

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Instituto de Fisiología Celular



**“Análisis de la Expresión de  
microRNAs en Terminales  
Sinápticas Aisladas del  
Cerebro de la Rata Adulta”**

Que para obtener el grado académico de  
**Doctor en Ciencias Biomédicas**

Presenta  
**LIBB Israel Pichardo Casas**

Dr. Luis A. Vaca Domínguez  
Asesor académico

México, D.F.

2012



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.

# Dedicatoria

*A mi familia y seres queridos –con profundo cariño y agradecimiento–,  
a mis amigos –con enorme aprecio–,  
a mis mentores –por su ejemplo–,  
a la Universidad Nacional  
a E.P.B –QEPD–.*

# Agradecimientos

Extiendo mi agradecimiento a los diversos miembros del personal académico y administrativo del Instituto de Fisiología Celular (IFC), del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por su respectiva inversión académica, moral, logística y financiera prestadas para la realización de este proyecto doctoral.

*Caminante, son tus huellas,  
el camino y nada más;  
caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.  
Al andar se hace camino,  
y al volver la vista atrás,  
se mira la senda  
que nunca se ha de volver a pisar,  
caminante, no hay camino,  
sino estelas en la mar.*

*Poema Cantares (fragmento)  
Antonio Machado*

En lo particular a los espíritus más cercanos al laboratorio y aquéllos por añadidura *ad honoris*, por sus ejemplos de vida y acciones que me marcaron definitivamente, e incluyen al Dr. Luis A. Vaca D. –por su invaluable paciencia e inusitada libertad otorgada-, M. en C. Inés Velázquez Quesada -ejemplo de vida, trabajo, honestidad y perseverancia-, M. en C. Mariana Ramos B., M. Alejandro Athie C., M. Gustavo A. M., Dr. C. Fabián Flores Jasso, Dra. S. Eréndira Avendaño V., Dr. Eduardo Martínez M., Dr. V. Julián Valdés R., Drs. Claudia Moreno y Óscar Vivas, M. en C. Alicia Sampieri G., Dr. Agustín Luz M., Dr. Alfonso Salgado A., M. en C. Laura Lascarez, Dra. Cecilia Cubas C., M. en C. Aldo Camacho Z., Dr. Benito Ordaz S., Biol. Ricardo Monroy y las laboratoristas Gloria y Salustia Salgado –por su calidez, alto compromiso y desprendimiento desinteresados-.

A los miembros de mi comité académico, Dr. Luis Padilla N. del IIBm, y Dr. Enrique A. Reynaud G. del IBT por sus valiosos comentarios. Incluyo a los Dres. Fernando López Casillas, Miguel Pérez de la Mora, del IFC; a las Dras. Clorinda Arias y María Sitges del IIBm, Tzvetanka Dimitrova D. del IQ, y Dr. José Reyes del IBT, por su gran apertura académica y por los reactivos proporcionados. Adicionalmente y con especial gratitud, al Dr. Félix Recillas T. y los miembros de su grupo, por la inmensa ayuda material, técnica, académica y también personal que me fueron prestadas.



Al Lic. Rodolfo Paredes D. y demás personal de la unidad de microscopía, a la secretaria del depto. de Biología Celular del IFC Rosario Villaseñor A., al personal de la unidad de microarreglos, biblioteca, bioterio, cómputo, mantenimiento, así como del área de compras nacionales y al extranjero, con particular dedicatoria a la Lic. María del Carmen Mendoza A. por los inmejorables servicios otorgados.

*I'm profoundly thankful to Dr. Ronald P. Hart from the W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience of the Rutgers New Jersey State University at Piscataway, NJ, EUA, -for the unconditional support given in many academical and material aspects invested in this research-. But above all, to his personal commitment and extraordinary trust granted to me at every level. This is extensive to all members of his lab, present at the time, including Loyal Goff, PhD., Jonathan Davila, PhD., Christopher Ricupero, PhD., Mavis R. Swerdel, and Cynthia Camarillo, PhD.*

*"Always keep yourself busy,  
that is the best way for one  
to build character"*

*Dr. Ronald P. Hart  
Colaborador*



Acknowledgements are also given for their very generous contributions to Drs. Bonnie Firestein, Erik Charych, David Denhardt, and Valentin Starovoytov of the Nelson labs division at Piscataway campus. Also, to Drs. Wilma Friedman and Martha Volosin at Rutgers' Newark campus, NJ, USA; Marie T. Filbin and Christine Cain at Hunter College of CUNY, New York, USA; Dr. Sammie Jaffrey from Cornell University, New York, USA; and Dr. Gregory Hannon from Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

Finalmente, con especial énfasis, a Gabriela Zárraga Granados por acompañarme y apoyarme en mis aventuras y avatares, a pesar de los pesares, pero siempre con la enorme fortuna y emoción de seguir sonriendo y compartiendo a su lado.

Israel Pichardo  
Octubre de 2012

I think  
"On my return home, it occurred to me, in 1837, that something might perhaps be made out on this question by patiently accumulating and reflecting on all sorts of facts which could possibly have any bearing on it. After five years' work I allowed myself to speculate on the subject [the Origin of Species], and drew up some short notes; these I enlarged in 1844 into a sketch of the conclusions, which then seemed to me probable: from that period to the present day I have steadily pursued the same object. I hope that I may be excused for entering on these personal details, as I give them to show that I have not been hasty in coming to a decision"...

"... No one ought to feel surprise at much remaining as yet unexplained in regard to the origin of species and varieties, if he makes due allowance for our profound ignorance in regard to the mutual relations of all the beings which live around us. Who can explain why one species ranges widely and is very numerous, and why another allied species has a narrow range and is rare? Yet these relations are of the highest importance, for they determine the present welfare, and, as I believe, the future success and modification of every inhabitant of this world. Still less do we know of the mutual relations of the innumerable inhabitants of the world during the many past geological epochs in its history. Although much remains obscure, and will long remain obscure, I can entertain no doubt, after the most deliberate study and dispassionate judgment of which I am capable... that [the idea of] each species has been independently created is erroneous. I am fully convinced that species are not immutable; but that those belonging to what are called the same genera are lineal descendants of some other and generally extinct species; in the same manner as the acknowledged varieties of any one species are the descendants of that species. Furthermore, I am convinced that Natural Selection has been the main but not exclusive means of modification".

Charles Darwin,  
The Origin of Species (fragment),  
1859.

# Índice

	Pág.
<b>Acrónimos y Abreviaturas</b>	9
<b>Resumen</b>	11
<b>Abstract</b>	12
<b>Introducción</b>	13
i. Anatomía de la Neurona y de los Contactos Sinápticos	16
ii. Síntesis de Proteínas en Dendritas.	20
<b>Capítulo I</b>	
<b>MicroRNAs en Eucariontes</b>	
1.1 Los microRNAs Pertenecen a una Gran Familia de RNA No Codificante (ncRNA) con Funciones Diversas	26
1.2 Nomenclatura, Definición Estructural y Operativa de los microRNAs	31
1.3 Cascada de Procesamiento de microRNAs en Eucariontes	38
<b>Capítulo II</b>	
<b>MicroRNAs del Sistema Nervioso</b>	
2.1 Función Durante el Desarrollo Embrionario, en el Mantenimiento del Fenotipo Neuronal y en la Plasticidad Sináptica	42
2.2 Expresión Neuroanatómica y Subcelular Variable de microRNAs Neuronales	46
2.3 El Modelos de Sinaptoneurosomas (SN) como Aproximación al Estudio de microRNAs Sinápticos	51
<b>Capítulo III</b>	
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	53
<b>Capítulo IV</b>	
<b>Resultados I. Validación del Modelo de SN para Evaluar la Expresión de microRNAs Sinápticos</b>	
4.1 Microscopía Electrónica	54
4.2 Marcadores de Proteína	58
4.3 Integridad y Pureza del RNA en SN	60
4.4 Dot blot	64
4.5 Northern blot I	67
4.6 Amplificación Mediante qRT-PCR	69
4.7 Discusión	71
<b>Capítulo IV</b>	
<b>Resultados II. Análisis Global de Expresión de microRNAs por Microarreglo</b>	
5.1 Análisis de Expresión en Cerebro Completo	76
5.2 Patrones Neuroanatómicos Divergentes de Expresión de microRNAs	84
5.3 Validación por qRT-PCR	93

5.4 Northern blot II	94
5.5 Análisis de Expresión de microRNAs en Dendritas Microdisecadas por Láser (LCMD)	98
5.6 Discusión	99
<b>Capítulo VI</b>	
<b>Resultados II. Cambios de Expresión de microRNAs en Función de la Actividad Neuronal</b>	
6.1 El Modelo de Epileptogénesis Inducida por Ácido Kaínico (KA)	106
6.2 Análisis por qRT-PCR	108
6.3 Northern blot III	110
6.4 Efecto Despolarizante por Alto Potasio en SN <i>in vitro</i>	111
6.5 Discusión	113
<b>Capítulo VII</b>	
<b>Conclusiones y Perspectivas</b>	
7.1 El Modelo de SN es Eficaz para el Análisis de Expresión de microRNAs Sinápticos	118
7.2 La Expresión de microRNAs en el Cerebro es Regionalizada	119
7.3 La Expresión de microRNAs Sinápticos es Regionalizada y Semi-independiente del Soma Neuronal	120
7.4 La Actividad Epileptogénica Inducida por KA Altera la Expresión de microRNAs Sinápticos Autónomamente	121
7.5 La Despolarización Prolongada con Alto Potasio Modifica la Abundancia de microRNAs Sinápticos <i>in vitro</i>	121
<b>Capítulo VIII</b>	
<b>Materiales y Métodos</b>	
8.1 Protocolo de Purificación de SN Enriquecidos en PSDs	123
8.2 Purificación y Cuantificación de RNA	126
8.3 Análisis de la Integridad del RNA por PAGE	128
8.4 Electroforesis Capilar en Chip (Bioanalyzer, Agilent)	130
8.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	132
8.6 Western blot	133
8.7 Dot blot (DB)	136
8.8 Northern blot (NB)	138
8.9 Marcaje de RNA para Análisis de Microarreglo	141
8.10 Análisis Estadístico Aplicado a los Datos de Microarreglo	142
8.11 Método Taqman (ABI-Life Technologies) para qRT-PCR	145
8.12 Método NCode (Life Technologies) para qRT-PCR	145
8.13 Microdissección y Captura con Láser (LCMD)	146
8.14 Epileptogénesis Inducida con Ácido Kaínico	147
8.15 Protocolo de Despolarización Prolongada con Alto Potasio en SN <i>in vitro</i>	148



