* 64.
- Ameres, S. L. y P. D. Zamore (2013). "Diversifying microRNA sequence and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8): 475-88.
- Ansari, M. A. y S. W. Scheff (2010). "Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex." *J Neuropathol Exp Neurol* 69(2): 155-67.
- Arendt, T. (2000). "Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain." *Neurobiol Aging* 21(6): 783-96.
- Arendt, T. (2001). "Alzheimer's disease as a disorder of mechanisms underlying structural brain self-organization." *Neuroscience* 102(4): 723-65.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, et al. (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12): 5003-8.
- Ashe, K. H. y K. R. Zahs (2010). "Probing the biology of Alzheimer's disease in mice." *Neuron* 66(5): 631-45.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-97.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136(2): 215-33.
- Bezprozvanny, I. y M. P. Mattson (2008). "Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* 31(9): 454-63.
- Bhatnagar, S., H. Chertkow, et al. (2014). "Increased microRNA-34c abundance in Alzheimer's disease circulating blood plasma." *Front Mol Neurosci* 7: 2.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." *Cell* 125(6): 1111-24.
- Billings, L. M., S. Oddo, et al. (2005). "Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice." *Neuron* 45(5): 675-88.

Billingsley, M. L. y R. L. Kincaid (1997). "Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration." *Biochem J* 323 (Pt 3): 577-91.

Blennow, K., H. Hampel, et al. (2010). "Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* 6(3): 131-44.

Braak, H. y E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta Neuropathol* 82(4): 239-59.

Bregues, M., D. Teixeira, et al. (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." *Science* 310(5747): 486-9.

Brewer, G. J. (2000). "Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging." *Exp Gerontol* 35(9-10): 1165-83.

Buckner, R. L., A. Z. Snyder, et al. (2005). "Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory." *J Neurosci* 25(34): 7709-17.

Burgos, K., I. Malenica, et al. (2014). "Profiles of Extracellular miRNA in Cerebrospinal Fluid and Serum from Patients with Alzheimer's and Parkinson's Diseases Correlate with Disease Status and Features of Pathology." *PLoS One* 9(5): e94839.

Calvo-Ochoa, E. y C. Arias (2014). "Cellular and metabolic alterations in the hippocampus caused by insulin signaling dysfunction and its association with cognitive impairment during aging and Alzheimer's disease. Animal models of study." *Diabetes Metab Res Rev*.

Caroni, P. (1997). "Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice." *J Neurosci Methods* 71(1): 3-9.

Carter, M. D., G. A. Simms, et al. (2010). "The development of new therapeutics for Alzheimer's disease." *Clin Pharmacol Ther* 88(4): 475-86.

Castellano, J. M., J. Kim, et al. (2011). "Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance." *Sci Transl Med* 3(89): 89ra57.

Chen, X., Y. Ba, et al. (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." *Cell Res* 18(10): 997-1006.

Cirrito, J. R., K. A. Yamada, et al. (2005). "Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo." *Neuron* 48(6): 913-22.

Cogswell, J. P., J. Ward, et al. (2008). "Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways." *J Alzheimers Dis* 14(1): 27-41.

Corder, E. H., A. M. Saunders, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* 261(5123): 921-3.

Coskun, P. E., M. F. Beal, et al. (2004). "Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10726-31.

Cotman, C. W., J. W. Geddes, et al. (1990). "Axon sprouting in the rodent and Alzheimer's disease brain: a reactivation of developmental mechanisms?" *Prog Brain Res* 83: 427-34.

Cougot, N., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation." *J Neurosci* 28(51): 13793-804.

Counts, S. E., M. Nadeem, et al. (2006). "Differential expression of synaptic proteins in the frontal and temporal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment." *J Neuropathol Exp Neurol* 65(6): 592-601.

Cui, J. G., Y. Y. Li, et al. (2010). "Differential regulation of interleukin-1 receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) and IRAK-2 by microRNA-146a and NF-kappaB in stressed human astroglial cells and in Alzheimer disease." *J Biol Chem* 285(50): 38951-60.

Das, P., M. P. Murphy, et al. (2001). "Reduced effectiveness of Abeta1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition." *Neurobiol Aging* 22(5): 721-7.

Davies, C. A., D. M. Mann, et al. (1987). "A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease." *J Neurol Sci* 78(2): 151-64.

Dawson, G. R., G. R. Seabrook, et al. (1999). "Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein." *Neuroscience* 90(1): 1-13.

De Strooper, B., P. Saftig, et al. (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." *Nature* 391(6665): 387-90.

DeKosky, S. T. y S. W. Scheff (1990). "Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity." *Ann Neurol* 27(5): 457-64.

DeKosky, S. T., S. W. Scheff, et al. (1996). "Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change." *Neurodegeneration* 5(4): 417-21.

Dhahbi, J. M. (2014). "Circulating small noncoding RNAs as biomarkers of aging." *Ageing Res Rev*.

Dickson, D. W. (1997). "The pathogenesis of senile plaques." *J Neuropathol Exp Neurol* 56(4): 321-39.

Eehalt, R., P. Keller, et al. (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." *J Cell Biol* 160(1): 113-23.

Eisenberg, D. y M. Jucker (2012). "The amyloid state of proteins in human diseases." *Cell* 148(6): 1188-203.

Fabian, M. R., N.Sonenberg (2012). "The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC." *Nat Struct Mol Biol.* 19(6): 586-93.

Fagan, A. M., M. A. Mintun, et al. (2006). "Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans." *Ann Neurol* 59(3): 512-9.

Ferreira, S. T., J. R. Clarke, et al. (2014). "Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease." *Alz Dement* 10(1S): S76-83.

Fox, N. C., E. K. Warrington, et al. (1999). "Serial magnetic resonance imaging of cerebral atrophy in preclinical Alzheimer's disease." *Lancet* 353(9170): 2125.

Galasko, D., D. Bennett, et al. (1997). "An inventory to assess activities of daily living for clinical trials in Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 11 Suppl 2: S33-9.

Geekiyange, H., G. A. Jicha, et al. (2011). "Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease." *Exp Neurol* 235(2): 491-6.

Gibbins, D. J., C. Ciaudo, et al. (2009). "Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity." *Nat Cell Biol* 11(9): 1143-9.

Gilman, S., M. Koller, et al. (2005). "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial." *Neurology* 64(9): 1553-62.

Glenner, G. G. y C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." *Biochem Biophys Res Commun* 120(3): 885-90.

Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." *Nature* 349(6311): 704-6.

Gomez-Isla, T., R. Hollister, et al. (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 41(1): 17-24.

Gomez-Isla, T., H. L. West, et al. (1996). "Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 39(1): 62-70.

Gotz, J., F. Chen, et al. (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301I tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils." *Science* 293(5534): 1491-5.

- Grasso, M., P. Piscopo, et al. (2014). "Circulating miRNAs as Biomarkers for Neurodegenerative Disorders." *Molecules* 19(5): 6891-910.
- Grillari, J., M. Hackl, et al. (2010). "miR-17-92 cluster: ups and downs in cancer and aging." *Biogerontology* 11(4): 501-6.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986a). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." *J Biol Chem* 261(13): 6084-9.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986b). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13): 4913-7.
- Guo, H., N. T. Ingolia, et al. (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature* 466(7308): 835-40.
- Gura, T. (2008). "Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places." *Nat Med* 14(9): 894.
- Hansen, K. F., K. Karelina, et al. (2012). "miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity." *Brain Struct Funct* 218(3): 817-31.
- Hansson, O., H. Zetterberg, et al. (2006). "Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study." *Lancet Neurol* 5(3): 228-34.
- Hardy, J., K. Duff, et al. (1998). "Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau." *Nat Neurosci* 1(5): 355-8.
- Hardy, J. y D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* 297(5580): 353-6.
- Hebert, S. S., K. Horre, et al. (2009). "MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression." *Neurobiol Dis* 33(3): 422-8.
- Hebert, S. S., K. Horre, et al. (2008). "Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(17): 6415-20.
- Hebert, S. S., A. S. Papadopoulou, et al. (2012). "Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration." *Hum Mol Genet* 19(20): 3959-69.
- Hebert, S. S., W. X. Wang, et al. (2013). "A study of small RNAs from cerebral neocortex of pathology-verified Alzheimer's disease, dementia with lewy bodies, hippocampal sclerosis, frontotemporal lobar dementia, and non-demented human controls." *J Alzheimers Dis* 35(2): 335-48.

Heinonen, O., H. Soininen, et al. (1995). "Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease." *Neuroscience* 64(2): 375-84.

Hernandez-Ortega, K., R. Quiroz-Baez, et al. (2011). "Cell cycle reactivation in mature neurons: a link with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases?" *Neurosci Bull* 27(3): 185-96.

Heuer, E., R. F. Rosen, et al. (2012). "Nonhuman primate models of Alzheimer-like cerebral proteopathy." *Curr Pharm Des* 18(8): 1159-69.

Hirai, K., G. Aliev, et al. (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 21(9): 3017-23.

Holtzman, D. M., J. C. Morris, et al. (2011). "Alzheimer's disease: the challenge of the second century." *Sci Transl Med* 3(77): 77sr1.

Hsia, A. Y., E. Masliah, et al. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3228-33.

Huang, Y. y L. Mucke (2012). "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies." *Cell* 148(6): 1204-22.

Huber, G., Y. Bailly, et al. (1997). "Synaptic beta-amyloid precursor proteins increase with learning capacity in rats." *Neuroscience* 80(2): 313-20.

Iwasaki, S., et al. (2010). "Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes." *Mol Cell* 39(2): 292-9.

Jaremo, P., M. Milovanovic, et al. (2013). "Alzheimer's disease and granulocyte density diversity." *Eur J Clin Invest* 43(6): 545-8.

Jin, L. W., H. Ninomiya, et al. (1994). "Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension." *J Neurosci* 14(9): 5461-70.

Kalaria, R. N. (2000). "The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 21(2): 321-30.

Katakowski, M., B. Buller, et al. (2010). "Functional microRNA is transferred between glioma cells." *Cancer Res* 70(21): 8259-63.

Kato, M., X. Chen, et al. (2011). "Age-associated changes in expression of small, noncoding RNAs, including microRNAs, in *C. elegans*." *RNA* 17(10): 1804-20.

Kiko, T., K. Nakagawa, et al. (2014). "MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 39(2): 253-9.

Kim, J., L. Onstead, et al. (2007). "Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo." *J Neurosci* 27(3): 627-33.

- Kinet, V., J. Halkein, et al. (2013). "Cardiovascular extracellular microRNAs: emerging diagnostic markers and mechanisms of cell-to-cell RNA communication." *Front Genet* 4: 214.
- Knowles, R. B., C. Wyart, et al. (1999). "Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5274-9.
- Koffie, R. M., M. Meyer-Luehmann, et al. (2009). "Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(10): 4012-7.
- Koike, H., S. Tomioka, et al. (1999). "Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein." *Biochem J* 343 Pt 2: 371-5.
- Koudinov, A. R. y N. V. Koudinova (2001). "Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration." *FASEB J* 15(10): 1858-60.
- Kövári, E., P. R. Hof, et al. (2011). "The Geneva brain collection." *Ann N Y Acad Sci*. 1225(1): E131-E146.
- Kowall, N. W., M. F. Beal, et al. (1991). "An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7247-51.
- Krol, J., I. Loedige, et al. (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat Rev Genet* 11(9): 597-610.
- Kumar, P., Z. Dezso, et al. (2013). "Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease." *PLoS One* 8(7): e69807.
- Lachenal, G., K. Pernet-Gallay, et al. (2011). "Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity." *Mol Cell Neurosci* 46(2): 409-18.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, et al. (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-53.
- Lanctot, K. L., N. Herrmann, et al. (2003). "Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis." *CMAJ* 169(6): 557-64.
- Landgraf, P., M. Rusu, et al. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." *Cell* 129(7): 1401-14.
- Lawrie, C. H., S. Gal, et al. (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma." *Br J Haematol* 141(5): 672-5.

Lee, J. H., W. H. Yu, et al. (2010). "Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations." *Cell* 141(7): 1146-58.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-54.

Lee, Y. S., S. Pressman, et al. (2009). "Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking." *Nat Cell Biol* 11(9): 1150-6.

Leidinger, P., C. Backes, et al. (2013). "A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients." *Genome Biol* 14(7): R78.

Leuba, G., A. Savioz, et al. (2008). "Differential changes in synaptic proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein." *J Alzheimers Dis* 15(1): 139-51.

Levy-Lahad, E., W. Wasco, et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." *Science* 269(5226): 973-7.

Lewis, J., D. W. Dickson, et al. (2001). "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP." *Science* 293(5534): 1487-91.

Li, X., A. Khanna, et al. (2011). "Circulatory miR34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging." *Aging (Albany NY)* 3(10): 985-1002.

Lipton, S. A. (2005). "The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism." *Curr Alzheimer Res* 2(2): 155-65.

Liu, N., M. Landreh, et al. (2012). "The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*." *Nature* 482(7386): 519-23.

Liu, W., C. Liu, et al. (2012). "MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice." *Neurobiol Aging* 33(3): 522-34.

Lopez, O. L., J. T. Becker, et al. (2009). "Long-term effects of the concomitant use of memantine with cholinesterase inhibition in Alzheimer disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(6): 600-7.

Lorenzo, A. y B. A. Yankner (1994). "Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25): 12243-7.

Lovestone, S. y C. H. Reynolds (1997). "The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes." *Neuroscience* 78(2): 309-24.

Lukiw, W. J. (2007). "Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus." *Neuroreport* 18(3): 297-300.

Lukiw, W. J. y P. N. Alexandrov (2012). "Regulation of complement factor H (CFH) by multiple miRNAs in Alzheimer's disease (AD) brain." *Mol Neurobiol* 46(1): 11-9.

Lukiw, W. J., Y. Zhao, et al. (2008). "An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells." *J Biol Chem* 283(46): 31315-22.

Mann, D. M., P. O. Yates, et al. (1985). "Correlation between senile plaque and neurofibrillary tangle counts in cerebral cortex and neuronal counts in cortex and subcortical structures in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* 56(1): 51-5.

Martinez, I., D. Cazalla, et al. (2011). "miR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2): 522-7.

Masliah, E., R. D. Terry, et al. (1989). "Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease." *Neurosci Lett* 103(2): 234-9.

Mastrangelo, M. A. and W. J. Bowers (2008). "Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice." *BMC Neurosci* 9: 81.

Mecocci, P., U. MacGarvey, et al. (1994). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* 36(5): 747-51.

Mesulam, M. M. (2000). "A plasticity-based theory of the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 924: 42-52.

Miska, E. A., E. Alvarez-Saavedra, et al. (2004). "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain." *Genome Biol* 5(9): R68.

Mitchell, P. S., R. K. Parkin, et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10513-8.

Montecalvo, A., A. T. Larregina, et al. (2011). "Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes." *Blood* 119(3): 756-66.

Moreira, P. I., S. L. Siedlak, et al. (2007). "Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease." *Autophagy* 3(6): 614-5.

Mortimer, J. A., C. M. van Duijn, et al. (1991). "Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group." *Int J Epidemiol* 20 Suppl 2: S28-35.

Mountjoy, C. Q., M. Roth, et al. (1983). "Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients." *Neurobiol Aging* 4(1): 1-11.

Müller, M., H. B. Kuiperij, et al. "MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid." *Neurobiol Aging* 35(1): 152-8.

Mutisya, E. M., A. C. Bowling, et al. (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 63(6): 2179-84.

Neary, D., J. S. Snowden, et al. (1986). "Alzheimer's disease: a correlative study." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49(3): 229-37.

Nelson, P. T., I. Alafuzoff, et al. (2012). "Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature." *J Neuropathol Exp Neurol* 71(5): 362-81.

Nixon, R. A., J. Wegiel, et al. (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(2): 113-22.

Nunez-Iglesias, J., C. C. Liu, et al. (2010). "Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation." *PLoS One* 5(2): e8898.

Oddo, S., L. Billings, et al. (2004). "Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome." *Neuron* 43(3): 321-32.

Oddo, S., A. Caccamo, et al. (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." *Neuron* 39(3): 409-21.

Orom, U. A., F. C. Nielsen, et al. (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation." *Mol Cell* 30(4): 460-71.

Ott, A., R. P. Stolk, et al. (1999). "Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study." *Neurology* 53(9): 1937-42.

Pacifici, M., S. Delbue, et al. (2013). "Cerebrospinal fluid miRNA profile in HIV-encephalitis." *J Cell Physiol* 228(5): 1070-5.

Palop, J. J. y L. Mucke (2010a). "Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks." *Nat Neurosci* 13(7): 812-8.

Palop, J. J. y L. Mucke (2010b). "Synaptic depression and aberrant excitatory network activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin?" *Neuromolecular Med* 12(1): 48-55.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." *Nature* 408(6808): 86-9.

- Perrin, R. J., A. M. Fagan, et al. (2009). "Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease." *Nature* 461(7266): 916-22.
- Pescador, N., M. Perez-Barba, et al. (2013). "Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers." *PLoS One* 8(10): e77251.
- Pietrini, P., G. E. Alexander, et al. (2000). "The neurometabolic landscape of cognitive decline: in vivo studies with positron emission tomography in Alzheimer's disease." *Int J Psychophysiol* 37(1): 87-98.
- Pike, C. J., D. Burdick, et al. (1993). "Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state." *J Neurosci* 13(4): 1676-87.
- Pratico, D. (2008). "Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows." *Ann N Y Acad Sci* 1147: 70-8.
- Prince, M. y J. Jackson (2009). "World Alzheimer Report." Alzheimer's Disease International.
- Pritchard, C. C., E. Kroh, et al. (2012). "Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies." *Cancer Prev Res (Phila)* 5(3): 492-7.
- Olivieri, F., R. Lazzarini, et al. "MiR-146a as marker of senescence-associated pro-inflammatory status in cells involved in vascular remodelling." *Age (Dordr)* 35(4): 1157-72.
- Qiagen (2012). "miRNeasy Serum/Plasma Handbook."
- Qiagen (2012). "miScript miRNA PCR Array Handbook."
- Quiroz-Baez, R., D. Flores-Dominguez, et al. (2013). "Synaptic aging is associated with mitochondrial dysfunction, reduced antioxidant contents and increased vulnerability to amyloid-beta toxicity." *Curr Alzheimer Res* 10(3): 324-31.
- Rasmusson, D. X., J. Brandt, et al. (1995). "Head injury as a risk factor in Alzheimer's disease." *Brain Inj* 9(3): 213-9.
- Read, J. y C. Suphioglu (2013). "Dropping the BACE: Beta Secretase (BACE1) as an Alzheimer's Disease Intervention Target." *InTech* 10: 227-256.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 403(6772): 901-6.
- Reisberg, B., R. Doody, et al. (2003). "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease." *N Engl J Med* 348(14): 1333-41.
- Riddell, D. R., G. Christie, et al. (2001). "Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts." *Curr Biol* 11(16): 1288-93.

Rippo, M. R., F. Olivieri, et al. (2014). "MitomiRs in human inflamm-aging: a hypothesis involving miR-181a, miR-34a and miR-146a." *Exp Gerontol* 56: 154-63.

Roberson, E. D., K. Scearce-Levie, et al. (2007). "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." *Science* 316(5825): 750-4.

Roberts, G. W., D. Allsop, et al. (1990). "The occult aftermath of boxing." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53(5): 373-8.

Roch, J. M., E. Masliah, et al. (1994). "Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16): 7450-4.

Rogaev, E. I., R. Sherrington, et al. (1995). "Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene." *Nature* 376(6543): 775-8.

Rosen, W. G., R. C. Mohs, et al. (1984). "A new rating scale for Alzheimer's disease." *Am J Psychiatry* 141(11): 1356-64.

Ross, S. A. and C. D. Davis (2011). "MicroRNA, nutrition, and cancer prevention." *Adv Nutr* 2(6): 472-85.

Saitoh, T., M. Sundsmo, et al. (1989). "Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts." *Cell* 58(4): 615-22.

Salloway, S., R. Sperling, et al. (2009). "A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease." *Neurology* 73(24): 2061-70.

Sastre, M., J. C. Richardson, et al. (2011). "Inflammatory risk factors and pathologies associated with Alzheimer's disease." *Curr Alzheimer Res* 8(2): 132-41.

Savva, G. M., S. B. Wharton, et al. (2009). "Age, neuropathology, and dementia." *N Engl J Med* 360(22): 2302-9.

Scheff, S. W., D. A. Price, et al. (2006). "Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." *Neurobiol Aging* 27(10): 1372-84.

Schipper, H. M., O. C. Maes, et al. (2007). "MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells." *Gene Regul Syst Bio* 1: 263-74.

Schmechel, D. E., A. M. Saunders, et al. (1993). "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(20): 9649-53.

Schneider, L. S., J. T. Olin, et al. (1997). "Validity and reliability of the Alzheimer's Disease Cooperative Study-Clinical Global Impression of Change. The Alzheimer's Disease Cooperative Study." *Alzheimer Dis Assoc Disord* 11 Suppl 2: S22-32.

Schor, N. F. (2011). "What the halted phase III gamma-secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us." *Ann Neurol* 69(2): 237-9.

Schwarzenbach, H., N. Nishida, et al. (2014). "Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer." *Nat Rev Clin Oncol* 11(3): 145-56.

Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* 298(5594): 789-91.

Sempere, L. F., S. Freemantle, et al. (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." *Genome Biol* 5(3): R13.

Sepramaniam, S., J. R. Tan, et al. (2014). "Circulating microRNAs as biomarkers of acute stroke." *Int J Mol Sci* 15(1): 1418-32.

Shad, K. F., Y. Aghazadeh, et al. (2013). "Peripheral markers of Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells." *Synapse* 67(8): 541-3.

Shankar, G. M., S. Li, et al. (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." *Nat Med* 14(8): 837-42.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, et al. (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." *Nature* 375(6534): 754-60.

Shioya, M., S. Obayashi, et al. (2010). "Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3." *Neuropathol Appl Neurobiol* 36(4): 320-30.

Siegel, G., G. Obernosterer, et al. (2009). "A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis." *Nat Cell Biol* 11(6): 705-16.

Skog, J., T. Wurdinger, et al. (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." *Nat Cell Biol* 10(12): 1470-6.

Slack, F. J., M. Basson, et al. (2000). "The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor." *Mol Cell* 5(4): 659-69.

Smith, C. D., J. M. Carney, et al. (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(23): 10540-3.

Speciale, L., E. Calabrese, et al. (2007). "Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients." *Neurobiol Aging* 28(8): 1163-9.

Sperling, R. (2007). "Functional MRI studies of associative encoding in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 1097: 146-55.

Strassnig, M. y M. Ganguli (2005). "About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited." *Psychiatry (Edgmont)* 2(9): 30-3.

Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, et al. (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1977-81.

Subbarao, K. V., J. S. Richardson, et al. (1990). "Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro." *J Neurochem* 55(1): 342-5.

Sze, C. I., H. Bi, et al. (2000). "Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains." *J Neurol Sci* 175(2): 81-90.

Tambyah, P. A., S. Sepramaniam, et al. (2013). "microRNAs in circulation are altered in response to influenza A virus infection in humans." *PLoS One* 8(10): e76811.

Tan, L., J. T. Yu, et al. (2013). "Circulating miR-125b as a biomarker of Alzheimer's disease." *J Neurol Sci* 336(1-2): 52-6.

Tan, Z. S., S. Seshadri, et al. (2003). "Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study." *Arch Intern Med* 163(9): 1053-7.

Tapiola, T., M. Overmyer, et al. (1997). "The level of cerebrospinal fluid tau correlates with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Neuroreport* 8(18): 3961-3.

Terry, R. D., E. Masliah, et al. (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." *Ann Neurol* 30(4): 572-80.

Terry, R. D., A. Peck, et al. (1981). "Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type." *Ann Neurol* 10(2): 184-92.

Teter, B. y J. W. Ashford (2002). "Neuroplasticity in Alzheimer's disease." *J Neurosci Res* 70(3): 402-37.

Thinakaran, G. y E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." *J Biol Chem* 283(44): 29615-9.

Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* 9(6): 654-9.

- Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* 286(5440): 735-41.
- Vickers, K. C., et al. (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." *Nat Cell Biol* 13(4): 423-33.
- Vilardo, E., C. Barbato, et al. (2010). "MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons." *J Biol Chem* 285(24): 18344-51.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* 416(6880): 535-9.
- Wang, R. T., D. Jin, et al. (2013). "Decreased mean platelet volume and platelet distribution width are associated with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *J Psychiatr Res* 47(5): 644-9.
- Wang, W. X., Q. Huang, et al. (2011). "Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter." *Acta Neuropathol* 121(2): 193-205.
- Wang, W. X., B. W. Rajeev, et al. (2008). "The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1." *J Neurosci* 28(5): 1213-23.
- Wang, X., B. Su, et al. (2009). "The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *J Neurochem* 109 Suppl 1: 153-9.
- Wayman, G. A., M. Davare, et al. (2008). "An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26): 9093-8.
- Welander, H., et al. (2009). "Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains." *J Neurochem* 110(2): 697-706.
- Whitehouse, P. J., D. L. Price, et al. (1982). "Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain." *Science* 215(4537): 1237-9.
- Whitson, J. S., D. J. Selkoe, et al. (1989). "Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro." *Science* 243(4897): 1488-90.
- Xu, J., Q. Chen, et al. (2013). "Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways." *J Neurochem* 124(1): 15-25.
- Yaffe, K., A. Kanaya, et al. (2004). "The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline." *JAMA* 292(18): 2237-42.

ANEXO I

En las siguientes tablas se reportan los promedios de los datos normalizados de cada miRNA con respecto a la secuencia sintética del miR-39 de *C. elegans* ($\Delta Ct = Ct_{miRNA} - Ct_{miR-39}$) con su respectiva desviación estándar, y el resultado de la prueba estadística en la que valores de p menores a 0.05 se consideran indicación de cambios significativos.

Tabla A-1. Comparación entre ratones de 2-3 meses WT y 3xTg-AD.

miRNA	Ratones WT 2-3 meses		Ratones 3xTg-AD 2-3 meses		Razón de cambio	T
	ΔCt	S	ΔCt	s		P
mmu-let-7b-5p	1.10	0.42	0.84	0.57	1.20	0.5409
mmu-let-7c-5p	0.77	0.31	0.51	0.35	1.19	0.3937
mmu-let-7d-5p	2.09	0.42	2.08	0.52	1.01	0.9235
mmu-let-7e-5p	1.64	0.27	1.49	0.24	1.11	0.5267
mmu-let-7i-5p	1.36	0.13	1.12	0.53	1.18	0.4559
mmu-miR-101a-3p	4.05	0.70	3.68	0.52	1.30	0.5752
mmu-miR-101b-3p	3.74	0.65	3.32	0.69	1.34	0.5155
mmu-miR-105	ND		ND			
mmu-miR-106b-5p	0.63	0.18	0.58	0.18	1.04	0.7365
mmu-miR-107-3p	7.96	0.42	7.52	0.55	1.36	0.3016
mmu-miR-124-3p	5.89	1.73	7.20	1.25	0.40	0.3334
mmu-miR-125b-5p	1.34	0.36	0.88	0.62	1.37	0.3146
mmu-miR-126-5p	1.65	0.36	1.40	0.04	1.19	0.2685
mmu-miR-128-3p	4.44	0.23	4.29	0.55	1.11	0.6025
mmu-miR-130a-3p	3.50	0.22	3.17	0.13	1.26	0.0853
mmu-miR-132-3p	5.55	0.34	5.87	0.32	0.80	0.3161
mmu-miR-133b-3p	4.79	0.92	4.88	1.19	0.94	0.9977
mmu-miR-134-5p	8.82	1.05	7.77	0.14	2.06	0.2012
mmu-miR-135b-5p	ND		ND			
mmu-miR-138-5p	5.87	0.46	6.02	0.34	0.90	0.6476
mmu-miR-139-5p	3.39	0.43	3.22	0.45	1.13	0.6607
mmu-miR-140-5p	4.33	0.14	4.21	0.17	1.09	0.4030
mmu-miR-146a-5p	2.59	0.10	2.46	0.22	1.09	0.3957
mmu-miR-146b-5p	4.31	0.46	4.10	0.35	1.16	0.6052
mmu-miR-148b-3p	4.49	0.49	4.48	0.85	1.01	0.8419
mmu-miR-151-3p	5.59	0.25	5.47	0.49	1.09	0.6302
mmu-miR-152-3p	4.87	0.56	4.33	0.72	1.46	0.3434
mmu-miR-15a-5p	2.35	0.37	2.17	0.82	1.13	0.6018

mmu-miR-15b-5p	2.04	0.26	2.01	0.47	1.02	0.8522
mmu-miR-181a-5p	4.54	0.15	4.21	0.98	1.26	0.4646
mmu-miR-181a1-3p	8.98	0.29	9.31	0.78	0.80	0.7035
mmu-miR-181c-5p	4.59	0.11	4.27	0.99	1.25	0.4695
mmu-miR-181d-5p	4.59	0.40	4.32	0.64	1.20	0.5424
mmu-miR-191-5p	1.34	0.14	1.21	0.78	1.09	0.6207
mmu-miR-193b-3p	4.81	0.41	4.50	0.65	1.24	0.5060
mmu-miR-194-5p	2.23	0.24	2.45	0.55	0.86	0.6263
mmu-miR-195a-5p	-2.37	0.08	-2.31	0.16	0.96	0.6394
mmu-miR-19b-3p	1.31	0.37	1.19	0.13	1.09	0.7210
mmu-miR-203-3p	3.63	0.54	2.96	0.48	1.59	0.1881
mmu-miR-20a-5p	0.53	0.04	0.46	0.11	1.05	0.3371
mmu-miR-20b-5p	1.26	0.24	1.28	0.23	0.99	0.9404
mmu-miR-22-3p	-1.05	0.21	-1.33	0.16	1.22	0.1272
mmu-miR-24-3p	-0.66	0.21	-1.05	0.37	1.31	0.1951
mmu-miR-26b-5p	1.40	0.30	1.16	0.25	1.19	0.3579
mmu-miR-27a-3p	-0.25	0.20	-0.71	0.38	1.37	0.1689
mmu-miR-28c	7.64	0.47	7.54	0.54	1.08	0.7921
mmu-miR-298-5p	8.16	0.72	7.37	0.87	1.74	0.3080
mmu-miR-29a-3p	-0.16	0.13	-0.50	0.36	1.26	0.2195
mmu-miR-29b-3p	3.01	0.39	2.54	0.05	1.39	0.1023
mmu-miR-29c-3p	-0.12	0.05	-0.39	0.18	1.20	0.0761
mmu-miR-302a-5p	ND		ND			
mmu-miR-302b-5p	ND		ND			
mmu-miR-30a-5p	0.20	0.11	0.04	0.39	1.12	0.4887
mmu-miR-30d-5p	1.48	0.09	1.48	0.44	1.01	0.8531
mmu-miR-30e-5p	0.23	0.08	0.19	0.20	1.03	0.7153
mmu-miR-320-3p	2.71	0.45	2.40	0.44	1.24	0.4361
mmu-miR-328-3p	3.53	0.43	3.34	1.05	1.15	0.6047
mmu-miR-33-5p	6.40	1.66	5.94	0.62	1.37	0.9111
mmu-miR-337-3p	7.21	0.59	6.82	0.28	1.31	0.3776
mmu-miR-338-3p	7.23	0.25	6.57	0.29	1.59	0.0503
mmu-miR-339-5p	4.10	0.44	3.94	0.72	1.11	0.6576
mmu-miR-342-3p	2.32	0.36	2.40	0.58	0.95	0.9479
mmu-miR-346-5p	9.61	0.48	8.86	0.74	1.68	0.2700
mmu-miR-34a-5p	6.08	0.54	5.84	0.43	1.18	0.6239
mmu-miR-376b-3p	8.41	0.56	7.29	0.42	2.18	0.0519
mmu-miR-381-3p	9.60	0.78	8.41	0.43	2.28	0.0619
mmu-miR-409-3p	8.67	0.71	8.56	0.46	1.08	0.8998
mmu-miR-431-5p	8.78	0.70	8.34	0.20	1.36	0.4337
mmu-miR-433-3p	8.87	0.55	7.97	0.27	1.87	0.0595