## **Apéndice I**

### **Amortiguadores y Soluciones de Trabajo**

A. Soluciones para Purificación de SN	149
B. Buffers para WB	150
C. Buffers Comunes para DB y NB	151
D. Buffers de DB	152
E. Buffer de Lavado para NB	152
F. Solución de Desnudamiento de Membranas de Nylon Nitradas (Hybond) para NB	152
G. Soluciones para Despolarización de SN con Alto Potasio	153

## **Apéndice II**

Oligonucleótidos	155
------------------	-----

## **Apéndice III**

Tablas Suplementarias	157
-----------------------	-----

## **Apéndice IV**

Índice de Tablas y Figuras	168
----------------------------	-----

## **Apéndice V**

Artículo Original	170
-------------------	-----

## **Bibliografía**

184
-----

# Acrónimos y Abreviaturas\*

Sigla o Abrev.	Significado
3' UTR	<b>[3' untranslated region]</b> Región no traducible del extremo 3' de RNAs codificantes
4F9	Anticuerpo comercial ( <i>Santa Cruz Biotechnologies</i> ) que reconoce a los miembros 1 a 4 de la familia de Argonauta en rata, ratón y humano
5' UTR	<b>[5' untranslated region]</b> Región no traducible del extremo 5' de RNAs codificantes
Ago	<b>[Argonaute; eIF2C]</b> Proteínas efectoras en RISC (existen 8 miembros en mamífero; Ago1-4, Mili, Miwi, Piwi, Zwi); que participan en la vía del RNAi y miRNAs. Contienen un dominio de unión a RNA llamado PAZ y otro con actividad de endonucleasa llamado PIWI, aunque sólo Ago2 presenta actividad endonucleolítica en mamífero.
Bs	<b>[Brain stem]</b> Tallo cerebral o médula oblongada, fracción total
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
Cap	Trifosfato de 7-metil-guanina con enlace 5'-5' (7m-pppG), nucleótido inicial en extremo 5' de mRNAs eucarióticas
Cb	Cerebelo, fracción total
cDNA	<b>[coding DNA]</b> DNA codificante
Ce	Cerebro, fracción total. No incluye bulbo olfatorio, cerebelo ni tallo cerebral
Ct	<b>[Cycle threshold value]</b> Valor del ciclo límite en qRT-PCR
Cx	Corteza, fracción total
Dcp1a/Dcp2	Complejo de proteínas con actividad exonucleolítica que escinde el 'Cap' de los mRNAs en eucariotes
dCt	<b>[delta Ct]</b> (Ct transcrito experimental)-(Ct transcrito control ó de Referencia, e. g., Gapdh o $\beta$ -actina)
ddCt	<b>[delta delta Ct]</b> (dCt condición experimental)-(dCt condición control)
DGCR8	<b>[DiGeorge syndrome Critical Region 8]</b> Homólogo de Pasha en mamífero. Proteína del complejo microprocesador asociado a Drosha o Drosha
Dicer	Proteína de maduración de miRNAs, de pre-miRNA (60-100nt) a miRNA (21nt)
dIP-bodies	<b>[dendritic P-body-like P-bodies]</b> Cuerpos de procesamiento dendríticos semejantes a P-bodies
DNA	Siglas en inglés del Ácido Desoxiribonucleico ó ADN; su uso también es aceptado en español según la Real Academia de la Lengua Española (RAE)
Drosha	Alias: Drosha en mamíferos; Proteína nuclear de maduración de pri-miRNAs (<100nt) a pre-miRNAs (60-80nt)
dsRNA	<b>[Double-stranded RNA]</b> RNA de cadena doble
eIF2C1-4	Proteínas de la familia de Argonauta, existen cuatro isoformas (Ago1-4)
eIF2C2	Ago2 ó Slicer; miembro de la familia de Ago con actividad endonucleolítica de microRNAs y mRNAs.
eIF4	Factor 4 del inicio de traducción eucariótico, se asocia al Cap
EtBr	<b>[Ethidium bromide]</b> Bromuro de etidio, colorante fluorescente intercalante
FMRP	<b>[Fragile-X mental retardation protein]</b> Proteína del Síndrome de Retraso Mental asociado al Cromosoma X Frágil; parte del miRISC
g	Gramo
x g	Gravedad, magnitud usada en centrifugación (1000 x g)
Gapdh	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
Gfap	<b>[Glial-fibrillary acidic protein]</b> Proteína ácida fibrilar glial.
GW-bodies	<b>[GW182 containing P-bodies]</b> Cuerpos de procesamiento que contienen a la proteína GW-182
Hairpin	<b>[Pasador]</b> Estructura secundaria en forma de tallo y asa característica de los pre-miRNAs
Hp	<b>[Hippocampus]</b> Hipocampo, fracción total
KA	<b>[Kainic Acid]</b> Ácido kainico ó kainato
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones (1Dalton=masa en g de un átomo de Hidrógeno)
L	Litro
LCMD	<b>[Laser-capture micro-dissection]</b> Microdissección y captura con láser
LE	Ratas de la cepa Long-Evans
LTP/LTD	<b>[Long-term potentiation/depression]</b> Potenciación/Depresión a largo plazo
M	Molar (g mol/L)
MAANOVA	<b>[Microarray analysis of variance]</b> Análisis de varianza de microarreglos
Mbp	<b>[Myelin basic protein]</b> Proteína básica de mielina
Mcs	Fracción microsomal, retículo endoplásmico fragmentado
MES	<b>[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid]</b> Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
$\mu$ g	Microgramo
miRISC	<b>[miRNA-induced silencing complex]</b> Complejo de Silenciamiento Inducido por microRNAs. Contiene al menos Ago2:miRNA/FMRP/GW182/PABP2. Inhibe la síntesis de proteínas impidiendo el reclutamiento de eIF4 durante la iniciación o bien por incorporación del inhibidor endógeno eIF6.
miRNA	<b>microRNA ó miR</b> , fragmentos de RNA de 19-24nt de longitud que favorecen arresto traduccional/degradación de mRNAs parcialmente complementarios, usual pero no exclusivamente, en su extremo 3' UTR. Tienen un extremo 5'-P y uno 3'-OH.

\* He preferido mantener aquéllas abreviaturas y siglas como han sido publicadas originalmente en inglés, para evitar confundir al lector si precisa consultar la literatura asociada a este trabajo, especialmente en la nomenclatura que se refiere a las variantes de RNA y de algunas proteínas asociadas, así como de las técnicas y reactivos de uso frecuente en el campo de los microRNAs.

Sigla o Abrev.	Significado
miRNP	[miRNA-containing ribonucleoprotein] Complejo ribonucleoproteínico que contiene microRNAs
miRtrons	miRNAs derivados de regiones intrónicas de los transcritos primarios
MOPS	[3-N morpholino-propanesulfonic acid] Ácido 3-(N-morfolin)propanosulfónico
MPSS	[Massively parallel signature sequencing] Secuenciación masiva multiparalela con código de barras (oligo específico de identificación de secuencia)
MRE	[miRNA recognition element] Elemento de reconocimiento de miRNAs
mRNA	[messenger RNA] RNA mensajero
miR*	[miRNA star sequence] Secuencia estrella o pasajera que es complementaria a un miRNA en el precursor ( <i>hairpin</i> ) y más tarde en el dúplex.
MyIn	[Myelin] Fracción mielínica
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
ncRNA	[non-coding RNA] Familia de RNAs no codificantes
NGs	[Neuronal granules] Gránulos neuronales
NMDAR1	[N-methyl-D-aspartate type glutamate receptor subunit 1]. Subunidad1 del receptor de glutamato tipo NMDA
nt	Nucleótido(s)
Ob	[Olfactory bulb] Bulbo olfatorio, fracción total
Oligo	[Primer] Oligonucleótido o cebador
Pasha	Homólogo de DGCR8 en <i>Drosophila</i> ; Proteína asociada a Drosha que forman el complejo microprocesador necesario para definir la longitud de pri-miRNAs.
PAZ	[PAZ/Ago/ZWILLE domain] Dominio de unión a RNA, en particular en el extremo sobresaliente 3'-OH de siRNAs o miRNAs
P-bodies	[Processing bodies] Cuerpos de procesamiento
PBS	[Phosphate buffered saline] Amortiguador isotónico de fosfatos
piRNA	[PIWI-associated RNAs] RNAs (30nt) asociados a la proteína PIWI
PIWI	[P-element induced in wimpy testis] Dominio endonucleolítico del tipo RNasa-H compartido entre las proteínas PIWI y Ago
Poli(A)	Cola de poliadenina del extremo 3' UTR de mRNAs eucarióticos, usualmente añadida por la poli-A-polimerasa
PABP2	[Poly-A Binding Protein 2] Proteína que se une a las colas de poliadeninas de mRNAs necesaria para iniciar la traducción. Facilita la circularización de los mRNAs uniéndose a eIF4G del complejo de iniciación unido al 5'-cap
pre-miRNAs	Precursor de miRNAs de estructura secundaria de tallo y asa (60-100nt de longitud; sustratos de Dicer)
pri-miRNAs	Precusores primarios de miRNAs (>100nt, hasta varias kb de longitud), sustrato de Drosha)
PS/T	[(Sinaptoneurosomas/Fracción Total)x100]; (%), Coeficiente de retención en sinaptoneurosomas
PSD	[Post-synaptic density] Densidad post-sináptica
Psd-95	[Post-synaptic density protein 95]; Proteína de 95kDa de la densidad post-sináptica, proteína de andamiaje/anclaje.
qRT-PCR	[quantitative real-time polymerase chain reaction] Cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa de DNA
RISC	[RNAi-induced silencing complex] Complejo de Silenciamiento Inducido en el RNAi; Ago2 es el núcleo efector endonucleolítico
RNA	Siglas en inglés del Ácido Ribonucleico o ARN; su uso también es correcto en español según la Real Academia de la Lengua Española (RAE)
RNAi	[Interfering RNA] RNA de interferencia
RQ	[Relative Quantification] Método de cuantificación relativa en qRT-PCR. Se calcula como $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ .
rRNA	RNA ribosomal
S[Xx]	Fracción sinaptoneurosomal; [Xx] indica la abreviatura de la región neuroanatómica; e. g., Hp, Hipocampo.
SD	[Standard Deviation] Desviación estándar
SDS	[Sodium Dodecyl Sulphate] Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	[SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis] Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida/SDS.
SG	[Stress granules] Gránulos de estrés. Complejos multiprotéicos cuya función es reprimir temporalmente la síntesis de proteínas mediante agregación de mRNAs. Estos gránulos a veces son usados para la translocación intracelular de dichos mensajeros.
siRNA	[small interfering RNA] RNA pequeño de interferencia. RNA de doble hebra con extremos 5'-P y 3'-OH de dos nucleótidos desapareados. Su secuencia es totalmente complementaria a un RNA blanco
SN	Sinaptoneurosomas ó fracción sinaptoneurosomal. Fracción enriquecida en terminales post-sinápticas con menor presencia de sinapsis completas.
snRNAs	[Small nuclear RNAs] RNAs necesarios durante el splicing
snoRNA	[small nucleolar RNA] RNA pequeño nucleolar, involucrados en procesos como la pseudouridilación de tRNAs
Syn	[Synaptosomes] Sinaptosomas; sinapsis completas con elementos pre- y post-sinápticos unidos, purificados mediante centrifugación en gradiente.
Splicing	Proceso de escisión de intrones y empalme de exones en los mRNAs codificantes; proceso de maduración de los transcritos primarios en el núcleo
SSC	[Saline-sodium citrate] Amortiguador de citrato de sodio
ssRNA	[Single-stranded RNA] RNA de cadena sencilla
Sv2	[Synaptic vesicles protein 2] Proteína de vesículas sinápticas 2
TEM	[Transmission electron microscopy] Microscopía de transmisión de electrones
TRBP	[Trans-activation Responsive RNA Binding Protein] Alias: TARBP2 en mamífero ó LOGS en <i>Drosophila</i> . Componente del RLC. Proteína necesaria para cargar el miRNA maduro en RISC.
TRIS	[(Hydroxymethyl)aminomethane buffer] Amortiguador de (Hidroximetil)aminometano
tRNA	RNA de transferencia
TuJ1	Alias de la proteína Tubulina beta 3 (Tubb3), marcador neuronal de citoesqueleto.
U6	RNA no codificante integrante del espliceosoma, usualmente localizado en el núcleo celular
Xrn1	Exorribonucleasa 5'-3' que se asocia a los P-bodies para la degradación de mRNAs

# Resumen

Los microRNAs o miRNAs son fragmentos endógenos de RNA no codificante de 19-24 nt de longitud, altamente conservados filogenéticamente, que participan en el silenciamiento de la expresión génica a nivel post-transcripcional de al menos la mitad del transcriptoma de metazoarios. Los miRNAs se hibridan parcialmente al extremo 3' no traducible de mRNAs complementarios, mediante el complejo multiproteico miRISC, el cual promueve el arresto traduccional y la degradación de los blancos.

Algunos miRNAs están involucrados fuertemente en la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario o participan en eventos patogénicos como el cáncer. En neuronas los miRNAs participan activamente en la diferenciación y mantenimiento de su fenotipo, y muchos son expresados diferencialmente en distintas áreas del cerebro. Recientemente se ha demostrado que su localización subcelular en dendritas neuronales juega un papel preponderante en la función y estructura sináptica. Esta subpoblación de miRNAs puede regular la expresión local de al menos 2, 500 mRNAs colocalizados en las mismas estructuras, los cuales codifican para proteínas que mantienen la estructura y señalización apropiadas en la post-sinapsis.

En este trabajo demostramos no sólo que una gran cantidad de miRNAs neuronales presentan una localización sináptica con un componente neuroanatómico variable, sino también que su abundancia relativa es regulada local y selectivamente bajo condiciones de despolarización prolongada *in vivo*, bajo la actividad epileptogénica inducida por la administración sistémica de ácido kaínico (KA), en un modelo reminiscente de estados de despolarización prolongada que favorecen la síntesis de proteínas localmente.

La identidad y abundancia de miRNAs sinápticos fueron evaluadas en fracciones sinaptoneurosomales aisladas de diferentes regiones del cerebro de la rata adulta, mediante análisis por microarreglo, qRT-PCR y Northern blot. Los hallazgos demuestran que 1) el enriquecimiento relativo en sinapsis es variable de acuerdo con cada miRNA individualmente, lo que sugiere una localización activa hacia elementos post-sinápticos que no depende de difusión simple; 2) este patrón es específico de tejido, 3) la actividad despolarizante *in vivo* altera la abundancia sináptica de miRNAs localmente.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que el ajuste de la abundancia de miRNAs en la sinapsis derivado del incremento de la actividad sináptica, puede ser clave para los cambios adaptativos requeridos de corto a largo plazo, mismos que afectan procesos celulares como la remodelación dendrítica, la plasticidad sináptica, y finalmente procesos de alto orden como la memoria y el aprendizaje. Adicionalmente estos hallazgos pueden servir como referencia para la comprensión de estados patogénicos asociados a la función de miRNAs con actividad sináptica, basados en su abundancia local y regional en el cerebro adulto.



# Abstract

**M**icroRNAs or miRNAs are highly conserved endogenous non-coding RNAs 19-24 nt in length, involved in post-transcriptional gene silencing of nearly one third of the metazoan transcriptome. These molecules bind to partially complementary sequences in the 3' UTR of target mRNAs, mediated by the multi-protein complex miRISC, promoting translational arrest and mRNA decay.

The miRNAs are involved in processes like cell differentiation during the embryo development, and participate in pathogenic states like cancer. In neurons, some miRNAs show an active role in their differentiation and in phenotype maintenance, and many are differentially expressed across the brain. However, recent evidence indicate that their subcellular localization towards the synapse, especially at the post-synaptic portion in the dendrites, play an important role in synaptic structure and function. This subpopulation of miRNAs may target many up to 2, 500 mRNAs, that co-locate to the same structures in rodents, which code for proteins required for proper shaping and signaling at the post-synaptic element.

Here we provide evidence indicating not only that a great number of neuronal miRNAs display synaptic localization with a neuroanatomical component, but also that their relative abundance is locally and selectively regulated under depolarizing conditions *in vivo*, under epileptogenic activity induced by systemic kainic acid (KA) administration, in a model reminiscent of prolonged depolarization states that are known to elicit changes in synaptic protein synthesis.

The identity and abundance of synaptic miRNAs was assessed in synaptoneurosomal fractions (SN) isolated from different neuroanatomic structures of the adult rat brain, by microarray analysis, qRT-PCR, and Northern blot methods. Our findings show that 1) synaptic enrichment is variable according to each miRNA evaluated, underlying an active localization mechanism towards post-synaptic elements; 2) such pattern is tissue-specific; 3) the increased depolarizing activity *in vivo* alter the synaptic abundance of miRNAs.

These observations may support the notion that the adjustment in the abundance of miRNAs in the synapse derived by increased synaptic transmission, may be key for the short-to-long term changes required for proper synaptic adaptation, thus affecting cellular processes like dendritic reshaping, synaptic plasticity, and ultimately high-order phenomena such as memory and learning. Finally, these findings may also provide insights for the comprehension of pathogenic states involving altered synaptic function of miRNAs based on their local and regional expression in the adult brain.

# INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se defiende la tesis de que los **microRNAs** (miRNAs) son moléculas que forman parte de las sinapsis de las neuronas y que esta distribución subcelular también es variable entre diferentes estructuras neuroanatómicas del sistema nervioso central de la rata adulta. Además, se presentan algunas evidencias acerca de que la expresión de estas moléculas en las **sinapsis** es parcialmente autónoma del resto de la neurona y altamente modulable dentro del contexto del aumento prolongado de actividad eléctrica neuronal<sup>1</sup>.

En 2006, Gerhardt Schratt y colaboradores describieron la función de un miRNA en el contexto de la regulación morfológica de las **espinas dendríticas** en **neuronas** hipocámpales de ratón<sup>2</sup>. Este miRNA, miR-134, fue el primero que se descubrió con una función muy precisa a nivel sináptico, regulando la expresión local de la cinasa LIMK1 que es necesaria para el rearme del citoesqueleto de actina, lo que favorece la maduración estructural de las espinas dendríticas en presencia del factor neurotrófico BDNF. Desde entonces se han encontrado varios miRNAs con funciones regionalizadas en las sinapsis y esto ha impulsado nuevamente el campo de investigación en el área de regulación localizada de la síntesis de proteínas en neuronas<sup>†</sup>. Aunque se han detectado poco más de un centenar de miRNAs en dendritas, la función de cada uno sigue siendo objeto de investigación.