mmu-miR-455-5p	7.47	0.52	6.81	0.35	1.59	0.1421
mmu-miR-484	1.81	0.22	1.49	0.58	1.26	0.3886
mmu-miR-485-5p	11.28	0.85	10.64	0.27	1.56	0.2342
mmu-miR-485-3p	8.87	0.51	8.14	0.38	1.67	0.1213
mmu-miR-488-3p	ND		ND			
mmu-miR-489-3p	11.98	1.44	10.90	0.80	2.12	0.4428
mmu-miR-509-3p	ND		ND			
mmu-miR-598-3p	9.56	0.78	8.81	1.10	1.69	0.3714
mmu-miR-652-3p	3.96	0.38	3.94	0.58	1.02	0.8660
mmu-miR-7a-5p	6.10	0.29	6.33	0.10	0.86	0.2847
mmu-miR-9-5p	10.23	1.19	11.61	1.24	0.38	0.2963
mmu-miR-9-3p	ND		ND			
mmu-miR-92a-3p	0.11	0.41	-0.15	0.76	1.20	0.5450
mmu-miR-93-5p	0.68	0.25	0.72	0.63	0.98	0.9159
mmu-miR-98-5p	7.18	0.62	7.44	0.61	0.83	0.5904

Tabla A-2. Comparación entre ratones WT de 2-3 meses y 14-15 meses.

miRNA	Ratones WT 2-3 meses		Ratones WT 14-15 meses		Razón de cambio	T
	ΔCt	S	ΔCt	s		P
mmu-let-7b-5p	1.10	0.42	1.88	0.19	0.58	0.0683
mmu-let-7c-5p	0.77	0.31	1.39	0.15	0.65	0.0464
mmu-let-7d-5p	2.09	0.42	3.58	0.39	0.36	0.0196
mmu-let-7e-5p	1.64	0.27	2.77	0.21	0.46	0.0108
mmu-let-7i-5p	1.36	0.13	2.48	0.49	0.46	0.0067
mmu-miR-101a-3p	4.05	0.70	4.51	0.70	0.73	0.5039
mmu-miR-101b-3p	3.74	0.65	4.36	0.76	0.65	0.4005
mmu-miR-105	ND		ND			
mmu-miR-106b-5p	0.63	0.18	1.56	0.45	0.52	0.0202
mmu-miR-107-3p	7.96	0.42	8.58	0.38	0.65	0.1497
mmu-miR-124-3p	5.89	1.73	6.28	1.54	0.76	0.6750
mmu-miR-125b-5p	1.34	0.36	2.07	0.32	0.60	0.0808
mmu-miR-126-5p	1.65	0.36	2.55	0.38	0.54	0.0440
mmu-miR-128-3p	4.44	0.23	4.70	0.30	0.84	0.2978
mmu-miR-130a-3p	3.50	0.22	4.14	0.16	0.64	0.0226
mmu-miR-132-3p	5.55	0.34	5.97	0.16	0.74	0.1443
mmu-miR-133b-3p	4.79	0.92	6.04	1.74	0.42	0.4134
mmu-miR-134-5p	8.82	1.05	11.04	0.61	0.21	0.1509
mmu-miR-135b-5p	ND		ND			
mmu-miR-138-5p	5.87	0.46	6.01	0.47	0.91	0.7196

mmu-miR-139-5p	3.39	0.43	3.47	0.09	0.94	0.6656
mmu-miR-140-5p	4.33	0.14	5.52	0.30	0.44	0.0023
mmu-miR-146a-5p	2.59	0.10	2.32	0.07	1.21	0.0205
mmu-miR-146b-5p	4.31	0.46	3.96	0.19	1.27	0.3394
mmu-miR-148b-3p	4.49	0.49	5.45	0.63	0.51	0.1223
mmu-miR-151-3p	5.59	0.25	6.14	0.17	0.68	0.0452
mmu-miR-152-3p	4.87	0.56	5.76	0.54	0.54	0.1199
mmu-miR-15a-5p	2.35	0.37	4.26	0.71	0.26	0.0128
mmu-miR-15b-5p	2.04	0.26	2.95	0.44	0.53	0.0357
mmu-miR-181a-5p	4.54	0.15	5.93	0.37	0.38	0.0017
mmu-miR-181a1-3p	8.98	0.29	11.09	0.58	0.23	0.0036
mmu-miR-181c-5p	4.59	0.11	6.09	0.44	0.35	0.0010
mmu-miR-181d-5p	4.59	0.40	5.65	0.17	0.48	0.0360
mmu-miR-191-5p	1.34	0.14	1.78	0.25	0.74	0.0450
mmu-miR-193b-3p	4.81	0.41	5.91	0.20	0.47	0.0378
mmu-miR-194-5p	2.23	0.24	3.52	0.37	0.41	0.0067
mmu-miR-195a-5p	-2.37	0.08	-1.08	0.19	0.41	0.0002
mmu-miR-19b-3p	1.31	0.37	1.65	0.53	0.79	0.4678
mmu-miR-203-3p	3.63	0.54	3.07	0.55	1.47	0.2383
mmu-miR-20a-5p	0.53	0.04	1.29	0.46	0.59	0.0295
mmu-miR-20b-5p	1.26	0.24	2.41	0.37	0.45	0.0088
mmu-miR-22-3p	-1.05	0.21	-0.70	0.14	0.79	0.0786
mmu-miR-24-3p	-0.66	0.21	-0.57	0.16	0.94	0.5654
mmu-miR-26b-5p	1.40	0.30	2.70	0.56	0.41	0.0227
mmu-miR-27a-3p	-0.25	0.20	-0.33	0.50	1.06	0.7004
mmu-miR-28c	7.64	0.47	9.03	0.52	0.38	0.0468
mmu-miR-298-5p	8.16	0.72	10.18	0.26	0.25	0.0701
mmu-miR-29a-3p	-0.16	0.13	0.00	0.26	0.90	0.4250
mmu-miR-29b-3p	3.01	0.39	3.64	0.44	0.65	0.1678
mmu-miR-29c-3p	-0.12	0.05	0.08	0.25	0.87	0.2721
mmu-miR-302a-5p	ND		ND			
mmu-miR-302b-5p	ND		ND			
mmu-miR-30a-5p	0.20	0.11	0.78	0.06	0.67	0.0022
mmu-miR-30d-5p	1.48	0.09	1.99	0.20	0.70	0.0108
mmu-miR-30e-5p	0.23	0.08	0.88	0.14	0.64	0.0020
mmu-miR-320-3p	2.71	0.45	3.23	0.26	0.70	0.1462
mmu-miR-328-3p	3.53	0.43	3.97	0.45	0.74	0.2878
mmu-miR-33-5p	6.40	1.66	7.17	0.97	0.59	0.4575
mmu-miR-337-3p	7.21	0.59	9.41	0.62	0.22	0.0266
mmu-miR-338-3p	7.23	0.25	7.17	0.60	1.04	0.7619
mmu-miR-339-5p	4.10	0.44	4.65	0.29	0.68	0.1374

mmu-miR-342-3p	2.32	0.36	2.59	0.50	0.83	0.4672
mmu-miR-346-5p	9.61	0.48	10.87	0.40	0.42	0.0548
mmu-miR-34a-5p	6.08	0.54	5.94	0.41	1.10	0.8065
mmu-miR-376b-3p	8.41	0.56	9.42	0.59	0.50	0.1097
mmu-miR-381-3p	9.60	0.78	11.12	1.15	0.35	0.1349
mmu-miR-409-3p	8.67	0.71	10.38	0.53	0.30	0.0456
mmu-miR-431-5p	8.78	0.70	9.93	0.79	0.45	0.1555
mmu-miR-433-3p	8.87	0.55	9.00	0.60	0.91	0.7956
mmu-miR-455-5p	7.47	0.52	9.49	0.15	0.25	0.0248
mmu-miR-484	1.81	0.22	1.85	0.36	0.97	0.9258
mmu-miR-485-5p	11.28	0.85	12.24	0.52	0.52	0.1472
mmu-miR-485-3p	8.87	0.51	9.90	0.20	0.49	0.0753
mmu-miR-488-3p	ND		ND			
mmu-miR-489-3p	11.98	1.44	ND			
mmu-miR-509-3p	ND		ND			
mmu-miR-598-3p	9.56	0.78	9.61	0.38	0.97	0.7795
mmu-miR-652-3p	3.96	0.38	4.36	0.27	0.76	0.1955
mmu-miR-7a-5p	6.10	0.29	7.09	0.24	0.51	0.0193
mmu-miR-9-5p	10.23	1.19	ND			
mmu-miR-9-3p	ND		ND			
mmu-miR-92a-3p	0.11	0.41	0.64	0.43	0.69	0.1854
mmu-miR-93-5p	0.68	0.25	1.74	0.27	0.48	0.0112
mmu-miR-98-5p	7.18	0.62	9.48	1.20	0.20	0.0302

Tabla A-3. Comparación entre ratones 3xTg-AD de 2-3 meses y 14-15 meses.

miRNA	Ratones 3xTg-AD 2-3 meses		Ratones 3xTg-AD 14-15 meses		Razón de cambio	T
	Δ Ct	s	Δ Ct	s		P
mmu-let-7b-5p	0.84	0.57	1.75	0.30	0.53	0.1252
mmu-let-7c-5p	0.51	0.35	1.62	0.40	0.46	0.0294
mmu-let-7d-5p	2.08	0.52	3.51	0.63	0.37	0.0546
mmu-let-7e-5p	1.49	0.24	2.84	0.52	0.39	0.0102
mmu-let-7i-5p	1.12	0.53	2.64	0.47	0.35	0.0499
mmu-miR-101a-3p	3.68	0.52	5.43	0.45	0.30	0.0374
mmu-miR-101b-3p	3.32	0.69	5.35	0.36	0.24	0.0642
mmu-miR-105	ND		ND			
mmu-miR-106b-5p	0.58	0.18	1.61	0.39	0.49	0.0083
mmu-miR-107-3p	7.52	0.55	8.69	0.68	0.44	0.0724
mmu-miR-124-3p	7.20	1.25	8.40	0.97	0.44	0.3257
mmu-miR-125b-5p	0.88	0.62	2.64	0.19	0.30	0.0383

mmu-miR-126-5p	1.40	0.04	2.89	0.55	0.35	0.0011
mmu-miR-128-3p	4.29	0.55	4.80	0.24	0.70	0.2491
mmu-miR-130a-3p	3.17	0.13	4.09	0.65	0.53	0.0369
mmu-miR-132-3p	5.87	0.32	7.01	0.08	0.45	0.0141
mmu-miR-133b-3p	4.88	1.19	5.95	0.74	0.48	0.2609
mmu-miR-134-5p	7.77	0.14	10.34	0.50	0.17	0.0003
mmu-miR-135b-5p	ND		ND			
mmu-miR-138-5p	6.02	0.34	7.05	0.07	0.49	0.0214
mmu-miR-139-5p	3.22	0.45	4.03	0.24	0.57	0.0835
mmu-miR-140-5p	4.21	0.17	5.41	0.45	0.43	0.0079
mmu-miR-146a-5p	2.46	0.22	3.48	0.32	0.49	0.0089
mmu-miR-146b-5p	4.10	0.35	5.25	0.44	0.45	0.0255
mmu-miR-148b-3p	4.48	0.85	6.01	0.41	0.35	0.1399
mmu-miR-151-3p	5.47	0.49	6.37	0.22	0.54	0.0656
mmu-miR-152-3p	4.33	0.72	6.47	0.48	0.23	0.0547
mmu-miR-15a-5p	2.17	0.82	3.86	0.49	0.31	0.0900
mmu-miR-15b-5p	2.01	0.47	3.34	0.52	0.40	0.0512
mmu-miR-181a-5p	4.21	0.98	5.88	0.27	0.31	0.1377
mmu-miR-181a1-3p	9.31	0.78	11.13	0.71	0.28	0.1053
mmu-miR-181c-5p	4.27	0.99	6.09	0.83	0.28	0.1404
mmu-miR-181d-5p	4.32	0.64	5.72	0.33	0.38	0.0838
mmu-miR-191-5p	1.21	0.78	1.84	0.20	0.65	0.2624
mmu-miR-193b-3p	4.50	0.65	5.71	0.20	0.43	0.1043
mmu-miR-194-5p	2.45	0.55	3.82	0.51	0.39	0.0467
mmu-miR-195a-5p	-2.31	0.16	-1.15	0.39	0.45	0.0058
mmu-miR-19b-3p	1.19	0.13	1.99	0.30	0.58	0.0094
mmu-miR-203-3p	2.96	0.48	3.68	0.73	0.61	0.2435
mmu-miR-20a-5p	0.46	0.11	1.47	0.45	0.50	0.0103
mmu-miR-20b-5p	1.28	0.23	2.58	0.62	0.41	0.0142
mmu-miR-22-3p	-1.33	0.16	-0.30	0.19	0.49	0.0022
mmu-miR-24-3p	-1.05	0.37	-0.08	0.15	0.51	0.0277
mmu-miR-26b-5p	1.16	0.25	3.04	0.28	0.27	0.0024
mmu-miR-27a-3p	-0.71	0.38	0.53	0.24	0.42	0.0241
mmu-miR-28c	7.54	0.54	9.21	0.48	0.31	0.0290
mmu-miR-298-5p	7.37	0.87	8.54	1.17	0.44	0.2482
mmu-miR-29a-3p	-0.50	0.36	0.73	0.15	0.43	0.0180
mmu-miR-29b-3p	2.54	0.05	3.98	0.18	0.37	0.00005
mmu-miR-29c-3p	-0.39	0.18	0.95	0.17	0.39	0.0013
mmu-miR-302a-5p	ND		ND			
mmu-miR-302b-5p	ND		ND			
mmu-miR-30a-5p	0.04	0.39	0.99	0.16	0.52	0.0419