La idea de buscar miRNAs circunscritos a la vecindad sináptica no fue gratuita. Ya desde 2003 se publicaron varios trabajos que sugerían que los miRNAs podían ser elementos sinápticos. Uno de ellos fue el de Jin et al., y Warren et al., quienes encontraron una variedad de miRNAs asociados a la proteína FMRP en neuronas de *D. Melanogaster*<sup>3,4</sup>. Esta proteína tiene una distribución somato-dendrítica y se asocia al retraso mental en humanos, ratones y la mosca de la fruta, en el contexto de la inestabilidad del cromosoma X denominado "frágil", causante de al menos la mitad de los casos de retraso mental en humanos<sup>5</sup>. En mutantes hipomórficos, las espinas dendríticas tienden a ser hipernumerarias<sup>3</sup>, por lo que FMRP en condiciones normales ayuda a regular estas estructuras a través de la inhibición de la síntesis local de proteínas impidiendo la sobreexpresión de genes sinápticos<sup>6</sup>.

Por otro lado, Murashov et al., mostraron que la maquinaria del complejo de silenciamiento inducido por RNAi (**RISC**) está presente y es activa en axones de la espina dorsal de la rata<sup>7</sup>. Finalmente, Lugli et al. mostraron que tanto **Ago2** y **Dicer** están enriquecidos en densidades post-sinápticas de neuronas hipocámpales de ratón<sup>8</sup>, e incluso, que la actividad endonucleolítica de Dicer aumenta cuando es fragmentado por la proteasa calpaína en respuesta a un incremento de calcio. Todo ello era indicativo del papel localizado de miRNAs en sinapsis. Más tarde se encontrarían más ejemplos de miRNAs maduros detectables en fracciones sinaptoneurosomales, así como algunos de sus precursores que mostraban una amplia expresión local.

Estas moléculas resultan sumamente interesantes no sólo por su habilidad pleiotrópica de regulación de múltiples genes en una variedad de procesos celulares y fisiológicos, como el desarrollo embrional o el cáncer, sino también porque en el cerebro los miRNAs se proponen como agentes centrales en procesos complejos como la memoria y el aprendizaje<sup>9, 10</sup>, e incluso en la aceleración evolutiva de la cognición en primates<sup>11</sup>. Adicionalmente se les ha asociado a la aparición o latencia de algunas enfermedades neurológicas como en el Alzheimer, mal de Parkinson, autismo, síndrome de Down, etc<sup>12</sup>. En todos estos fenómenos, la síntesis local de proteínas a nivel sináptico es un factor fundamental<sup>13</sup>.

---

<sup>†</sup> Este descubrimiento fue publicado seis meses después de que este proyecto había iniciado.

Gracias al descubrimiento de que los miRNAs pueden estar localizados en procesos membranosos muy alejados del núcleo, justamente en la vecindad post-sináptica<sup>14, 15</sup>, es que se les adjudica un papel preponderante en el control de la síntesis local de proteínas. En este sentido, se propone que **los miRNAs sinápticos funcionan como 'switches' espacio-temporales que permiten una adaptación selectiva de las sinapsis ante cambios robustos en la señalización neuronal**<sup>16, 17</sup>.

Desde hace una década ya se sabía que los miRNAs tienen un patrón de expresión específico de tejido<sup>18, 19</sup> y en el cerebro existen docenas que son característicos de neuronas<sup>20-23</sup>, además algunas poblaciones muestran una expresión discreta en diferentes áreas del sistema nervioso<sup>24, 25</sup>. No obstante, la diversidad y características de los miRNAs sinápticos en general era desconocida, en particular en el sistema nervioso central de mamíferos adultos, y poco se sabía si el tipo y número de estas moléculas es homogéneo en el cerebro, algo poco probable dada su heterogeneidad.

En este sentido el presente trabajo resulta novedoso y abona en el estudio de los miRNAs neuronales, ya uno de los objetivos que le dieron origen era precisamente la caracterización de la expresión de miRNAs en sinapsis aisladas de diferentes áreas del cerebro de la rata adulta. Aquí se demuestra que los miRNAs neuronales, como muchas otras moléculas, son concentrados selectivamente en sitios muy específicos dentro de la célula (**microdominios**), posiblemente como una adaptación para aumentar la eficacia sináptica local y adaptar sus funciones de respuesta y señalización de forma autónoma. Además, se presenta por vez primera un mapa de su distribución neuroanatómica a nivel sináptico, lo cual puede ayudar a identificar las posibles interacciones con los mRNAs blanco predichos colocalizados *in situ*, y por tanto establecer relaciones pareadas de regulación que sean relevantes para un proceso particular.

Pero aún más interesante, y tal vez de mayor trascendencia, es que se postula que la expresión local de los miRNAs sinápticos tiene un componente regulatorio, que responde al incremento sostenido de la **actividad eléctrica neuronal *in vivo***, en el marco de un modelo de hiperexcitación neuronal prolongada durante la inducción de **epilepsia**. Estos cambios, independientes del resto de la neurona, pueden relacionarse con procesos como la plasticidad sináptica, y tienen implicaciones en el aprendizaje y la memoria.

Para demostrar estas observaciones, usamos un modelo de sinapsis aisladas conocidas como **sinaptoneurosomas (SN)**, derivados del cerebro de la rata adulta, como una aproximación experimental para estudiar el contenido de RNA en dichas fracciones. Estos componentes subcelulares tienen la particularidad de estar enriquecidos en **elementos post-sinápticos**, que en su mayoría corresponden a espinas dendríticas.

Aunque este método se basa la centrifugación en gradientes isopícnicos (densidad variable) de sacarosa, los datos que se presentan aquí son el resultado de un protocolo adaptado, con el cual se obtuvo el máximo grado de pureza posible basado en la medición de la abundancia de marcadores de proteína y RNA así como en la morfología ultraestructural de tales fracciones.

Si bien se reconoce que este sistema no goza de tener un grado de pureza absoluta, como ocurre en todos los métodos basados en centrifugación, ciertamente brinda una aproximación más detallada de la expresión localizada de estas y otras moléculas.

Los resultados que se mostrarán a continuación están explicados en los capítulos 4 a 6, ordenados en función de tres temas principales:

- 1) La validación del modelo de SN,
- 2) El análisis de la expresión de miRNAs en dichas fracciones del cerebro completo o de cinco regiones especializadas,

3) El efecto de la epilepsia inducida sobre miRNAs sinápticos.

Para comprender los términos y procesos que se tratan en esta tesis consideré necesario mencionar primero algunas nociones básicas sobre la estructura y función de las sinapsis, enunciando algunos aspectos relevantes de anatomía neuronal y de las sinapsis químicas para dar un contexto estructural<sup>‡</sup>.

Posteriormente haré un recuento del papel preponderante que juega la síntesis de local de proteínas en **dendritas**, en relación con la regulación estructural y funcional de las sinapsis. Asimismo estos conceptos serán asociados con el papel activo de los miRNAs sobre el control de la traducción, especialmente en mamíferos, y de cómo son capaces de regular la expresión de mRNAs dendríticos de forma local y autónoma.

Finalmente se describirán algunos resultados de experimentos relacionados con el aumento de la actividad neuronal, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre la expresión local de miRNAs y **mensajeros de localización dendrítica**.

Cada capítulo con datos experimentales contiene una sección de discusión al final de cada uno, con la idea de enfocar el contraste entre los datos publicados en la literatura y mis resultados, con la idea de facilitar su revisión.

Como en todo trabajo de investigación siempre surgen nuevas preguntas, algunas de las cuales se abordan en la sección de conclusiones (en donde se enlistan de forma rápida los hallazgos de esta tesis), y se plantean en forma de perspectivas asociándolas con algunas estrategias novedosas para poder abordarlas en un futuro.

Este trabajo termina con una serie de metodologías precisas que fueron aplicadas en este proyecto, por si el lector se interesa en consultarlas según crea conveniente.

---

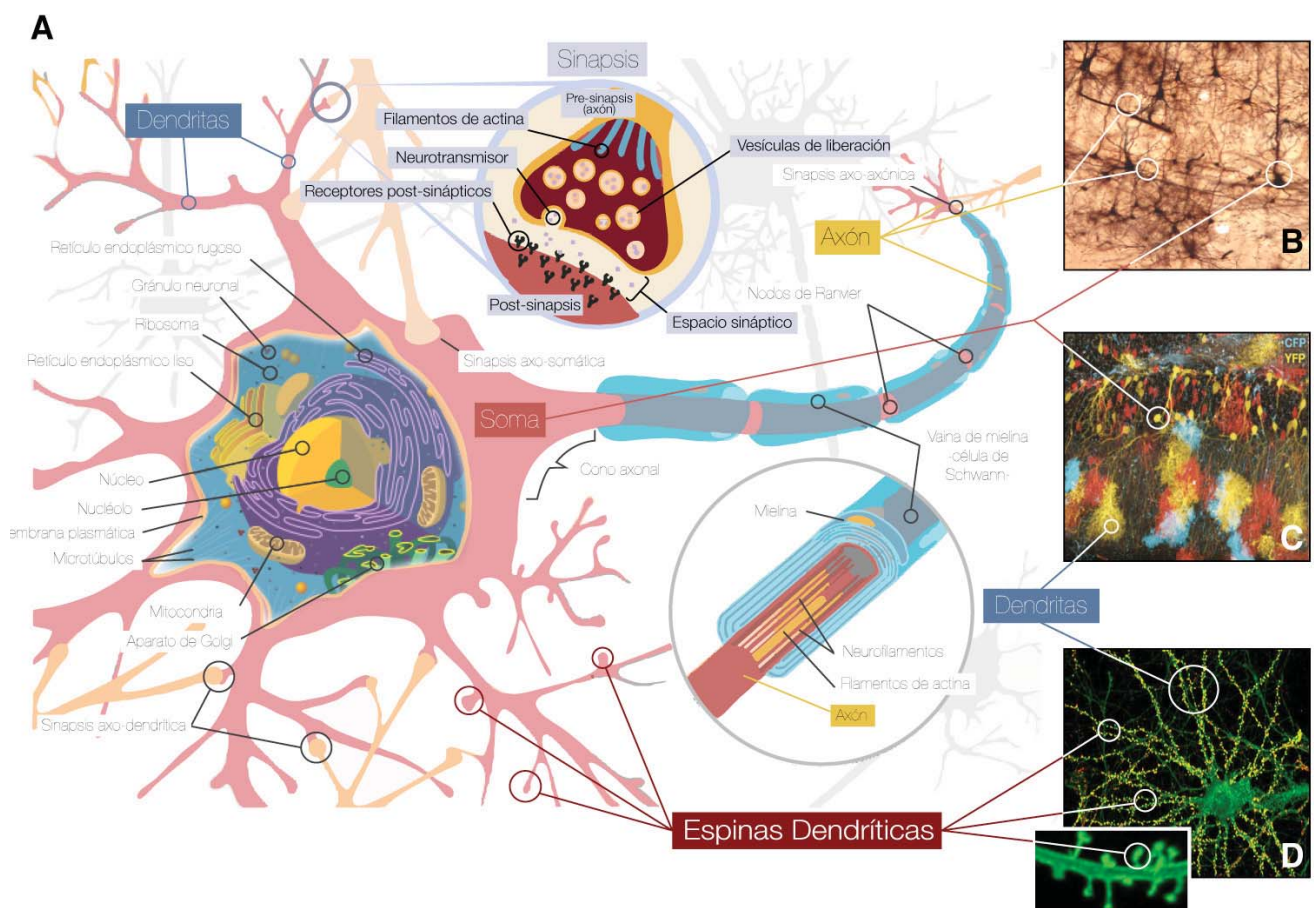
<sup>‡</sup> Estos conceptos también serán importantes más adelante para entender la nomenclatura de la preparación experimental que se utilizó en este proyecto.