mmu-miR-30d-5p	1.48	0.44	2.21	0.22	0.60	0.0778
mmu-miR-30e-5p	0.19	0.20	1.03	0.16	0.56	0.0065
mmu-miR-320-3p	2.40	0.44	3.42	0.09	0.49	0.0522
mmu-miR-328-3p	3.34	1.05	3.68	0.15	0.79	0.4688
mmu-miR-33-5p	5.94	0.62	7.36	0.42	0.37	0.0510
mmu-miR-337-3p	6.82	0.28	9.28	0.85	0.18	0.0029
mmu-miR-338-3p	6.57	0.29	7.56	0.61	0.50	0.0481
mmu-miR-339-5p	3.94	0.72	4.38	0.29	0.74	0.3384
mmu-miR-342-3p	2.40	0.58	3.18	0.12	0.58	0.1397
mmu-miR-346-5p	8.86	0.74	9.31	0.49	0.73	0.4292
mmu-miR-34a-5p	5.84	0.43	6.92	0.39	0.47	0.0388
mmu-miR-376b-3p	7.29	0.42	9.97	0.10	0.16	0.0072
mmu-miR-381-3p	8.41	0.43	10.58	0.28	0.22	0.0108
mmu-miR-409-3p	8.56	0.46	10.15	0.33	0.33	0.0195
mmu-miR-431-5p	8.34	0.20	9.59	0.49	0.42	0.0072
mmu-miR-433-3p	7.97	0.27	8.76	0.17	0.58	0.0208
mmu-miR-455-5p	6.81	0.35	9.79	0.69	0.13	0.0033
mmu-miR-484	1.49	0.58	2.10	0.13	0.65	0.1907
mmu-miR-485-5p	10.64	0.27	12.23	1.61	0.33	0.1515
mmu-miR-485-3p	8.14	0.38	9.37	0.61	0.42	0.0319
mmu-miR-488-3p	ND		ND			
mmu-miR-489-3p	10.90	0.80	ND			
mmu-miR-509-3p	ND		ND			
mmu-miR-598-3p	8.81	1.10	9.94	0.36	0.46	0.2134
mmu-miR-652-3p	3.94	0.58	4.78	0.18	0.56	0.1176
mmu-miR-7a-5p	6.33	0.10	7.97	0.69	0.32	0.0043
mmu-miR-9-5p	11.61	1.24	ND			
mmu-miR-9-3p	ND		ND			
mmu-miR-92a-3p	-0.15	0.76	0.64	0.14	0.58	0.2055
mmu-miR-93-5p	0.72	0.63	1.59	0.56	0.55	0.1558
mmu-miR-98-5p	7.44	0.61	8.87	1.82	0.37	0.3524

Tabla A-4. Comparación entre ratones de 14-15 meses WT y 3xTg-AD.

miRNA	Ratones WT 14-15 meses		Ratones 3xTg-AD 14-15 meses		Razón de cambio	T
	Δ Ct	s	Δ Ct	s		P
mmu-let-7b-5p	1.88	0.19	1.75	0.30	1.10	0.5296
mmu-let-7c-5p	1.39	0.15	1.62	0.40	0.85	0.4391
mmu-let-7d-5p	3.58	0.39	3.51	0.63	1.05	0.7847
mmu-let-7e-5p	2.77	0.21	2.84	0.52	0.95	0.9654

mmu-let-7i-5p	2.48	0.49	2.64	0.47	0.90	0.6891
mmu-miR-101a-3p	4.51	0.70	5.43	0.45	0.53	0.1883
mmu-miR-101b-3p	4.36	0.76	5.35	0.36	0.50	0.1802
mmu-miR-105	ND		ND			
mmu-miR-106b-5p	1.56	0.45	1.61	0.39	0.97	0.8650
mmu-miR-107-3p	8.58	0.38	8.69	0.68	0.92	0.9141
mmu-miR-124-3p	6.28	1.54	8.40	0.97	0.23	0.1855
mmu-miR-125b-5p	2.07	0.32	2.64	0.19	0.67	0.0742
mmu-miR-126-5p	2.55	0.38	2.89	0.55	0.79	0.4359
mmu-miR-128-3p	4.70	0.30	4.80	0.24	0.94	0.6600
mmu-miR-130a-3p	4.14	0.16	4.09	0.65	1.04	0.7293
mmu-miR-132-3p	5.97	0.16	7.01	0.08	0.49	0.0013
mmu-miR-133b-3p	6.04	1.74	5.95	0.74	1.06	0.7261
mmu-miR-134-5p	11.04	0.61	10.34	0.50	1.63	0.2253
mmu-miR-135b-5p	ND		ND			
mmu-miR-138-5p	6.01	0.47	7.05	0.07	0.49	0.0370
mmu-miR-139-5p	3.47	0.09	4.03	0.24	0.68	0.0117
mmu-miR-140-5p	5.52	0.30	5.41	0.45	1.08	0.7126
mmu-miR-146a-5p	2.32	0.07	3.48	0.32	0.45	0.0009
mmu-miR-146b-5p	3.96	0.19	5.25	0.44	0.41	0.0053
mmu-miR-148b-3p	5.45	0.63	6.01	0.41	0.68	0.3085
mmu-miR-151-3p	6.14	0.17	6.37	0.22	0.86	0.2370
mmu-miR-152-3p	5.76	0.54	6.47	0.48	0.61	0.2067
mmu-miR-15a-5p	4.26	0.71	3.86	0.49	1.33	0.5493
mmu-miR-15b-5p	2.95	0.44	3.34	0.52	0.76	0.4197
mmu-miR-181a-5p	5.93	0.37	5.88	0.27	1.04	0.8852
mmu-miR-181a1-3p	11.09	0.58	11.13	0.71	0.97	0.9900
mmu-miR-181c-5p	6.09	0.44	6.09	0.83	1.00	0.8468
mmu-miR-181d-5p	5.65	0.17	5.72	0.33	0.96	0.8468
mmu-miR-191-5p	1.78	0.25	1.84	0.20	0.96	0.7377
mmu-miR-193b-3p	5.91	0.20	5.71	0.20	1.15	0.2810
mmu-miR-194-5p	3.52	0.37	3.82	0.51	0.81	0.5062
mmu-miR-195a-5p	-1.08	0.19	-1.15	0.39	1.05	0.7251
mmu-miR-19b-3p	1.65	0.53	1.99	0.30	0.79	0.3856
mmu-miR-203-3p	3.07	0.55	3.68	0.73	0.66	0.3073
mmu-miR-20a-5p	1.29	0.46	1.47	0.45	0.88	0.6681
mmu-miR-20b-5p	2.41	0.37	2.58	0.62	0.89	0.7911
mmu-miR-22-3p	-0.70	0.14	-0.30	0.19	0.75	0.0374
mmu-miR-24-3p	-0.57	0.16	-0.08	0.15	0.71	0.0206
mmu-miR-26b-5p	2.70	0.56	3.04	0.28	0.79	0.4041
mmu-miR-27a-3p	-0.33	0.50	0.53	0.24	0.55	0.0833


mmu-miR-28c	9.03	0.52	9.21	0.48	0.88	0.6738
mmu-miR-298-5p	10.18	0.26	8.54	1.17	3.12	0.1440
mmu-miR-29a-3p	0.00	0.26	0.73	0.15	0.60	0.0234
mmu-miR-29b-3p	3.64	0.44	3.98	0.18	0.79	0.3017
mmu-miR-29c-3p	0.08	0.25	0.95	0.17	0.54	0.0148
mmu-miR-302a-5p	ND		ND			
mmu-miR-302b-5p	ND		ND			
mmu-miR-30a-5p	0.78	0.06	0.99	0.16	0.87	0.0920
mmu-miR-30d-5p	1.99	0.20	2.21	0.22	0.86	0.2632
mmu-miR-30e-5p	0.88	0.14	1.03	0.16	0.90	0.2838
mmu-miR-320-3p	3.23	0.26	3.42	0.09	0.88	0.2912
mmu-miR-328-3p	3.97	0.45	3.68	0.15	1.22	0.3564
mmu-miR-33-5p	7.17	0.97	7.36	0.42	0.87	0.6134
mmu-miR-337-3p	9.41	0.62	9.28	0.85	1.10	0.7484
mmu-miR-338-3p	7.17	0.60	7.56	0.61	0.76	0.4692
mmu-miR-339-5p	4.65	0.29	4.38	0.29	1.21	0.3054
mmu-miR-342-3p	2.59	0.50	3.18	0.12	0.67	0.1188
mmu-miR-346-5p	10.87	0.40	9.31	0.49	2.93	0.0379
mmu-miR-34a-5p	5.94	0.41	6.92	0.39	0.51	0.0580
mmu-miR-376b-3p	9.42	0.59	9.97	0.10	0.68	0.2400
mmu-miR-381-3p	11.12	1.15	10.58	0.28	1.45	0.7456
mmu-miR-409-3p	10.38	0.53	10.15	0.33	1.18	0.6135
mmu-miR-431-5p	9.93	0.79	9.59	0.49	1.27	0.6164
mmu-miR-433-3p	9.00	0.60	8.76	0.17	1.19	0.5922
mmu-miR-455-5p	9.49	0.15	9.79	0.69	0.81	0.6637
mmu-miR-484	1.85	0.36	2.10	0.13	0.84	0.2865
mmu-miR-485-5p	12.24	0.52	12.23	1.61	1.01	0.6410
mmu-miR-485-3p	9.90	0.20	9.37	0.61	1.44	0.1965
mmu-miR-488-3p	ND		ND			
mmu-miR-489-3p	ND		ND			
mmu-miR-509-3p	ND		ND			
mmu-miR-598-3p	9.61	0.38	9.94	0.36	0.79	0.2993
mmu-miR-652-3p	4.36	0.27	4.78	0.18	0.75	0.0903
mmu-miR-7a-5p	7.09	0.24	7.97	0.69	0.54	0.1081
mmu-miR-9-5p	ND		ND			
mmu-miR-9-3p	ND		ND			
mmu-miR-92a-3p	0.64	0.43	0.64	0.14	1.00	0.9015
mmu-miR-93-5p	1.74	0.27	1.59	0.56	1.11	0.6123
mmu-miR-98-5p	9.48	1.20	8.87	1.82	1.53	0.4681

ANEXO II

Durante los estudios de la Maestría en Ciencias Bioquímicas se trabajó en la investigación, diseño y escritura de un artículo de revisión. Dicho trabajo, en conjunto con una serie de datos experimentales del laboratorio, resultó en una publicación que se muestra a continuación. Cabe mencionar que en el artículo siguiente se abordan temas relacionados con el proyecto, sin embargo, no forma parte de la Tesis de Maestría, ni contiene lo expuesto en el presente trabajo escrito.

ARTICLE IN PRESS

BRAIN RESEARCH ■ (■■■■) ■■■-■■■



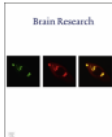
ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease

Sylvia Garza-Manero^a, Israel Pichardo-Casas^{b,1}, Clorinda Arias^a, Luis Vaca^b, Angélica Zepeda^{a,*}

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, México, DF, Mexico
^bInstituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510 México, DF, Mexico

<p>ARTICLE INFO</p> <p>Article history: Accepted 7 December 2013</p> <p>Keywords: Neurodegeneration Posttranscriptional modification Brain Hippocampus Synaptoneurosome</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that control a wide range of functions in the cell. They act as post-transcriptional gene regulators throughout in development and in adulthood, although recent evidence suggests their potential role in the onset and development of various diseases and neuropathologies. In neurons miRNAs seem to play a key role as regulators of synaptic function. Synapses are vulnerable structures in neurodegenerative diseases. In particular, synaptic loss has been described as an early event in the pathogenesis of Alzheimer's Disease (AD). MicroRNA-mediated gene silencing represents a candidate event for the repression of specific mRNAs and protein synthesis that could account for synaptic dysfunction. In this work, we review the participation of miRNAs in synaptic function and consider their possible role in synaptic alterations in AD. First we review the biogenesis of miRNAs and their role as post-transcriptional regulators.</p> <p>Abbreviations: 3' UTR, 3' untranslated region; AGO, Argonaute; Ago1/2, Argonaute 1/2; APT1, acyl protein thioesterase 1; Arc, activity-regulated cytoskeleton associated protein; Bs, brain stem; CamKIIα, calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIα; Cb, cerebellum; Ce, cerebrum; Cx, cortex; DGCR8, Di George Syndrome Critical Region 8; DHX36, dead box protein 36; dl-P-body, dendritic P-body-like; eIF4E, eukaryotic translation initiation factor 4E; Exp5, exportin 5; FMRP, fragile X mental retardation protein; GAP, GTPase activating protein; GAP-43, growth associated protein 43; Hp, hippocampus; KA, kainic acid; LimK1, LIM domain kinase 1; MeCP2, methyl CpG binding protein 2; MEF2, myocyte enhancer factor 2; mGluR5, metabotropic glutamate receptor 5; MOV10, moloney leukemia virus 10; miRISC, miRNA-RNAi-induced silencing complex; MVB, multivesicular body; ncRNA, non-coding RNA; NR2A, N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A; nt, nucleotide; Ob, olfactory bulb; PAK, p21-activated kinase; PAZ domain, piwi Argonaute and zwiille domain; P-body, processing body; Pol, polymerase; pre-miRNA, precursor miRNA; pri-miRNA, primary miRNA; PSD-95, postsynaptic density protein 95; Rac1, ras-related G3 botulinum toxin substrate 1; RBP, RNA binding protein; RhoA, ras homolog gene family member A; RLC, RISC loading complex; RISC, RNAi-induced silencing complex; RNAi, RNA interference; RNP, ribonucleoprotein; SCo, synaptoneurosome fraction of cerebrum; SIRT1, NAD-dependent deacetylase sirtuin-1; SN, synaptoneurosome fraction; SNAP-25, synaptosomal-associated protein 25; TRBP, TAR-RNA binding protein; TUT4, terminal uridylyl transferase 4</p> <p>*Corresponding author. E-mail addresses: sylgzmn@hotmail.com (S. Garza-Manero), Israel_Pichardo@hms.harvard.edu (I. Pichardo-Casas), lvaca@ic.unam.mx (C. Arias), carias@unam.mx (L. Vaca), azepeda@biomedicas.unam.mx (A. Zepeda). ¹Present address: Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.</p>
---	---

0006-8993/\$ - see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

Hyperexcitation
Neural plasticity

Then we discuss recently published data on the distribution of miRNAs in the brain as well as their role in dynamic regulation at the synapse. In the second part, we briefly introduce the reader to AD, focusing on synaptic alterations in the progression of the pathology. Then we discuss possible implications of miRNAs in the associated synaptic dysfunction.

This article is part of a Special Issue entitled RNA Metabolism 2013.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

MicroRNAs are a form of small, endogenous, non-coding RNAs (ncRNAs), 19–22 nucleotides in length (in their mature form), which are transcribed from large precursors at the cell nucleus. They were first described in 1993 by the group of Victor Ambros while studying *C. elegans* development (Lee et al., 1993). They have now been found in almost all animals and plants, representing about 4% of the genes. In humans, more than 30,000 miRNAs have been identified (miRBase), 50% of which are expressed in the brain (Hu et al., 2011; Landgraf et al., 2007). miRNAs mediate post-transcriptional gene silencing in cells via the RNA interference (RNAi) pathway. By binding to a target mRNA, miRNAs can lead to the down-regulation of its target mRNA translation, or to its target degradation or translational repression (Filipowicz et al., 2005; Landgraf et al., 2007). It is a well established mechanism of post-transcriptional gene regulation, differing from classical epigenetic mechanisms of gene silencing since it does not rely on DNA methylation, histone modifications, or chromatin structure changes (for a review, see Chuang and Jones (2007)).

In the following years after their discovery, miRNAs were shown to play key roles in several processes including apoptosis, proliferation and differentiation in both healthy and pathological states (Ambros, 2004; Landgraf et al., 2007). There is now extensive literature that correlates particular miRNAs up- and down-regulation with the onset and further development of different pathologies. More recently their role in neurodegenerative diseases has received close attention (Junker, 2011; Nelson and Wang, 2010).

miRNAs are differentially distributed within the brain and are compartmentalized in the neuron. Interestingly, a subset of them is highly enriched in the synapse (Kye et al., 2007; Lugli et al., 2008; Rajasethupathy et al., 2009; Smalheiser and Lugli, 2009; Pichardo-Casas et al., 2012). In the adult brain, miRNAs have been suggested to regulate the translation of proteins needed for neurite outgrowth, synaptogenesis and activity-driven synaptic plasticity (Schratt et al., 2006; Siegel et al., 2009; Fiore et al., 2009; Gao et al., 2010; Lippi et al., 2011; Saba et al., 2012). Therefore, the presence of miRNAs and the miRNA machinery in synapses raise interesting questions concerning the role of these molecules in synaptic alterations that occur in pathological states.

In particular, Alzheimer's Disease (AD) is the most common cause of dementia clinically characterized by the progressive loss of memory. Interestingly, synaptic alterations in memory-associated regions constitute the main early manifestation of the disease.

Consolidation of new memories requires long-term changes at the level of synapses in specific brain structures

such as the hippocampus, the entorhinal cortex and other association cortices. These changes include morphological remodeling and functional adaptations of the synapses that lead to connectivity modifications. Thus, understanding if miRNA mediated silencing contributes to the progressive synaptic dysfunction observed in AD would help uncover their contribution in this devastating neurodegeneration.

2. Biogenesis of miRNAs and their role as posttranscriptional regulators

The microRNA pathway represents a highly specific and tunable mechanism of gene expression that modifies entire sets of transcripts under specific time frames (Gurtan and Sharp, 2013). miRNA effectors consist of single-stranded non-coding RNAs 19–22 nt long, that bind to a mRNA target through imperfect Watson-Crick base pairing. They typically bind to the mRNA 3' untranslated regions (3' UTRs) (Bartel, 2009) although they may bind to other regions as well (Chi et al., 2009; Helwak et al., 2013; Orom et al., 2008). They block translation initiation and elongation simultaneously, and ultimately they induce the decay of the target gene (Doench and Sharp, 2004; Fabian et al., 2010).

The biogenesis of miRNAs occurs in several stages (Fig. 1). Most miRNAs undergo a two-step maturation process that begins in the cell nucleus. miRNAs are initially transcribed from long (>1 kb) endogenous precursors called primary miRNAs (pri-miRNAs) that are driven by RNA Pol II promoters (reviewed in Ameres and Zamore (2013) and Yates et al. (2013)).

Pri-miRNAs may have several kilobases in length, showing complex secondary hairpin-loop structures. They are substrate of a protein complex called the microprocessor, which comprises the RNase type III Drosha (the *Drosophila* homolog of RNASEN in humans) and the protein Pasha (Di George Syndrome Critical Region 8, DGCR8 in humans). This protein binds to the single-stranded RNA junction at the base of the pri-miRNA, positioning Drosha to cleave at 11 nt away from the center. This step releases the hairpin (now known as pre-miRNA) usually 60–80 nt in length, which bears a two-nucleotide overhang at the 3' end, a mark left by the Drosha processing. Then, after recognizing the precursors by their overhangs, the GTPase-dependent Ran-Exp5 complex exports the pre-miRNAs out of the nucleus.

In the second stage of maturation, cleavage of the pre-miRNAs takes place in the cytosol once they have been loaded onto the Dicer-TRBP (TAR-RNA binding protein) complex, which removes the loop from the pre-miRNA. TRBP serves as a guide to Dicer, as it positions itself on the loop of the pre-miRNA and sets the size limit of the mature miRNA

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

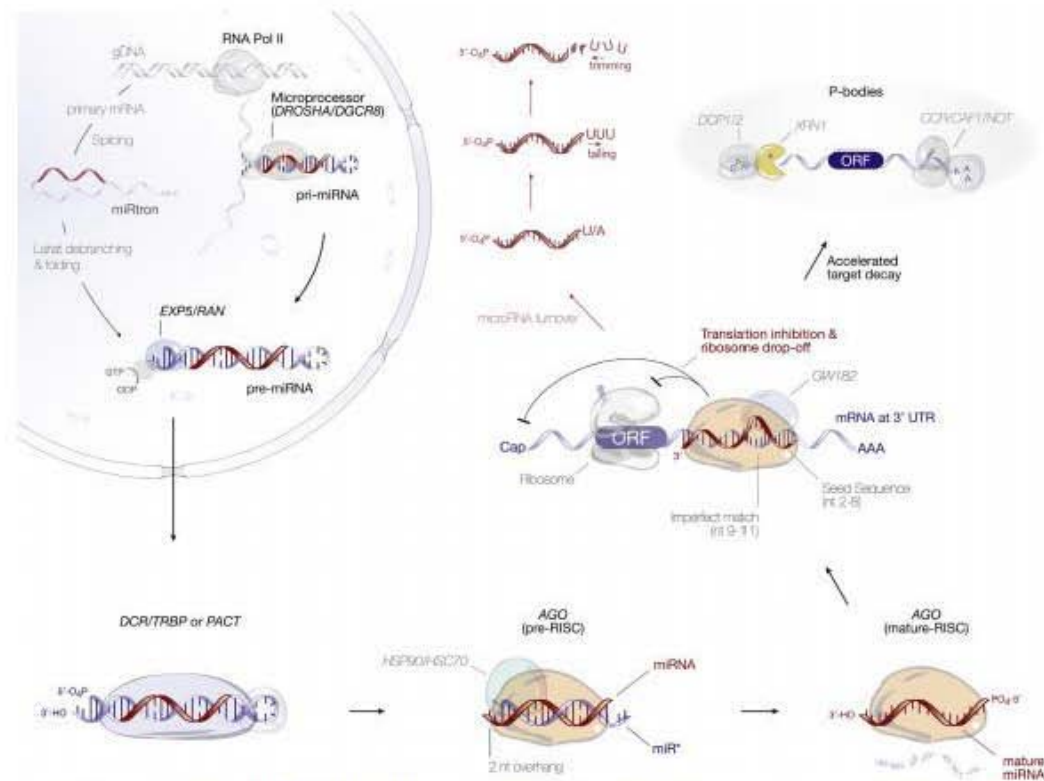


Fig. 1 – Biogenesis of microRNAs in humans. The standard miRNA processing pathway starts in the cell nucleus and involves transcription by the RNAPol II complex and cleavage of the pri-miRNA (> 1 kb) by the microprocessor (Drosha/DGCR8). The microprocessor releases an imperfectly matched stem-loop structure, the pre-miRNA (~60–80 nt) that is carried outside the nucleus and into the cytoplasm by the tripartite Exportin5/RAN/GTP complex (right). The alternative pathway requires splicing out of the microRNAs from introns located in other genes, then further lariat processing, and finally proper folding into a pre-miRNA structure (left). This processing mechanism has not been clearly elucidated to this date. In the cytoplasm, Dicer in association with TRBP or PACT releases an imperfectly matched dsRNA duplex bearing a 2 nt overhang at the 3' of each strand. The duplex is loaded into the RNAi-induced silencing complex (RISC), which contains Argonaute proteins (AGO) as its core. The HSP90/HSC70 chaperone complex participates in this stage. The RISC retains the strand with a 5' end bearing the least free energy, and the other (miR* or passenger) strand is degraded. Then the mature RISC, loaded with a fully mature single-stranded miRNA (19–22 nt), binds canonically to non-fully complementary mRNA targets at their 3' untranslated regions (UTR). This interaction requires full pairing at the seed sequence (nucleotides 2–8 of the 5' end of the miRNA) and a bulge between nucleotides 9–10. Targeted mRNAs undergo translation inhibition at initiation. mRNA degradation occurs via ribosomes drop-off, mRNA de-circularization and mRNA translocation to the RNA processing bodies (P-bodies). Once at the P-bodies, the concerted action of 3'-to-5' exonucleases, decappases (DCP1/2), and de-adenylases (CCR/CAF/NOT1) accelerates the mRNA degradation. Many microRNAs may undergo a polyuridylation (tailing) and degradation (trimming) that is preceded by a monouridylation step at their 3' end, marking them for degradation. However, microRNAs already bound in RISC remain stable longer. Drosha, the *Drosophila* homolog of RNASEN in humans; DGCR8, DiGeorge Syndrome Critical Region 8; TRBP, transactivation-response RNA binding protein; HSP90, heat-shock protein of 90 kDa, HSC70, heat-shock cognate protein of 70 kDa; GW182, Gly-Trp repeats protein of 182 kDa.

by guiding Dicer to cleave the loop. This step produces a dsRNA duplex that contains both the mature miRNA (or leader strand) and the so-called passenger strand (also known as star sequence or miR*). The duplex also bears a two-nucleotide 3'-end overhang, and a 5'-PO₄ and 3'-OH terminus at each strand.

The Dicer-TRBP complex rapidly transfers the duplex to the miRNA-RNAi-induced silencing complex (miRISC) (Iwasaki et al., 2010; Johnston et al., 2010). miRISC harbors Ago2, an endonuclease of the Argonaute family, which functions as the core component of the complex. In the miRISC, the miR* strand is degraded by a yet unidentified mechanism,

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. Brain Research (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

leaving a mature miRISC loaded with a single-stranded fully mature 19–22 nt miRNA in place.

When the mature miRNA is loaded in the RISC, it binds to target mRNAs by base pairing to a complementary binding site or miRNA recognition element (MRE). Pairing occurs at nucleotides 2–8 of the 5' end of the miRNA (called the seed sequence). The seed is arranged in a perfect helical state inside the PAZ domain of Ago2 (Bartel, 2009).

miRISC-targeted mRNAs undergo translation inhibition by blocking the incorporation of the translation initiation factor eIF4E and promoting ribosomes to drop off their substrates (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Yet, the major contributor for decreased gene expression seems to be related to the degradation of the mRNA (Guo et al., 2010). It is, however, important to notice that miRNA–mRNA pairing has been shown to be reversible. This may facilitate mRNA translation after the mRNA is released from the RISC (Bhattacharyya et al., 2006).

Once 'tagged' by the miRISC, the mRNAs are transferred to RNA non-membranous organelles centers known as processing bodies (P-bodies). These centers convey the functions that degrade mRNAs. They can also act as storage structures for these molecules (Brengues et al., 2005).

In neurons, P-bodies are found also in dendrites (dl-P-bodies). Following changes in depolarizing activity and neurotransmitter stimulation they may undergo significant rearrangements in their components (Cougot et al., 2008).

3. Selective distribution of miRNAs in the adult brain

miRNAs are particularly abundant in the central nervous system (CNS) where up to 60–80% of all known miRNA genes are expressed (Lagos-Quintana et al., 2002; Krichevsky et al., 2003; Semperé et al., 2004; Hu et al., 2011). They are not homogeneously distributed throughout the brain and show differential neuroanatomical expression (Davis et al., 2007; Landgraf et al., 2007; Bak et al., 2008; Olsen et al., 2009; Pichardo-Casas et al., 2012) as well as cell type-specific profiles (He et al., 2012). Even within the same neuron, miRNAs are compartmentalized. They show selective enrichment in the somatodendritic compartment (Kye et al., 2007), distal axons (Natera-Naranjo et al., 2010), near the synapse (Konecna et al., 2009; Schratt, 2009) and also in dendrite-enriched synaptoneuroosomes (Pichardo-Casas et al., 2012). Moreover, several proteins like Dicer and Argonaute, AGO (Lugli et al., 2005), as well as the fragile X mental retardation protein, FMRP (Bassell and Warren, 2008; Jin et al., 2004a) have been identified at pre- (Hengst et al., 2006; Murashov et al., 2007) and post-synaptic structures (Feng et al., 1997; Kye et al., 2007; Lugli et al., 2008; Pichardo-Casas et al., 2012).

In a recent work we performed a high throughput screening of the miRNA content in five different regions of the mammalian brain. We compared it with the content observed in synaptoneuroosomal (SN) fractions isolated from the same regions. The SN preparation was used as an approximation to identify miRNAs present in synaptic structures. The microarray results were confirmed by real time PCR (qPCR) and northern blot studies (Pichardo-Casas et al., 2012).

We found that of the 248 miRNAs previously identified in rodents (miRBase v.9.0), about 50% (141 miRNAs) were present in the CNS. Of those, 104 were common to all anatomical regions explored in our study, which included: olfactory bulb (Ob), cortex (Cx), hippocampus (Hp), brain stem (Bs) and cerebellum (Cb). For comparison, we used the whole brain containing all the regions mentioned above (Ce).

An initial analysis showed that only a small number of miRNAs (39 of 141 explored) were either enriched or depleted when comparing whole brain (Ce) and its respective SN fraction (SCe) (Fig. 2A). Because whole brain analysis provided limited information about relative distribution of miRNAs in specific anatomical areas, we conducted an in-depth analysis of all miRNAs comparing each of the five anatomical structures with its respective SN fractions (Fig. 2B). The olfactory bulb (Ob) was the structure with the highest number of tissue-specific miRNAs that were enriched in the synaptic fraction, while the brain stem (Bs) was the structure with the fewest (Fig. 2B).

Of the 141 miRNAs present in the CNS, 104 were common to all brain areas studied (Fig. 2C). In all structures studied, we identified two groups of miRNAs based on their distribution between the total and SN fractions. The first group consisted of miRNAs with equal expression between the total and SN fraction, while the second group contained miRNAs that were more or less abundant in SN when compared to the total fraction. We selected 31 miRNAs, which were enriched in SN fractions from the 5 brain structures explored (Fig. 2B, gray rectangle). Only a handful of miRNAs were exclusive of each of the 5 regions explored: 11 from Ob, 7 from Cb, 6 from Bs, 4 from Hp and 4 from Cx (Fig. 2C). For instance, miR-365 was very abundant in Hp but absent in Ob, Cb and Bs.

We observed that several miRNAs from the same family were differently expressed throughout the brain. For example miR-34b and miR-34c were expressed almost exclusively in the Cb, while miR-34a (displaying over 85% identity with miR-34b and miR-34c) showed a wider distribution throughout all five structures studied.

This selective distribution cannot be explained by simple diffusion from the soma to the synapses. It must require a form of directional transport (Kindler et al., 2005). Although little is known about transport mechanisms of miRNA machinery to the synapse, proteins that transport mRNAs, such as FMRP (Jin et al., 2004b) have been shown to interact with pre-miRNAs and dendritic RISC components as well (Jin et al., 2004b).