## i. Anatomía de la Neurona y de los Contactos Sinápticos.

Hoy en día se acepta que las funciones nerviosas tienen una base citoarquitectónica, definida por la forma en la que sus nodos (**neuronas**) se interconectan unos con otros y que, cuando operan en conjunto, favorecen la salida de respuestas determinadas. Estas pueden ser dadas en forma de una reacción sensorio-motora, visuo-auditiva, gustativa, de secreción de una hormona, o bien en forma de un comportamiento o de una respuesta cognitiva. Así, en el cerebro, las neuronas se han adaptado de tal manera que las funciones nerviosas integradas se dan en áreas focalizadas para procesar cada tipo de estímulo y en otras para integrarlos<sup>26</sup>.

Los mensajes entre las neuronas viajan en forma de señales eléctricas y químicas, que incluso pueden afectar el estado de expresión genética de acuerdo con el tipo e intensidad de tales señales, las cuales se propagan a través del citoplasma y de los procesos membranales extendidos conocidos como **dendritas y axones** (Fig. 1).



**Figura 1. Anatomía de una Neurona y de los Contactos Sinápticos.** (A) En el soma o cuerpo celular se localiza el núcleo donde se sintetizan y procesan los mRNAs, algunos de los cuales son transportados a las dendritas a través de gránulos no membranosos llamados gránulos neuronales (NGs). El flujo de información eléctrica siempre se da desde el árbol dendrítico hacia el axón, pero si la despolarización es suficientemente alta en la zona del cono axonal, se origina un potencial de acción que se propaga a la terminal del axón en donde se liberan los neurotransmisores y se estimula a la neurona post-sináptica. Rodeando a las neuronas se encuentra la glia, un grupo de células neurofórmes que poseen funciones de alimentación, soporte y regulación sináptica (e. g., recaptura de neurotransmisores), cuyos procesos membranales están en estrecha cercanía a los contactos sinápticos. Tal es el caso de las células de Schwann que envuelven a los axones en procesos ricos en mielina (azul) para facilitar la transmisión del impulso eléctrico. Modificado de [http://andromeda.rutgers.edu/~huskey/108s09\\_1ec.html](http://andromeda.rutgers.edu/~huskey/108s09_1ec.html). (B) Microscopía de contraste de una rebanada de corteza cerebral de mono *Rhesus*, teñida con la técnica de Golgi. (C) Microscopía confocal de hipocampo de rata que expresa variantes de GFP en un modelo transgénico conocido como 'rainbow' donde se destaca cada arborización individual (modificado de REF). (D) Microscopía confocal de una neurona hipocámpal cultivada *in vitro*, teñida con anticuerpos anti-sinapsina (amarillo) y anti-Psd-95 (rojo). Los puntos de colocalización se observan en color naranja e indican los sitios de contacto entre las otras neuronas. Modificado de [http://www.cco.caltech.edu/~mbklab/gallery\\_images/Neu\\_Syn/Psd-95%20and%20Synapsin.jpg](http://www.cco.caltech.edu/~mbklab/gallery_images/Neu_Syn/Psd-95%20and%20Synapsin.jpg). La inserción es un acercamiento a una dendrita donde se aprecian varias espinas dendríticas de diferentes estados de maduración. Modificado de <http://www.hifo.uzh.ch/research/PastResearchGroups/streit/interest.html>.

Cada nodo se comunica en lenguajes determinados por la frecuencia e intensidad de estímulos electroquímicos, y a diferencia de lo que se postulaba hace menos de 30 años, su interconectividad y eficiencia de transmisión son altamente modulables en tiempo y espacio, lo que las hace adaptables, de acuerdo con las necesidades del organismo. A este proceso adaptativo se le denomina **plasticidad sináptica**<sup>26</sup>.

Los circuitos neuronales se establecen cuando dos o más neuronas se encuentran interconectadas mediante una o más **sinapsis** que ayudan al establecimiento de redes o circuitos en el cerebro. Éstas pueden ocurrir en el soma, en el axón o en las dendritas y se denominan en función del elemento contactante y la parte contactada (e. g., sinapsis axo-dendrítica o dendro-dendrítica). Las sinapsis axodendríticas suelen ser las más frecuentes en el cerebro de mamíferos. En éstas, el elemento pre-sináptico (axón) se extiende hasta que contacta a las pequeñas proyecciones en la membrana de la dendritas conocidas como **espinas dendríticas**.

La comunicación se logra modulando la frecuencia y amplitud de los impulsos eléctricos por medio de la regulación local de la expresión de receptores de neurotransmisores y otros canales iónicos en la membrana post-sináptica.

A mediados del siglo pasado Donald Hebb y colaboradores postularon que la conectividad neuronal depende de la tasa de disparo de una neurona que conecta con otra y de los cambios químicos y morfológicos que ocasiona en ambas. Ello proporciona una mayor eficiencia en su interconexión y consolida verdaderos circuitos especializados y altamente adaptativos<sup>27</sup>.

A este postulado se le llamó la teoría del ensamblaje celular o hebbiana y fue enunciada de la siguiente forma:

*"Let us assume that the persistence or repetition of a reverberatory activity (or "trace") tends to induce lasting cellular changes that add to its stability.... When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased".*

Esta teoría, en principio correcta, permite entender cómo se adaptan circuitos completos para establecer una salida congruente a partir de una serie de estímulos repetitivos que pueden provenir de estímulos ambientales, o bien de otras neuronas que reciben un mensaje particular. Explica además que para que ello ocurra se requiere de una serie de cambios en sucesión para construir y mantener redes apropiadas, ya sea durante el desarrollo embrionario o durante la plasticidad sináptica necesaria en el **aprendizaje** y la **memoria** en el adulto<sup>28</sup>. Pero lo más importante es que enfoca la importancia de estas conexiones como el sitio activo de adaptación.

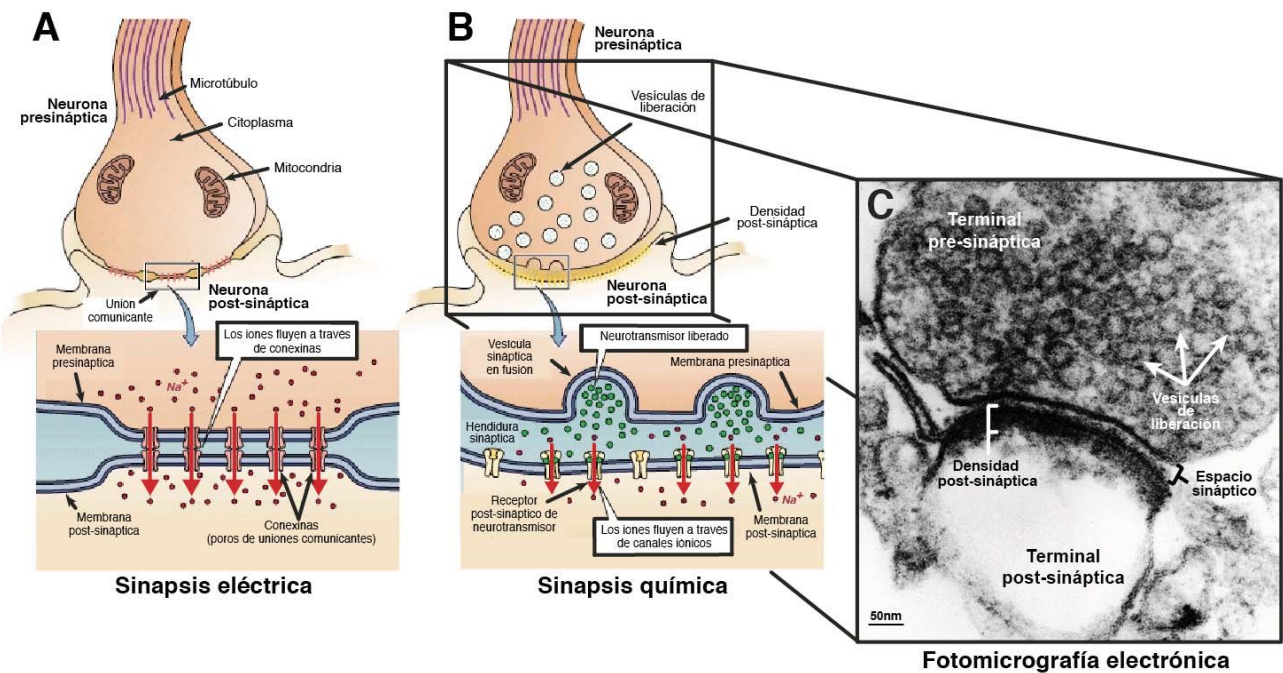
Entre esos cambios se requiere que la despolarización de la neurona sea suficientemente alta como para provocar un cambio en el potencial eléctrico del soma que se propague por el axón. Si dos neuronas participan en la estimulación de una tercera, ambos estímulos deben coincidir en tiempo y/o en espacio para que puedan sumarse y desencadenar un potencial de disparo. Y finalmente, debe ocurrir un aumento de la eficacia de transmisión mediante la selección de los procesos membranales con mayor actividad, retrayendo aquéllos de baja eficacia, así como de la maduración de las espinas dendríticas que reciben los contactos, a través de un aumento del área de contacto y del número de receptores en su membrana<sup>27</sup>.

De este postulado se desprende el concepto de **conectoma**, que se refiere al conjunto de todas las sinapsis en un tiempo y espacio dados, así como a los procesos que median su selección y mantenimiento<sup>29</sup>. Pero ¿qué características tienen las sinapsis?

Los contactos sinápticos o **sinapsis**, del griego συναντησις o acercamiento, es un término acuñado por el fisiólogo británico Charles S. Sherrington en 1897, mismo que describe la **yuxtaposición de dos membranas celulares que interactúan una con otra mediante la transferencia de “factores” solubles liberados desde la parte contactante**. Dicho concepto surgió a partir de sus estudios en la placa neuromuscular de la rana, que se da entre el nervio vago y el corazón. Ahí, descubrió que los impulsos eléctricos requieren de mediadores químicos conocidos como neurotransmisores (en su caso acetilcolina) para que ocurra la contracción muscular<sup>30</sup>.

Esta idea también se vio apoyada por las observaciones anátomo-funcionales del sistema nervioso realizadas por Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal en los primeros años del s. XX, quien describió la discontinuidad de las redes neuronales y la neurona como elemento básico del sistema nervioso (SN), por lo que la señalización química se antojaba como la vía más aceptable de comunicación neuronal. Sin embargo no fue sino hasta la utilización del microscopio electrónico que se pudieron definir estas estructuras con mayor precisión.

A nivel ultraestructural, las **sinapsis** se dividen en dos tipos: las **eléctricas** y las **químicas**<sup>31</sup>. **Las sinapsis eléctricas se presentan cuando dos neuronas comparten su citoplasma a través de uniones comunicantes** (o *Gap junctions*), mediada por conexinas, lo que permite que se hallen eléctricamente acopladas y, por tanto, facilitando su sincronización eléctrica forma instantánea (*Fig. 2A*).



**Figura 2. Tipos de Sinapsis.** (A) Las sinapsis eléctricas favorecen un continuo entre el citoplasma de la neurona pre- y post-sináptica por lo que un potencial de acción transcurre de forma inmediata. (B) Las sinapsis químicas no comparten citoplasma entre ambas neuronas. La comunicación depende de la liberación por fusión vesicular de un neurotransmisor (e. g., glutamato) desde la neurona pre-sináptica. Su unión provoca la apertura de receptores-canales específicos que favorecerán la despolarización del elemento post-sináptico por entrada de sodio. La transmisión del potencial de acción es discontinua y presenta un pequeño retardo. (C) Micrografía de una sinapsis aislada del cerebro completo de rata adulta obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM) con contraste de  $OsO_4$  sobre sinaptoneurosomas (SN) típicamente obtenidos para el presente estudio. En promedio el tamaño de las vesículas rellenas de neurotransmisor (posiblemente glutamato) oscila entre 20-30 nm de diámetro. Nótese la figura tipo omega ( $\Omega$ ) que sugiere la presencia de una vesícula fusionada (centro-izquierda de la fotografía). La terminal post-sináptica está representada muy posiblemente por un fragmento de espina dendrítica resellada durante la extracción de los SN. Modificado de *Neuroscience, 2nd edition. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick d, et al., editors. Sunderland: Sinauer Associates; 2001.*

Aunque este tipo de sinapsis son más frecuentes en invertebrados y en mamíferos solo representan cerca del 1% de todas las sinapsis en el cerebro. Se conocen algunas poblaciones de neuronas del hipotálamo que requieren una alta sincronización para la secreción de algunas hormonas como la vasopresina y oxitocina<sup>26</sup>, por lo que utilizan este tipo de contactos.

El segundo tipo lo constituyen las **sinapsis químicas**, más numerosas en el sistema nervioso de vertebrados, mismas que fueron estudiadas en el presente trabajo por ser intrínsecamente las mejor representadas en nuestras fracciones.

**Las sinapsis químicas están formadas por dos membranas separadas aproximadamente entre 30 a 40 nm de distancia, que pueden provenir de dos neuronas diferentes, pero que no forman un sincicio o continuidad citoplasmática** (Fig. 2B). En un extremo de la sinapsis se localiza la terminal liberadora de neurotransmisores o **terminal pre-sináptica** (i. e., **axón**), y en el otro se localiza la **terminal post-sináptica**, donde se concentran los receptores de los neurotransmisores (i. e., una **espiná dendrítica** o las cisternas del sarcolema de la placa neuromuscular). En el cerebro la mayoría de las sinapsis se dan entre axones y dendritas (del griego δένδρον, que significa árbol o ramificación), que son procesos membranales radiativos desde el cuerpo neuronal o soma.

Funcionalmente, las sinapsis químicas operan por la llegada de un impulso eléctrico al axón, que causa que los neurotransmisores almacenados en pequeñas vesículas sean liberados al espacio sináptico vía exocitosis. Una vez ahí, los neurotransmisores se unen a receptores de membrana específicos, mayoritariamente canales iónicos, lo que facilita la despolarización de la membrana post-sináptica, y favorece la generación de un nuevo impulso eléctrico en la neurona post-sináptica<sup>26</sup>.

Estas estructuras han adquirido una mayor complejidad en la medida en que los organismos se han hecho de nuevas y más refinadas funciones durante la evolución y cuyas características pueden trazarse hasta eucariontes unicelulares como la levadura. Dependiendo del momento evolutivo y la especie, las sinapsis han ido adquiriendo componentes estructurales y regulatorios que pueden operar en un marco de independencia del resto de la célula, entre los que se hallan componentes de citoesqueleto como actina y tubulina, una variedad de receptores asociados a proteínas con actividad de guanilato ciclasa, proteínas de adhesión, de andamiaje, una variedad de cinasas e iniciadores de cascadas de señalización que, en conjunto, permiten una adecuada comunicación intercelular además de una fuerte interacción física entre los procesos membranosos asociados<sup>32</sup>.

Adicionalmente, en células que poseen largos procesos membranales como en las neuronas se ha identificado una variedad de organelos membranosos que no presentan un *continuum* con los del soma, entre ellos el retículo endoplásmico rugoso (RER), el aparato de Golgi, que constituyen el llamado **aparato espinar**, así como una cantidad importante de mitocondrias, cuya presencia fue evidenciada por microscopía electrónica ya desde los años 60<sup>33</sup>.

En general, el número de sinapsis que cada neurona puede establecer es alto y depende de su fenotipo, localización y estado de desarrollo del que se trate. Por ejemplo, se estima que el número de sinapsis que una neurona de Purkinje localizada en el cerebelo de los mamíferos puede contener hasta 100 mil o más contactos con otras neuronas, ya que posee un árbol dendrítico muy extenso. En cambio, una neurona piramidal de la región del *cornu ammonis* (CA1) del hipocampo, encargado de procesar y almacenar las memorias espacial y de trabajo, recibe hasta un máximo de 10 mil contactos por neurona<sup>34</sup>. Si a esto se añade la complejidad numérica de neuronas en el sistema nervioso central (SNC) que en el humano llega a ser de entre 3 a 5 mil millones de neuronas, se hace necesario que la función de cada sitio de contacto sea finamente regulada. Un elemento clave en esa regulación ocurre precisamente a nivel de traducción local, en la vecindad sináptica, y que en este trabajo se postula que tal proceso puede ser modulado por la acción de miRNAs allí localizados.



## ii. Síntesis de Proteínas en Dendritas.

Aunque se han descubierto variantes que difieren en cierta medida del postulado original de Hebb, en general se acepta que la selección y el mantenimiento de las sinapsis ciertamente tienen un componente basado en la actividad eléctrica neuronal. Aparentemente, la formación de memorias nuevas depende de la frecuencia e intensidad con que las sinapsis sean estimuladas y formen un circuito nuevo y más preciso.

Esto significa que la eficiencia de transmisión sináptica, medida por la frecuencia y amplitud de los potenciales de acción, tiene que aumentar en función del tiempo, siempre y cuando exista coincidencia en espacio y/o en tiempo de la estimulación de dos o más sinapsis muy próximas entre ellas<sup>27</sup>.