Some synaptic mRNAs have a dendritic targeting element at the 3'UTR region, which targets their localization to the synapse (Mayford et al., 1996; Blichenberg et al., 1999; Bockers et al., 2004), but the *in silico* analysis we conducted failed to find a targeting sequence for synaptically enriched miRNAs (Pichardo-Casas et al., 2012). Recently a DEAD-motif containing helicase DHX36 has been found which is required for the dendritic localization of pre-miR-134, which binds to the terminal loop region, suggesting structure recognition as a preferred variable (Bicker et al., 2013). Also, the model of co-transportation in which the miRNA travels together with its target is plausible. The co-transportation model raises the possibility of a putative role of miRNAs in synaptic function given that these molecules may bind to 3'UTR for targeting

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. Brain Research (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

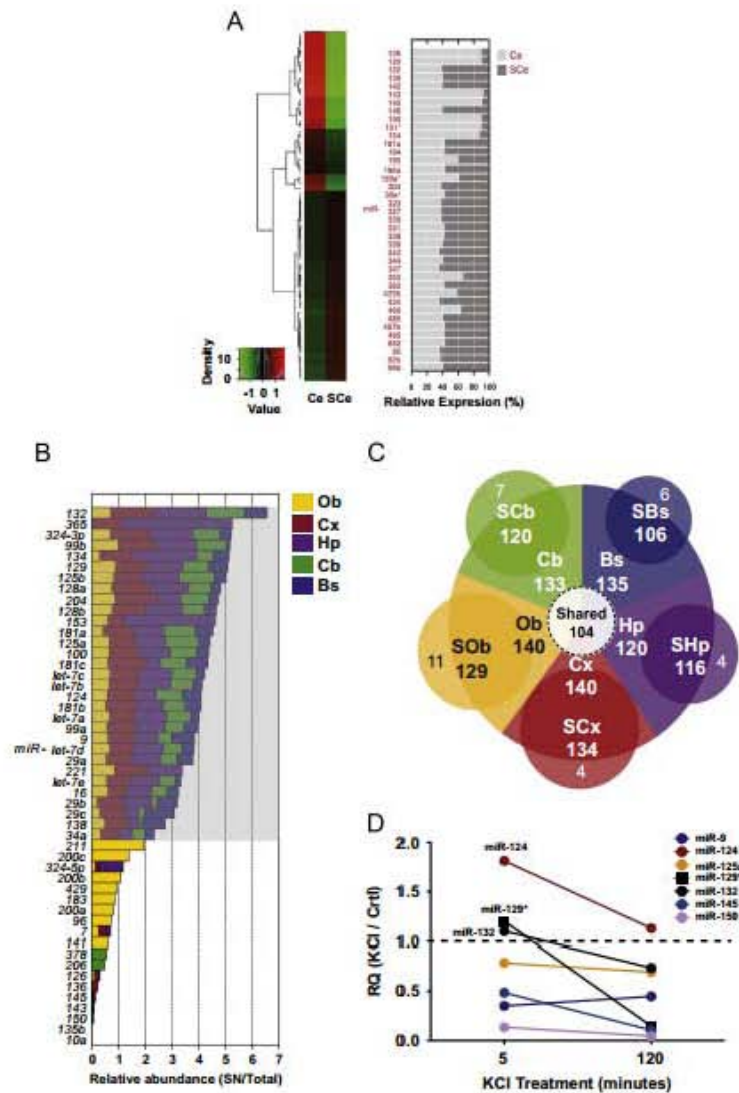


Fig. 2 – Brain distribution and dynamical modulation of miRNAs. (A) Relative expression of the 39 most abundant miRNAs in total brain (Ce) versus its synaptoneurosomal (SN) fraction (SCe). The left panel shows the heat map, and the right panel depicts the relative expression in percentage values (SN/total). (B) Plotting the 50 most abundant miRNAs by relative abundance (SN/total) separated by areas of the brain. The gray rectangle separates the 31 miRNAs selectively enriched in the 5 different brain areas explored. The remaining miRNAs show specific enrichment in only one or two areas of the brain, like miR-211 or miR-22c, which were exclusively found at the olfactory bulb (Ob) fraction; or miR-324-5p present almost exclusively at the hippocampus (Hp). (C) Pie diagram illustrating the exclusively expressed and shared microRNAs in the five different explored brain areas: olfactory bulb (Ob), cerebellum (Cb), hippocampus (Hp), cortex (Cx) and brain stem (Bs). In all cases the capital S before the names indicate the respective synaptoneurosomal fraction. (Figure modified from [Pichardo-Casas et al. \(2012\)](#).) (D) Changes in microRNAs concentration in isolated SN after high potassium stimulation of the 7 microRNAs that showed the major differences after in vivo kainic acid stimulation (see [Pichardo-Casas et al. \(2012\)](#) for a detailed explanation). Concentration measured by real-time PCR (qPCR) 5 and 120 min after exposing the SN fraction to high potassium. Values plotted as RQ (KCl/control). The dotted line shows the 1 ratio at which no changes were observed in the control condition after the addition of saline solution with normal potassium. Values show the mean from at least 3 independent measurements.

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

the synapse, as well as for preventing translation of the mRNA during the transport itself (Kosik, 2006).

Several reports have addressed that miRNA silencing efficiency depends on the concentration of the miRNA, the number of binding sites, and the concentration of their targets, as well as on the turn-over rate in miRISC (also reviewed in Ameres and Zamore (2013)). Many miRNAs display a variable concentration in neuronal processes, and some of them seem to alter the expression of specific mRNAs in a selective manner. Precise localization and enrichment in microdomains within neurons may help this system to act more efficiently by concentrating both components, the miRNAs and the target mRNAs in foci along dendrites and axons. This coincides with many translational components located in nearby synapses.

Experimental evidence is needed to uncover the precise events that transport miRNAs and the associated biogenesis machinery to the synapse, but their presence in this region raises a plethora of possibilities for spatial-temporal modulation of protein synthesis at the synapses by these small molecules.

4. Activity-mediated dynamics of miRNAs in the synapse

A body of evidence shows that miRNAs can be dynamically modulated. Induction of LTP/LTD (Park and Tang, 2009; Wibrand et al., 2010), as well as exposure to cocaine (Chandrasekar and Dreyer, 2009) and alcohol (Wang et al., 2009) induces changes in miRNA expression and processing.

Induced nervous hyperexcitability through kainic acid administration in rats also induces selective changes in miRNA contents in hippocampal and cortical synapses. However, only a small fraction of all miRNAs found at the synapse show content alterations with the majority remaining unchanged (Pichardo-Casas et al., 2012). It has been reported that neuronal stimulation elicits an increase in protein synthesis in dendrites (reviewed in Martin and Zukin (2006)). It remains to be established if this modulation of protein synthesis after neuronal stimulation is the result of changes in miRNAs content.

In a previous work we used northern blot and qPCR analysis, and identified miR-9, miR-125a, miR-128 and miR-150 as being selectively enriched (>4 fold) by kainic acid treatment in SN fractions isolated from the cortex when compared to SN from vehicle treated subjects. Interestingly, miR-125a, miR-128 and miR-150 were depleted about 2-fold in SN fractions from the hippocampus, while miR-9 was unaltered in the SN fraction of kainic acid treated subjects (Pichardo-Casas et al., 2012).

Since one of the main effects of kainate receptor activation is the elevation in calcium levels at the synapse, we conducted additional experiments to determine the effect of depolarization (by high potassium stimulation) of isolated SN (Fig. 2D). For this particular study we monitored by qPCR the same miRNAs mentioned above.

A 5 min period of high potassium stimulation resulted in a 50% reduction in the contents of miR-145, miR-9 and miR-150 and a 2 fold increase in miR-124 contents. Whereas miR-129*,

miR-132 and miR-125a contents remained unaltered. However, the kainic acid in vivo protocol induced an almost complete depletion of miR-129*, miR-145 and miR-150, while miR-9, miR-132 and miR-124 remained at similar levels as those observed after 5 min of high potassium treatment. Most surprisingly, the content of miR-124 increased almost 2-fold after 5 min of potassium exposure, but returned to basal levels after 2 h treatment.

These findings are inline with our in vivo studies, and suggest that the local contents of some microRNAs can be dynamically modulated by events that increase intra-synaptic calcium concentrations. Similar changes in miRNA contents were elicited in isolated SN fractions by simply inducing depolarization with high potassium. The reduction in miRNA content at the SN may reflect selective miRNAs exosome release into the media. Recent studies point to exosomes as important elements in the transport of miRNAs to the blood stream or even as messengers between tissues. Valadi et al. (2007) showed that exosomes released from mammalian cells contained mRNAs and miRNAs, and that other cells were able to take up the exosomes and to translate the mRNA into a functional protein. Katakowski et al. (2010) demonstrated that not only mRNAs, but also miRNAs delivered from exosomes were functional in the recipient cell. Intriguingly in these studies, the contents of mRNAs and miRNAs in exosomes were different from the cytoplasmic contents, suggesting that specific genetic material is packed into exosomes. Exosomes are derived from multivesicular bodies (MVB) which are present in neurons, and a recent study shows that neurons are able to release exosomes under the modulation of glutamatergic synaptic activity (Lachenal et al., 2011) and that they contain miRNAs that may act post-synaptically (Xu et al., 2013). Therefore, it is possible that miRNAs could mediate the exchange of genetic information between cells in an activity-dependent fashion, and that this information could be used to regulate the synaptic structure in a coordinated way between the pre- and postsynaptic cell.

Although we did not identify the molecular mechanism governing the changes in the local concentration of selective miRNAs during stimulation or examine how these changes may be reflected in the rate of local protein synthesis at the synapse, several pathways mediating miRNA modulation and function have been recently described (see below).

5. miRNAs as modulators of the synaptic function

Synapses are dynamic structures, which exhibit morphological as well as functional plasticity. Activity-dependent synaptic plasticity relies on several mechanisms many of which include gene expression (Sutton and Schuman, 2006). For instance, neuronal activity as well as the Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) induces the expression of miR-132 via cAMP response element binding, CREB activation (Nudelman et al., 2010; Vo et al., 2005) (Fig. 3A). miR-132, once at the synapse, increases the number and size of dendritic spines by targeting a p250GAP (a brain-enriched GAP for Rho family GTPases) which activates signaling pathways that drive actin dynamics (Impey et al., 2012; Wayman et al., 2008)

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. Brain Research. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

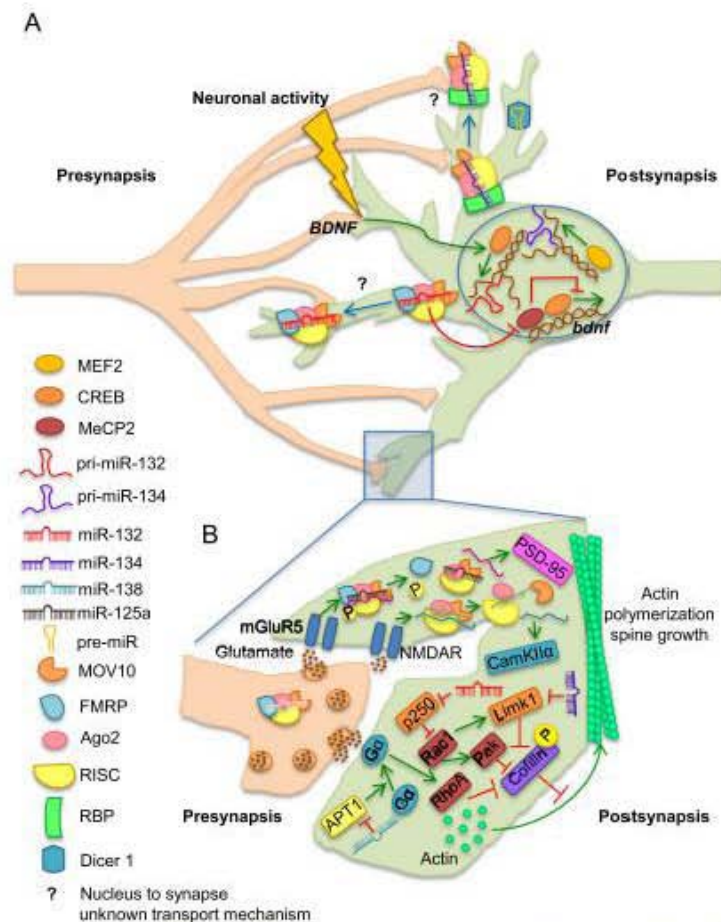


Fig. 3 - Activation and function of synaptic miRNAs under neuronal stimulation. (A) Presynaptic stimulation as well as BDNF signaling induces CREB and MEF2 mediated transcription of miR-132 and miR-134 respectively, at the postsynaptic nucleus. Once mature, both miRNAs drive translational repression of several targets located in different compartments. miR-132 targets MeCP2, a transcriptional repressor of *bdnf*, thus favoring CREB-mediated *bdnf* expression. Both miRNAs associated with RISC travel through dendrites by an unknown mechanism (indicated by ?), although ribonucleoproteins (RBPs) such as FMRP have been suggested to participate. miRNA mature forms as well as pre-miRNAs and Dicer1 have been detected at the synapse. **(B)** In the synaptic compartment, miR-132 promotes spine growth by targeting p250-GAP, which activates the Rac/PAK signaling pathway, resulting in cofilin inhibition and promoting actin polymerization. miR-134 and miR-138 counteract this effect; miR-134 directly targets Limk1, an inhibitor of cofilin, while miR-138 represses APT1 translation, resulting in the dissociation of G_{α} from the membrane. In the membrane, G_{α} activates the RhoA signaling pathway and inhibits cofilin thus preventing actin polymerization. miRNA machinery regulation also occurs through glutamateric receptors. Excitatory input induces the dissociation of FMRP as well as the degradation of MOV10 (mammalian Armitage homolog), both components of miRISC complex. These events promote the release of repressed mRNAs, such as PSD95 and CamKII α , thus leading to their translation and driving plastic changes at the postsynapse.

(Fig. 3B). Furthermore, miR-132 amplifies CREB activity by sensitizing adenylyl cyclases (Wayman et al., 2008). In turn, CREB promotes the expression of several plasticity mediating genes including *bdnf* and miR-132, thus forming a positive feedback loop that enhances the synaptic response. miR-132 also targets the MeCP2 (methyl CpG binding protein 2), an inhibitor of LTP and memory formation hence facilitating

plasticity (Klein et al., 2007; H. Li et al., 2011). Interestingly, overexpression of miR-132 impaired novel object recognition memory in mice (Hansen et al., 2010) and provoked morphological alterations of dendritic spines. This effect is inline with the fact that excessive CREB-mediated gene expression impairs hippocampal dependent learning and memory (Viosca et al., 2009).

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. Brain Research (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

Another activity-dependent transcription factor, Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) activates transcription of miR-134. In this case, miR-134 inhibits the translation of Limk1 (LIM domain kinase 1) which results in the diminishment of dendritic spines size (Schratt et al., 2006) (Fig. 3A and B). In agreement, SIRT1 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) a positive regulator of memory formation, prevents miR-134 expression. This in turn interferes with CREB downregulation and hence with the activation of CREB-dependent plasticity genes including *bdnf* (Gao et al., 2010). In contrast, results by Fiore et al. (2009) suggest that miR-134 could have a role as a positive regulator of plasticity by targeting the local translational repressor Pumilio2. Therefore, given that a single miRNA has different targets, it is feasible that a range of divergent events are triggered after the miRNA pathway activation, thus explaining these seemingly contradictory results.

The above mentioned studies reflect the contribution of the miRNA pathway in the generation of fine-tuned expression profiles necessary for activity-dependent synaptic plasticity. On the one hand, this pathway participates in regulatory feedback loops with transcription and growth factors, but it also interacts with the epigenetic machinery of gene expression, and regulates targets located in different compartments.