Sin embargo, ¿cómo se almacenan esas memorias? A la fecha se desconoce cómo las neuronas interpretan y almacenan dichos estímulos, pero se sabe que requieren varios factores:

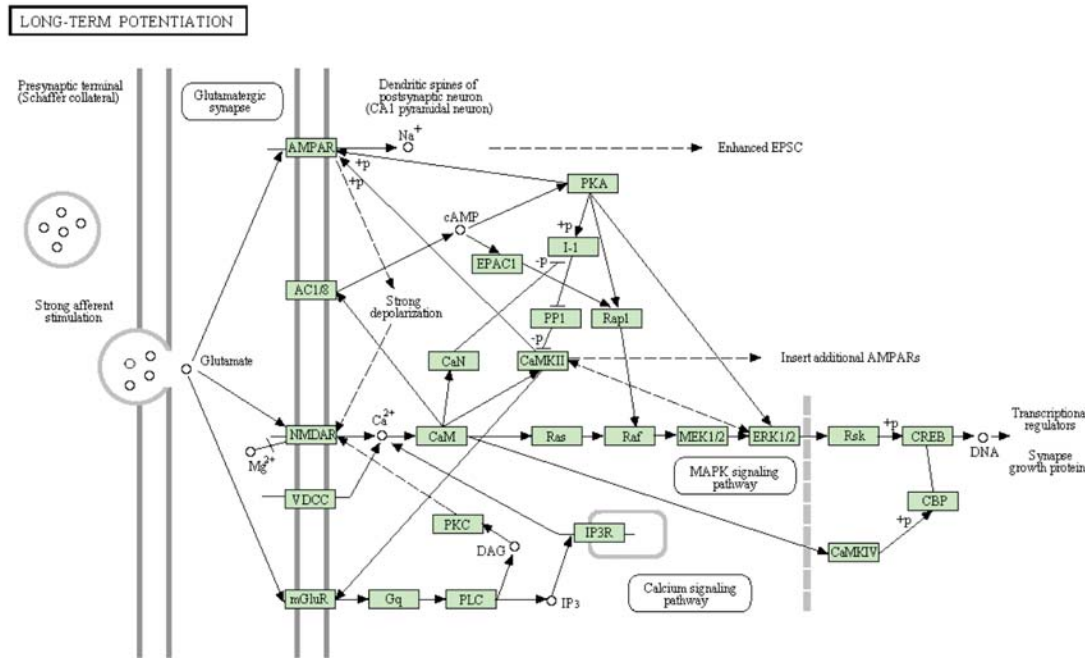
- A) Estimulación frecuente y/o amplia de potenciales de acción recurrentes.
- B) Que los estímulos ocurran en sinapsis cercanas (<50  $\mu\text{m}$  de distancia entre una y otra).
- C) Marcaje o selección de sinapsis activadas ("synaptic tagging")
- D) Síntesis activa de proteínas en la vecindad sináptica.
- E) Transcripción de genes tempranos y tardíos que refuerzan la actividad sináptica.

¿Cuáles son los eventos que encadenan la estimulación repetitiva y/o prolongada de una sinapsis con la adición de más proteínas? Este ha sido un tema de intensa investigación por muchos grupos y ha dado al menos un premio Nóbel en este tema (Dr. Eric Kandel, 2000). El mecanismo más aceptado del que se conocen diversos componentes moleculares involucrados es el de la transducción de señales y cascadas de segundos mensajeros, acopladas a la transcripción vía un factor de transcripción central: **CREB** (*cAMP response element-binding protein*).

Clásicamente se acepta que el almacenamiento de memorias a largo plazo necesita cambios en los programas de expresión de genes, por eso se le otorga un valor enorme a los factores de transcripción como CREB, pues de hecho permite sostener hasta por meses un aprendizaje nuevo en las condiciones adecuadas. Pero para que un estímulo llegue al núcleo se requiere la participación de otros jugadores.

El estudio de las cascadas de señalización y de la expresión de genes observadas inicialmente en el molusco marino *Aplysia californica* por Kandel y cols., y más tarde en otros modelos como *Drosophila* y ratón, que dieron origen a los paradigmas de aprendizaje (facilitación, potenciación a largo plazo -LTP- y depresión a largo plazo -LTD-), ha distinguido al  $\text{Ca}^{2+}$ , el AMP cíclico (cAMP) y la activación de vías de señalización que involucran a las cinasas MAPK, PKC y PKA, como actores fundamentales<sup>35</sup>.

CREB es un factor de transcripción que se fosforila vía PKA cuando los niveles de calcio aumentan en sinapsis activadas, en respuesta a una despolarización prolongada, lo que conduce a la generación de otros segundos mensajeros como el IP3 y la activación de la adenilato ciclasa (AC) y la fosforilación en cascada de la vía de MAP cinasas (MAPK)<sup>26</sup>. Una vez fosforilado, CREB es capaz de unirse a otros factores que reclutan la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa tipo II (RNAPol II) en promotores que reconoce de manera específica (CRE)<sup>26</sup>. Ver Fig. 3.



**Figura 3. Cascada de Señalización Inducida Durante la Potenciación a Largo Plazo (LTP) en Rata.** Mapa de la vía de LTP que se induce por un aumento en la actividad de receptores de glutamato (NMDAR, AMPAR y mGluR), que a su vez favorecen el incremento en la concentración de calcio local. La probabilidad de apertura de canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC) favorecen un efecto sinérgico que activan la vía de MAP cinasas y que culminan con la activación de CREB que inducirá la transcripción de mRNAs que reforzarán esta vía, en forma de asa de regulación positiva. La adicional activación de la adenilato ciclasa (AC) promoverá la actividad en la vía de MAPK. Tomado de <http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>; mo04720

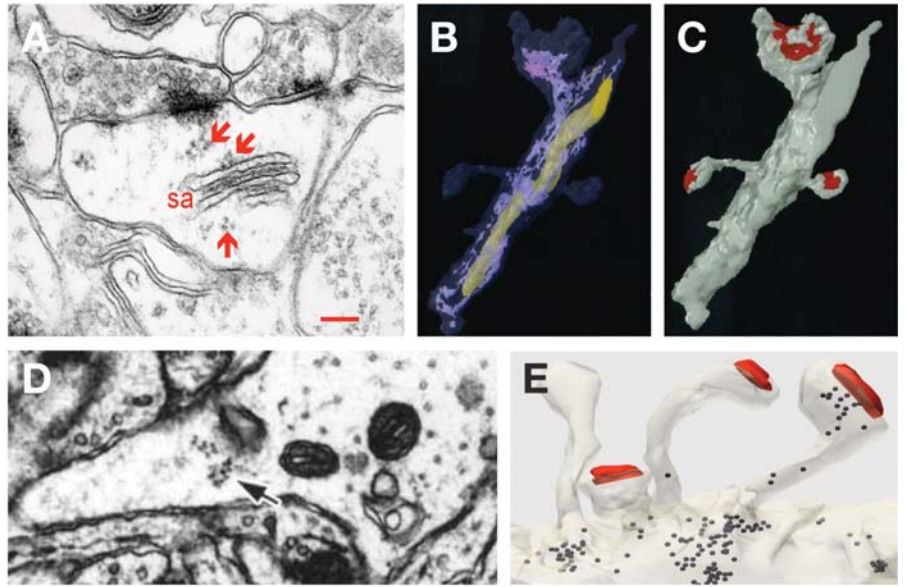
Sin embargo, en la escala de tiempo de los estímulos neuronales (de milisegundos a minutos) a la que se requiere para esperar cambios en la transcripción en el núcleo (de horas a días) hay un desfase enorme. Adicionalmente, las distancias entre el cuerpo neuronal y las sinapsis activadas suelen existir varios micrómetros, milímetros e incluso metros. Entonces ¿cómo se selecciona la sinapsis correcta y se acelera el proceso de adaptación ante estos estímulos?

Un elemento fundamental para que la eficacia sináptica aumente es la síntesis de proteínas. Diversos trabajos han mostrado que no puede haber consolidación de un aprendizaje en diversos modelos animales cuando se añaden inhibidores de la síntesis de proteínas<sup>36-38</sup>, tales como como la **anisomicina** (ANI), que actúa inhibiendo la actividad de peptidil-transferasa del ribosoma durante la fase de elongación, o bien, la **cicloheximida** (CHX), que se inserta en el sitio E del ribosoma bloqueando indirectamente la translocación sobre el mensajero molde en la misma fase de la traducción. Este es un escenario extremo en donde la inhibición es generalizada, pero deja claro que gran parte de los mecanismos sinápticos que se requieren para aumentar la eficacia de transmisión dependen de la adición de nuevas proteínas a su maquinaria.

Por otro lado, desde 1956 se había observado a través de estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) que en la base de las espinas dendríticas existen fragmentos del aparato de Golgi y del Retículo Endoplásmico Liso y Rugoso, al que se le denominó **aparato espinar (sa)**<sup>39, 40</sup>. Interesantemente, estos “trozos” de organelos no constituyen un *continuum* de los encontrados en el soma neuronal, aunque sí pueden ocupar una gran porción de la dendrita (Fig. 4). Ello sugería que las dendritas deben sintetizar sus propias proteínas de forma autónoma.

Pero no fue sino hasta los años 80, que se encontraron **polirribosomas** asociados a elementos post-sinápticos, unos libres (en forma de monosomas) y otros asociados al aparato espinar, en una relación 1:1<sup>37, 41-43</sup>. Los polirribosomas, o **polisomas**, son estructuras que semejan un collar de perlas y son mRNAs asociados a ribosomas en fase de elongación, cuando ocurre la síntesis de polipéptidos.

**Figura 4. Aparato Espinar y Ribosomas en Dendritas.** (A) Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de dendritas hipocampales de rata. Las flechas rojas indican polirribosomas. Sa, aparato espinar (B) Reconstrucción tridimensional basada en series de cortes para TEM de retículo endoplásmico liso (violeta), mitocondria (verde) y (C) de la dendrita contenedora y sus sinapsis (rojo). Obsérvese que el retículo se extiende muy dentro de la espina con mayor área de contacto. (D) Polirribosomas (flecha negra) en un espina dendrítica acompañada de fragmentos del aparato espinar (cuerpos electrodensos a la derecha). (E) Reconstrucción tridimensional de una dendrita y sus espinas, así como las área de contacto sináptico (rojo) y los ribosomas relocalizados después de estimular al animal *in vivo* con potenciales de acción inducidos mediante un electrodo implantado en el hipocampo. Modificado de <http://synapses.clm.utexas.edu/index.asp>.