In this line, miR-138 has been shown to negatively regulate the size of dendritic spines via Acyl protein thioesterase 1 (APT1) (Siegel et al., 2009), an enzyme regulating the palmitoylation status of proteins that work at the synapse by controlling actin dynamics (Fig. 3B). However, even when other putative targets of miR-138 exist, they are not down regulated under miR-138 overexpression in neurons (Siegel et al., 2009) possibly reflecting an accessibility impediment of this miR in neurons.

Of particular interest is the local protein synthesis of dormant mRNA that occurs in the synaptic compartment. This event has a critical role in learning and other expressions of nervous plasticity (Kang and Schuman, 1996; Martin et al., 1997; Jung et al., 2012). Maintaining the control of such translational microdomains via its spatial-temporal modulation is key to protein synthesis.

There is now a body of evidence that suggests that miRNAs act as modulators of plasticity by silencing target mRNAs at the synapse in a reversible fashion. Considering this idea, in the resting state of the synapse, miRNAs keep their targets silenced, and after a signal of synaptic activation, mRNAs are released and translated for driving long-term changes. When the stimulus ends, the synapse may return to its basal state. Interestingly, miRNA translation control has been shown to occur through mRNA silencing. Analysis of P-body-like structures present in dendrites reveals that they are positive for several P-body and miRISC components as well as rRNA, but rarely contain exonucleases (Cougot et al., 2008). Hence these particles store mRNAs until a stimulus triggers their release. In this way, the miRNA pathway may be a reversible form of regulation, ideal for working in an activity-dependent fashion.

In this sense, a study by Ashraf et al. (2006) showed that neural activity or the induction of long-term memory in *Drosophila melanogaster* leads to the degradation of the RISC

factor Armitage (Cook et al., 2004) causing the release of plasticity related mRNAs such as CamKII α (Fig. 3B). Therefore, the degradative control of RISC underlies the pattern of synaptic protein synthesis associated with the formation of a stable memory. More recently, Banerjee et al. (2009) confirmed the same mechanism for mammals with the homolog of Armitage, MOV10.

In its phosphorylated state, the fragile X mental retardation protein (FMRP) which interacts with RISC components, forms two complexes: one with Ago1 and miR-125b, and another with Ago2 and miR-125a. The dephosphorylation of FMRP in response to mGluR5 activation disrupts both complexes. Hence the translation of miR-125a/b targets such as the postsynaptic density protein-95 (PSD-95) and the subunit 2A of the NMDA (NR2A) is facilitated (Edbauer et al., 2010; Muddashetty et al., 2011) (Fig. 3B). These findings suggest that the particular composition of RISC as well as the posttranslational regulation of its elements are key in driving synaptic plasticity.

It is important to notice that the miRNA pathway at the synapse can regulate synaptic functions without requiring changes in miRNA expression, which is accomplished by controlling the production of mature miRNAs via local biogenesis (Lugli et al. 2005).

Studies by Lugli et al. (2005) showed that mature miRNAs are required in synaptic function by demonstrating that neuronal stimulation activates Dicer 1, which in turn triggers the conversion of synaptic pre-miRNAs into their mature forms. Intriguingly, *dicer1* deletion in adult mouse forebrain enhances learning and memory in the knockdown inducible model (Konopka et al., 2010). Nevertheless, knockdown of Ago2 in the adult mouse hippocampus impedes both short-term and long-term contextual fear memory formation (Batassa et al., 2010). One possible explanation to the opposite phenotypes induced by the deletion of *dicer1* and Ago2 knockdown, respectively, is that deletion of *dicer1* leaves mature and functional microRNAs, specially the most stable to drive events at the synapse, but deletion of Ago2 impedes microRNA function from the beginning.

The above mentioned observations suggest that the miRNA pathway is key in the modulation of diverse types of synaptic plasticity and long-term changes that underlie cognitive processes such as memory, by regulating levels of proteins in an activity-dependent fashion. In the next section, we will introduce Alzheimer's disease, a neurodegenerative pathology that mainly affects memory and we will discuss evidence for synaptic alterations associated to the disease. Finally, we will focus on some miRNAs associated to synaptic dysfunction, which may provide a basis for the synaptic loss observed in AD.

6. Synaptic alterations associated with Alzheimer's disease

AD is clinically defined by the progressive decline of memory, as well as by changes in mood, language and personality. It mainly affects the temporal and entorhinal cortices as well as the limbic and paralimbic systems, which are involved in cognitive processes such as learning and memory. Symptoms

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. Brain Research (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

may initiate with a mild cognitive impairment involving memory lapses, followed by more evident memory deficits until a severe cognitive decline accompanied by the loss of environment and self-awareness prevails. During the first stages of the disease sensory and motor functions remain unaltered, thus suggesting a selective malfunction of synapses within the regions subserving the above mentioned cognitive processes (Selkoe, 2002).

At a histopathological level two hallmarks define AD: the abnormal extracellular accumulation of amyloid- β protein into neuritic plaques and the presence of intraneuronal neurofibrillary tangles (NFT) composed by biochemically modified forms of the microtubule associated protein tau in selected brain regions (Braak et al., 1999). The etiology of AD remains unresolved but a body of evidence suggests that multiple neuronal abnormalities occur in the brain and lead to a progressive disconnection of neuronal networks and to the appearance of clinical symptoms. By far, the most prevalent hypothesis of AD is the so-called amyloid cascade, which proposes that A β accumulation plays a pivotal role in functional and structural brain alterations (Hardy and Selkoe, 2002; Tanzi and Bertram, 2005).

Several studies have examined pathological brain changes at the molecular and cellular level that may play a role in AD. Particularly intriguing is the synaptic loss that occurs early in the disease and is the major morphological correlate of memory decline (DeKosky and Scheff, 1990; Terry et al., 1991; DeKosky et al., 1996). Active synapse loss, as well as a striking reduction in spine density, has been observed in a transgenic mouse model of AD (Saura et al., 2004; Merino-Serrais et al., 2011; Spires-Jones and Knaflo, 2012). Synaptic damage in turn may lead to alterations in brain plasticity and progressive neuronal disconnection, finally culminating in massive neuronal death in vulnerable brain regions (Arendt, 2009; Hernandez-Ortega et al., 2011).

Ultrastructural analyses in biopsies of patients with AD symptomatology showed a reduction of 25–35% in synaptic density as well as 15–35% in the number of synapses per neuron depending on the cortical layer studied (Davies et al., 1987). This finding suggested that there is a loss in neuronal connections despite neuronal survival, which was confirmed with a further ultrastructural study that included a larger number of tissue samples obtained after biopsies or from autopsies of AD patients (Scheff et al., 1990). Other studies in which levels of synaptophysin, a synaptic vesicular protein, were analyzed as an indirect measurement of synaptic number in autopsies of patients with AD, also reported a reduction in protein content in parietal, temporal and mid-frontal cortex as well as in hippocampus (Hamos et al., 1989; Masliah et al., 1989). The hippocampus resulted the most affected region with a 45–55% loss in total protein content. This shows that synaptic deterioration was more pronounced in brain regions involved in memory functions (Heinonen et al., 1995; Sze et al., 1997).

AD shows a slow progression and it is now clear that the biological processes that underlie the pathology probably begin many years before the appearance of clinical manifestations. Patients diagnosed with mild cognitive impairment (MCI, which arises from different types of dementia) show a reduction in synaptic density of about 18–25% in the

hippocampus and in patients who finally develop AD this value raises to 45–55% (Scheff et al., 2006, 2007). Therefore, synaptic loss is now recognized as an early event in the course of pathology. Sample analysis from patients with amnesic MCI and early AD show markers of synaptic loss (Counts et al., 2006) or dysfunction as evidenced by the reduction in the levels of synaptophysin and other proteins responsible for the maturation, docking and neurotransmitter vesicles release like synapsin 1, synaptobrevin, SNAP-25, and synaptotagmin (Lassmann et al., 1992; Masliah et al., 2001). This suggests that alterations in synaptic functioning might occur early in the pathology. Additionally proteins which drive postsynaptic plasticity, such as drebin are also diminished (Harigaya et al., 1996; Hatanpaa et al., 1999). Particularly interesting was the finding that the axonal-remodeling protein GAP-43 (growth associated protein 43) was not reduced during early AD (Masliah et al., 2001) suggesting that some compensatory mechanisms may be taking place. Concomitant to the synaptic loss, an increase in individual synaptic area sites as well as in levels of PSD-95 protein have been observed (Leuba et al., 2008), probably reflecting a mechanism to preserve neuronal contacts (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 1990; Masliah et al., 1994).

Although several correlations between AD progression and synaptic dysfunction as observed through protein content modifications, altered neuronal activity, and synaptic density decrease have been well established, the mechanisms underlying such events are still elusive. It is possible that deregulated protein translation plays a pivotal role in synaptic dysfunction and memory impairment in AD. It is in this context that the synaptic miRNA pathway could participate in the AD-associated synaptic impairment.

7. Implications of microRNAs in synaptic alterations associated with Alzheimer's disease

Up to date there is only a handful of studies which convey information regarding the possible role of miRNAs in synaptic alterations during AD (see below). However, as previously mentioned, there is now a body of evidence originating from *Drosophila* and mice, showing that synaptic function is extremely sensitive to optimal miRNA pathway function (for a review see McNeill and Van Vactor (2012)).

Several studies showing miRNA dysregulation associated with AD reveal that synaptic miRNAs are altered. For instance, a pioneering study by Lukiw (2007) demonstrated an up-regulation of miR-9, miR-125b and miR-128 in the hippocampus of AD patients. Among these, miR-125b and miR-128 are enriched in the synaptic compartment, where they have a role in synaptic plasticity and fear-extinction memory formation respectively (Edbauer et al., 2010; Lin et al., 2011). The above mentioned result may suggest a role of specific miRNAs in synaptic dysfunction and memory performance.

In this same line, a massive study by Cogswell et al. (2008) detected an 8-fold increase of miR-138 in the CSF of AD patients. This miRNA regulates negatively dendritic spine size and its activity is normally downregulated under

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. Brain Research (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

neuronal stimulation (Siegel et al., 2009). This study also reported higher levels of the brain enriched miR-34a in hippocampal and medial frontal gyrus of AD patient samples as compared to controls. In agreement, miR-34a has been found increased in brain tissue (Liu et al., 2012) and also in blood cells (X. Li et al., 2011) during ageing, the major risk factor for AD.

Interestingly, miR-34a is one of the miRNAs that targets Arc-mRNA (Wibrand et al., 2012). Arc (Activity-regulated cytoskeleton associated protein) also known as Arg3.1 is an immediate early gene whose transcription is tightly coupled to neuronal activity and which mediates memory consolidation (Vazdarjanova et al., 2006). In a recent study, Rudinskiy et al. (2012) analyzed the expression of Arc in a mouse model of AD. The authors report that neurons near A β plaques were less likely to respond to stimulation, but that the few responsive neurons showed stronger responses. Furthermore, they observed that Arc expressing neurons did not present dystrophic neurites, but that other neurons did, thus suggesting that cells with neuritic dystrophies were not able to transcribe Arc in response to stimulation. As opposed to Arc, the expression of miR-34a does not change in an activity-dependent fashion (Wibrand et al., 2012) suggesting that Arc repression/derepression is mediated through FMRP, which has been previously shown to interact with Arc-mRNA (Zalfa et al., 2003).

Other studies have shown that synaptic miRNAs such as the miR-132 and miR134 families differentiate mild cognitive impairment from age-matched controls in plasma (Sheinerman et al., 2012), which suggest that miRNAs could be evaluated in non-invasive samples and that they could aid as early diagnostic tools. miR-132 as well as miR-134 is modulated by activity-dependent transcription factors, which not only play a role in dendritic spine morphology, but also integrate a positive or negative feedback loop, respectively, with BDNF. This factor is known to have important roles in neuronal surviving, synaptic plasticity and memory formation (Ghosh et al., 1994; Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996). Moreover BDNF mRNA and protein levels are decreased in areas involved in learning and memory such as temporal and entorhinal cortices as well as in hippocampus of AD patients (Connor et al., 1997). The diminishment of BDNF represents an early event in AD pathology, since patients in pre-clinical stages show lower levels than patients with no cognitive impairment (Peng et al., 2005).

Altogether, the above-mentioned studies start to reveal an interplay among molecules known to mediate nervous plasticity and provide a basis for unraveling the possible role of synaptic miRNAs on the molecular early events that underlie synaptic loss in AD.

8. Concluding remarks

There is a growing evidence supporting the idea that miRNA mediated gene silencing is key in controlling cellular function, as well as adaptive signaling mechanisms in a wide range of spatial-temporal domains.

A clear example of an adaptive mechanism in animals is learning and memory, which is recognized to depend on

translational events at the synapse. However it is now becoming clear that more rapid and local fine-tuned events such as miRNA mediated posttranscriptional regulation of gene expression also take place. miRNAs may be acting in both neuronal remodeling and maintenance of neuronal connections in memory (McNeill and Van Vactor, 2012) and it is not surprising that their misexpression leads to events that range from activity depression to synaptogenesis defects and even synaptic loss, such as in AD. However, a complex molecular interplay is most certainly underlying the development of the disease and the neuropathological features associated with it may only represent the tip of the iceberg.

Further studies evaluating miRNA deregulation and directed at manipulating miRNA activity and expression in experimental models would help to unravel their role in pathology and open new venues for developing clinical treatments.

Acknowledgments

We thank Ronald P. Hart and colleagues from the W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience at Rutgers University, Piscataway, NJ and Wilma J. Friedman and Marta Volosin from Rutgers University, Newark, NJ for providing with thoughtful feedback to IPC. We thank Edmund Glaser for critical suggestions and for comments on this manuscript. AZ is supported by CONACyT 176589 and DGAPA UNAM IA200312. LV is supported by CONACyT 127822, DGAPA UNAM IN202512 and ICyTDF.

REFERENCES

- Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Ameres, S.L., Zamore, P.D., 2013. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 475-488.
- Arendt, T., 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 167-179.
- Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M., Kunes, S., 2006. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* 124, 191-205.
- Bak, M., Silahatoglu, A., Moller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N., Kauppinen, S., 2008. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 14, 432-444.
- Banerjee, S., Neveu, P., Kosik, K.S., 2009. A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron* 64, 871-884.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Bassell, G.J., Warren, S.T., 2008. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 60, 201-214.
- Batassa, E.M., Costanzi, M., Saraulli, D., Scardigli, R., Barbato, G., Cogoni, C., Cestari, V., 2010. RISC activity in hippocampus is essential for contextual memory. *Neurosci. Lett.* 471, 185-188.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martiny-Bar, C., Gonsky, R., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124.
- Bicker, S., Khudayberdiev, S., Weiss, K., Zocher, K., Baumeister, S., Schrott, G., 2013. The DEAH-box helicase DHX36 mediates

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

- dendritic localization of the neuronal precursor-microRNA-134. *Genes Dev.* 27, 991-996.
- Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C.C., Richter, D., Kindler, S., 1999. Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* 19, 8818-8829.
- Bockers, T.M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E.D., Kreuz, M.R., Richter, D., Kindler, S., Kreienkamp, H.J., 2004. Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol. Cell Neurosci.* 26, 182-190.
- Braak, H., Braak, E., Peter, J., Morrison, J.H., 1999. Temporal sequence of Alzheimer's disease related pathology. In: Peters, A., Morrison, J.H. (Eds.), *Cerebral Cortex. Vol. Neurodegenerative and Age-Related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, pp. 475-512.
- Bregues, M., Teixeira, D., Parker, R., 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310, 486-489.
- Cogswell, J.P., Ward, J., Taylor, I.A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kempainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., Saunders, A.M., Roses, A.D., Richards, C.A., 2008. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J. Alzheimers Dis.* 14, 27-41.
- Connor, B., Young, D., Yan, Q., Faull, R.L., Synek, B., Dragunow, M., 1997. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 49, 71-81.
- Cook, H.A., Koppetsch, B.S., Wu, J., Theurkauf, W.E., 2004. The *Drosophila* SDE3 homolog armitage is required for oskar mRNA and embryonic axis specification. *Cell* 116, 817-829.
- Cougot, N., Bhattacharyya, S.N., Tapia-Arancibia, L., Bordonne, R., Filipowicz, W., Bertrand, E., Rage, F., 2008. Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J. Neurosci.* 28, 13793-13804.
- Counts, S.E., Nadeem, M., Lad, S.P., Wu, J., Mufson, E.J., 2006. Differential expression of synaptic proteins in the frontal and temporal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *J. Neurobiol.* 65, 592-601.
- Chandrasekar, V., Dreyer, J.L., 2009. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol. Cell Neurosci.* 42, 350-362.
- Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., Darnell, R.B., 2009. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479-486.
- Chuang, J.C., Jones, P.A., 2007. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr. Res.* 61, 24R-29R.
- Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., Yates, P.O., 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 78, 151-164.
- Davis, C.J., Bohnet, S.G., Meyerson, J.M., Krueger, J.M., 2007. Sleep loss changes microRNA levels in the brain: a possible mechanism for state-dependent translational regulation. *Neurosci. Lett.* 422, 68-73.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., 1990. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 27, 457-464.
- DeKosky, S.T., Scheff, S.W., Styren, S.D., 1996. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration* 5, 417-421.
- Doench, J.G., Sharp, P.A., 2004. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-511.
- Edbauer, D., Neilson, J.R., Foster, K.A., Wang, C.F., Seeburg, D.P., Batterton, M.N., Tada, T., Dolan, B.M., Sharp, P.A., Sheng, M., 2010. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65, 373-384.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., Filipowicz, W., 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351-379.
- Feng, Y., Gutekunst, C.A., Eberhart, D.E., Yi, H., Warren, S.T., Hersch, S.M., 1997. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J. Neurosci.* 17, 1539-1547.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., Pillai, R.S., 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 331-341.
- Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S.W., Kim, T.K., Greenberg, M.E., Schmitt, G., 2009. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.* 28, 697-710.
- Gao, J., Wang, W.Y., Mao, Y.W., Graff, J., Guan, J.S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., Tsai, L.H., 2010. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466, 1105-1109.
- Ghosh, A., Carnahan, J., Greenberg, M.E., 1994. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263, 1618-1623.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Gurtan, A.M., Sharp, P.A., 2013. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J. Mol. Biol.* 425, 3582-3600.
- Hamos, J.E., DeGennaro, L.J., Drachman, D.A., 1989. Synaptic loss in Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology* 39, 355-361.
- Hansen, K.F., Sakamoto, K., Wayman, G.A., Impey, S., Obrietan, K., 2010. Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS One* 5, e15497.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harigaya, Y., Shoji, M., Shira, T., Hirai, S., 1996. Disappearance of actin-binding protein, drebrin, from hippocampal synapses in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 87-92.
- Hatanpaa, K., Isaacs, K.R., Shira, T., Brady, D.R., Rapoport, S.I., 1999. Loss of proteins regulating synaptic plasticity in normal aging of the human brain and in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 637-643.
- He, M., Liu, Y., Wang, X., Zhang, M.Q., Hannon, G.J., Huang, Z.J., 2012. Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* 73, 35-48.
- Heinonen, O., Soininen, H., Sorvari, H., Kosunen, O., Paljarvi, L., Koivisto, E., Riekkinen, S., 1995. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 64, 375-384.
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., Tollervey, D., 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153, 654-665.
- Hengst, U., Cox, L.J., Macosko, E.Z., Jaffrey, S.R., 2006. Functional and selective RNA interference in developing axons and growth cones. *J. Neurosci.* 26, 5727-5732.
- Hernandez-Ortega, K., Quiroz-Baez, R., Arias, C., 2011. Cell cycle reactivation in mature neurons: a link with brain plasticity, neuronal injury and neurodegenerative diseases?. *Neurosci. Bull.* 27, 185-196.
- Hu, H.Y., Guo, S., Xi, J., Yan, Z., Fu, N., Zhang, X., Menzel, C., Liang, H., Yang, H., Zhao, M., Zeng, R., Chen, W., Faabo, S., Khaitovich, P., 2011. MicroRNA expression and regulation in human, chimpanzee, and macaque brains. *PLoS Genet.* 7, e1002327.

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110.
- Impey, S., Davare, M., Lesiak, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., Wayman, G.A., 2012. An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol. Cell Neurosci.* 43, 146–156.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., Tomari, Y., 2010. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell.* 39, 292–299.
- Jin, P., Alisch, R.S., Warren, S.T., 2004a. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat. Cell Biol.* 6, 1048–1053.
- Jin, P., Zarnescu, D.C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K., Warren, S.T., 2004b. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 7, 113–117.
- Johnston, M., Geoffroy, M.C., Sobala, A., Hay, R., Hutvagner, G., 2010. HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol. Biol. Cell.* 21, 1462–1469.
- Jung, H., Yoon, B.C., Holt, C.E., 2012. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 308–324.
- Junker, A., 2011. Pathophysiology of translational regulation by microRNAs in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585, 3738–3746.
- Kang, H., Schuman, E.M., 1996. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273, 1402–1406.
- Katakowski, M., Buller, B., Wang, X., Rogers, T., Choppe, M., 2010. Functional microRNA is transferred between glioma cells. *Cancer Res.* 70, 8259–8263.
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D., Tiedge, H., 2005. RNA transport and local control of translation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 223–245.
- Klein, M.E., Li, D.T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G., Goodman, R.H., 2007. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat. Neurosci.* 10, 1513–1514.
- Konecna, A., Heraud, J.E., Schoderboeck, L., Raposo, A.A., Kiebler, M.A., 2009. What are the roles of microRNAs at the mammalian synapse? *Neurosci. Lett.* 466, 63–68.
- Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J.R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T., Wilczynski, G., Merkenschlager, M., Theis, F.J., Kohr, G., Kaczmarek, L., Schutz, G., 2010. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J. Neurosci.* 30, 14835–14842.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., Bonhoeffer, T., 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8856–8860.
- Kosik, K.S., 2006. The neuronal microRNA system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 911–920.
- Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K., Kosik, K.S., 2003. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9, 1274–1281.
- Kye, M.J., Liu, T., Levy, S.F., Xu, N.L., Groves, B.B., Bonneau, R., Lao, K., Kosik, K.S., 2007. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA* 13, 1224–1234.
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F.J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., Sadoul, R., 2011. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell Neurosci.* 46, 409–418.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735–739.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosei, A., Muller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H.I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M., Tuschl, T., 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401–1414.
- Lassmann, H., Weiler, R., Fischer, P., Bancher, C., Jellinger, K., Floor, E., Danielczyk, W., Seitelberger, F., Winkler, H., 1992. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience* 46, 1–8.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Leuba, G., Savioz, A., Vernay, A., Carnal, B., Kraftsik, R., Tardif, E., Riederer, I., Riederer, B.M., 2008. Differential changes in synaptic proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein. *J. Alzheimers Dis.* 15, 139–151.
- Li, H., Zhong, X., Chau, K.F., Williams, E.C., Chang, Q., 2011. Loss of activity-induced phosphorylation of MeCP2 enhances synaptogenesis, LTP and spatial memory. *Nat. Neurosci.* 14, 1001–1008.
- Li, X., Khanna, A., Li, N., Wang, E., 2011. Circulatory miR34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging (Albany, NY)* 3, 985–1002.
- Lin, Q., Wei, W., Coelho, C.M., Li, X., Baker-Andresen, D., Dudley, K., Ratnu, V.S., Boskovic, Z., Kobor, M.S., Sun, Y.E., Bredy, T.W., 2011. The brain-specific microRNA miR-128b regulates the formation of fear-extinction memory. *Nat. Neurosci.* 14, 1115–1117.
- Lippi, G., Steinert, J.R., Marczylo, E.L., D'Oro, S., Fiore, R., Forsythe, L.D., Schrott, G., Zoli, M., Nicotera, P., Young, K.W., 2011. Targeting of the Arp3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *J. Cell Biol.* 194, 889–904.
- Liu, N., Landreh, M., Cao, K., Abe, M., Hendriks, G.J., Kennerdell, J.R., Zhu, Y., Wang, L.S., Bonini, N.M., 2012. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 482, 519–523.
- Lugli, G., Larson, J., Martone, M.E., Jones, Y., Smalheiser, N.R., 2005. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem.* 94, 896–905.
- Lugli, G., Torvik, V.I., Larson, J., Smalheiser, N.R., 2008. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J. Neurochem.* 106, 650–661.
- Lukiw, W., 2007. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport* 18, 297–300.
- Martin, K.C., Casadio, A., Zhu, H., Yaping, E., Rose, J.C., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1997. Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91, 927–938.
- Martin, K.C., Zukin, R.S., 2006. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J. Neurosci.* 26, 7131–7134.
- Masliah, E., Terry, R.D., DeTeresa, R.M., Hansen, L.A., 1989. Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.* 103, 234–239.
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., DeTeresa, R., Alford, M., Terry, R., 1994. Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 174, 67–72.

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel Jr., D.W., Morris, J.C., 2001. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 127-129.
- Mayford, M., Baranes, D., Podyspanina, K., Kandel, E.R., 1996. The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13250-13255.
- McNeill, E., Van Vactor, D., 2012. MicroRNAs shape the neuronal landscape. *Neuron* 75, 363-379.
- Merino-Serrais, P., Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., Feraud-Espinosa, I., DeFelipe, J., 2011. Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 21, 1037-1044.
- Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T., Bassell, G.J., 2011. Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol. Cell* 42, 673-688.
- Murashov, A.K., Chintalgattu, V., Islamov, R.R., Lever, T.E., Pak, E.S., Sierpinski, P.L., Katwa, L.C., Van Scott, M.R., 2007. RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *FASEB J.* 21, 656-670.
- Natera-Naranjo, O., Aschrafi, A., Gioio, A.E., Kaplan, B.B., 2010. Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA* 16, 1516-1529.
- Nelson, P.T., Wang, W.X., 2010. MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. *J. Alzheimers Dis.* 21, 75-79.
- Nudelman, A.S., DiRocco, D.F., Lambert, T.J., Garelick, M.G., Le, J., Nathanson, N.M., Storm, D.R., 2010. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus* 20, 492-498.
- Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., Werge, T., 2009. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One* 4, e7225.
- Orom, U.A., Nielsen, F.C., Lund, A.H., 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460-471.
- Park, C.S., Tang, S.J., 2009. Regulation of microRNA expression by induction of bidirectional synaptic plasticity. *J. Mol. Neurosci.* 38, 50-56.
- Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R., 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137-1145.
- Peng, S., Wu, J., Mufson, E.J., Fahnstock, M., 2005. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 93, 1412-1421.
- Pichardo-Casas, I., Goff, L.A., Swerdel, M.R., Athie, A., Davila, J., Ramos-Brossier, M., Lapid-Volosin, M., Friedman, W.J., Hart, R.P., Vaca, L., 2012. Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res.* 1436, 20-33.
- Rajasethupathy, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveetil, S.V., Russo, J.J., Sander, C., Tuschl, T., Kandel, E., 2009. Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 63, 803-817.
- Rudinskiy, N., Hawkes, J.M., Betensky, R.A., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Spire-Jones, T.L., Hyman, B.T., 2012. Orchestrated experience-driven Arc responses are disrupted in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 15, 1422-1429.
- Saba, R., Storchel, P.H., Aksoy-Aksel, A., Kepura, F., Lippi, G., Plant, T.D., Schrott, G.M., 2012. Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. *Mol. Cell Biol.* 32, 619-632.
- Saura, C.A., Choi, S.Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher 3rd, R.J., Kandel, E.R., Duff, K., Kirkwood, A., Shen, J., 2004. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 42, 23-36.
- Scheff, S.W., DeKosky, S.T., Price, D.A., 1990. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 11, 29-37.
- Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., Mufson, E.J., 2006. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* 27, 1372-1384.
- Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., Mufson, E.J., 2007. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501-1508.
- Schratt, G., 2009. microRNAs at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 842-849.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.F., Kiebler, M., Greenberg, M.E., 2006. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283-289.
- Selkoe, D.J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-791.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrov, S., Ambros, V., 2004. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 5, R13.
- Sheinerman, K.S., Tsivinsky, V.G., Crawford, F., Mullan, M.J., Abdullah, L., Umansky, S.R., 2012. Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment. *Aging (Albany NY)* 4, 590-605.
- Siegel, G., Obermosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J., Kane, C., Hubel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M.E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J., Schrott, G.M., 2009. A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 11, 705-716.
- Smalheiser, N.R., Lugli, G., 2009. microRNA regulation of synaptic plasticity. *Neuromol. Med.* 11, 133-140.
- Spire-Jones, T., Knafo, S., 2012. Spines, plasticity, and cognition in Alzheimer's model mice. *Neural Plast.* 2012, 319836.
- Sutton, M.A., Schuman, E.M., 2006. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127, 49-58.
- Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., Martin, L.J., 1997. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 933-944.
- Tanzi, R.E., Bertram, L., 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545-555.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572-580.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., Lotvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654-659.
- Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Insel, N., Plummer, T.K., Rosi, S., Chowdhury, S., Mikhail, D., Worley, P.F., Guzowski, J.F., Barnes, C.A., 2006. Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* 498, 317-329.

Please cite this article as: Garza-Manero, S., et al., Selective distribution and dynamic modulation of miRNAs in the synapse and its possible role in Alzheimer's Disease. *Brain Research* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.009>

- Viosca, J., Malleret, G., Bourtchouladze, R., Benito, E., Vronskava, S., Kandel, E.R., Barco, A., 2009. Chronic enhancement of CREB activity in the hippocampus interferes with the retrieval of spatial information. *Learn. Mem.* 16, 198-209.
- Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H., Impey, S., 2005. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16426-16431.
- Wang, L.L., Zhang, Z., Li, Q., Yang, R., Pei, X., Xu, Y., Wang, J., Zhou, S.F., Li, Y., 2009. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Hum. Reprod.* 24, 562-579.
- Wayman, G.A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.Y., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., Impey, S., 2008. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9093-9098.
- Wibrand, K., Panja, D., Tiron, A., Ofte, M.L., Skafnesmo, K.O., Lee, C. S., Pena, J.T., Tuschl, T., Bramham, C.R., 2010. Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 31, 636-645.
- Wibrand, K., Pai, B., Siripornmongkolchai, T., Bittins, M., Berentsen, B., Ofte, M.L., Weigel, A., Skafnesmo, K.O., Bramham, C.R., 2012. MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene *Arc*. *PLoS One* 7, e41688.
- Xu, J., Chen, Q., Zen, K., Zhang, C., Zhang, Q., 2013. Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways. *J. Neurochem.* 124, 15-25.
- Yates, L.A., Norbury, C.J., Gilbert, R.J., 2013. The long and short of microRNA. *Cell* 153, 516-519.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B., Bagni, C., 2003. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112, 317-327.