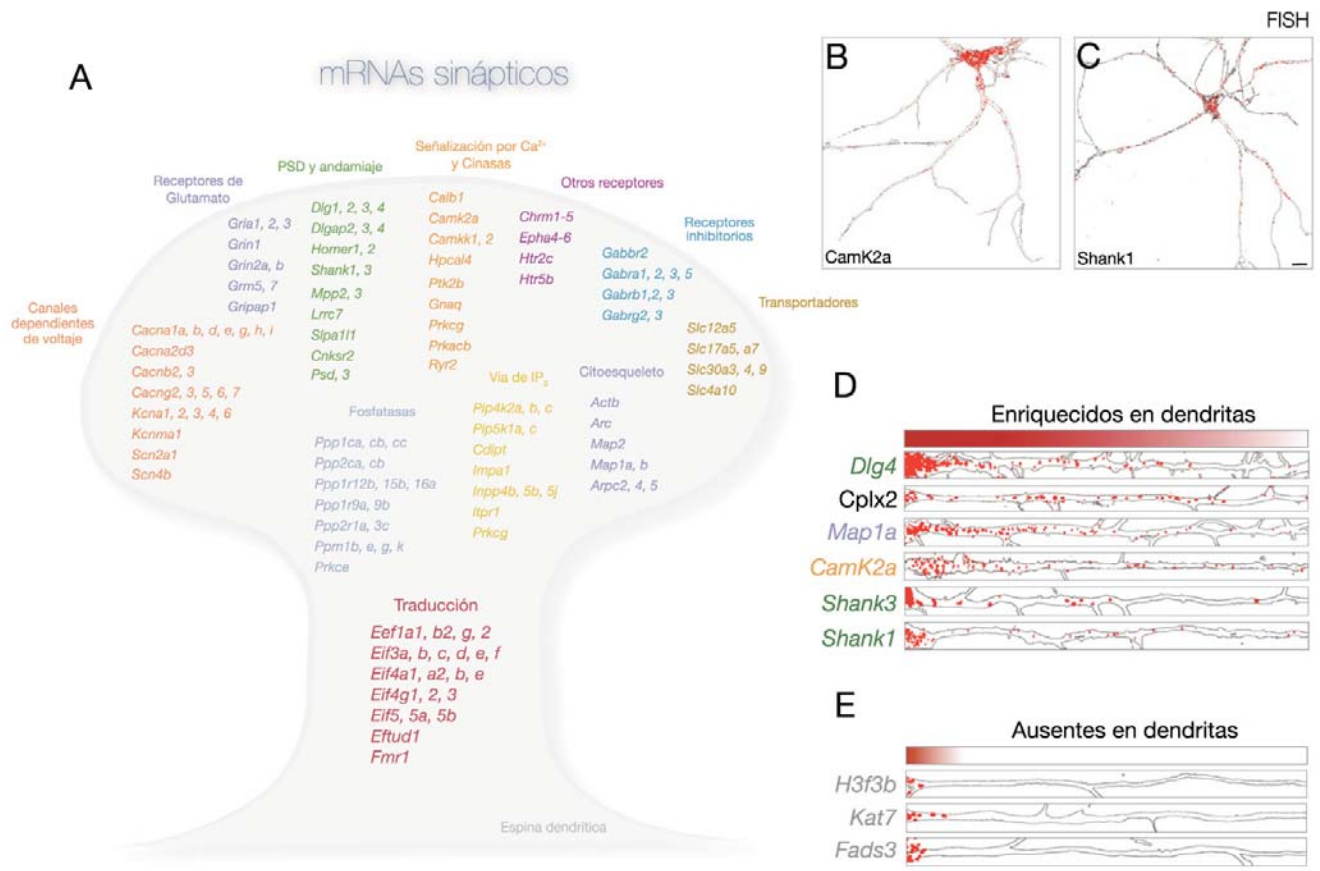
Adicionalmente se han encontrado una variedad de mRNAs que colocalizan con proteínas ribosomales y marcadores post-sinápticos mediante estudios de hibridación *in situ* (ISH), **microscopía electrónica de transmisión (TEM)**, PCR radiactivo, microarreglo y otras metodologías, tanto en dendritas vivas<sup>44, 45</sup> como en fracciones post-sinápticas purificadas<sup>46-48</sup>.

Se han caracterizado hasta 1, 900 diferentes mRNAs detectados en densidades post-sinápticas purificadas de neuronas hipocampales de ratón<sup>47, 49</sup>. Aunque un estudio más reciente apunta que entre axones y dendritas el número asciende hasta 2, 550<sup>50</sup> (Fig. 5). Éstos codifican para una serie de proteínas como receptores de neurotransmisores, proteínas de señalización y de unión a calcio, proteínas de citoesqueleto y andamiaje, factores de crecimiento, transportadores y canales, entre muchas otras. Sin embargo, el tipo y abundancia de estos mensajeros se modifica en respuesta al incremento de actividad despolarizante, aumentando la expresión local de mRNAs pro-sinápticos<sup>51</sup>.

Muchos de estos mensajeros contienen elementos conservados *in cis* en el extremo 5' ó 3' UTR que son necesarios para ser translocados hacia las dendritas. Éstos son llamados secuencias 'Zip Code' o DTE (*dendritic localization element*)<sup>52, 53</sup>, y algunas se unen a ribonucleoproteínas como FMRP<sup>54, 55</sup>, Zbp1/2<sup>56</sup>, Marta1/2<sup>57</sup>, Staufén<sup>58</sup>, etc., mismas que viajan en grandes complejos multimoleculares conocidos como gránulos neuronales (NGs)<sup>40, 48</sup>.

Los NGs sirven como medios de transporte trans-dendrítico de mRNAs translocados desde el núcleo, y son capaces de silenciar temporalmente la traducción del mRNA cargado durante el trayecto, aunque no se conoce si es un fenómeno generalizado para todos los mensajeros translocados<sup>59, 60</sup>. Aunque no son los únicos gránulos no membranales que transportan mRNAs, éstos se asocian a un número importante de mRNAs con DTEs.

El transporte de los NGs ocurre de forma activa, mediante el uso de un número importante de cinecinas de la familia KIF que movilizan estos complejos a muy alta velocidad, especialmente en condiciones de activación eléctrica de la neurona<sup>61</sup>.



**Figura 5. Mensajeros Localizados en Dendritas de Neuronas Hipocampales.** (A) Ejemplos de mRNAs identificados por secuenciación masiva multiparalela (MMPS-Roche 454) en rebanadas de hipocampo de rata (subconjunto sináptico). (B) Morfometría de la señal positiva para el mRNA de *Camk2a* obtenida por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). En rojo se muestran los puntos con mayor señal de hibridación. El contorno se definió por inmunocitoquímica de la proteína MAP2. (C) FISH del mensajero *Shank1*. (D) FISH de mRNAs somato-dendríticos y (E) de localización restringida al soma. La extrema izquierda corresponde al cuerpo neuronal. Los mensajeros en (D) están coloreados de acuerdo con cada grupo mostrado en el dibujo. Modificado de Cajigas, I.J., et al.<sup>50</sup>. La barra negra representa 20  $\mu$ m.

Diversos estudios han determinado que la actividad traduccional en dendritas neuronales es independiente a la que ocurre en cuerpo celular. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado la formación de fluorescencia *de novo*, en dendritas seccionadas con micropipetas de registro electrofisiológico<sup>44</sup>, las cuales fueron transfectadas con RNAs sintetizados *in vitro* que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP), varias horas después de haberlas separado del soma celular. Otras aproximaciones incluyen la medición de la tasa de síntesis de proteínas por la incorporación de [<sup>35</sup>S]Met en sinapsis purificadas, que fueron estimuladas con agonistas excitadores del glutamato o bien por factores de crecimiento como el factor neuronal derivado de cerebro (BDNF)<sup>62</sup>, que es una neurotrofina que activa una cascada de señalización vía AKT/PKC e inactiva la mediada por mTOR que es inhibitoria del crecimiento de las espinas dendríticas<sup>2</sup>.

Ante estas evidencias surgen la preguntas: ¿qué mecanismo controla la expresión de tantos mensajeros en las dendritas? ¿qué confiere especificidad a la expresión local en sinapsis? ¿estos mRNAs responden igual ante cualquier cambio despolarizante?. Aún no existe una respuesta contundente para toda la población de mRNAs somato-dendríticos pero se conocen varios escenarios de control traduccional local.

Entre ellos están los mecanismos 'generales' de regulación de la traducción, que dependen de las ribonucleoproteínas (RNPs) que se unen a la maquinaria basal de traducción y/o a secuencias en los mensajeros dendríticos<sup>48</sup>; entre estos se incluyen:

- a) La hiperfosforilación y unión de la proteína inhibitoria eIF6 (u otras proteínas de unión al factor de pre-inicio eIF4E) al complejo de inicio de la traducción.
- b) La poliadenilación selectiva de mRNAs con elementos de adenilación citoplásmica (CPEs).
- c) La unión de FMRP a secuencias con estructura secundaria llamadas "cuartetos de G" que forman un 'cubo' coordinado mediante puentes de hidrógeno entre los átomos de la guanina en enlaces tipo *Hoogsteen*, generalmente presentes en el extremo 3' UTR de mRNAs.
- d) La presencia de secuencias unión al sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) que favorece la unión de las dos subunidades del ribosoma sin necesidad de usar los factores de inicio de la traducción.
- e) La presencia de largos trectos de GC que mecánicamente dificultan la traducción por la elevada Tm local.
- f) El secuestro de eIF4E por RNPs.
- g) La fosforilación de este factor per se disminuye la afinidad al 5' Cap (7m-ppp-guanosina) lo afecta la formación del complejo de inicio.

Los mecanismos específicos que se conocen son:

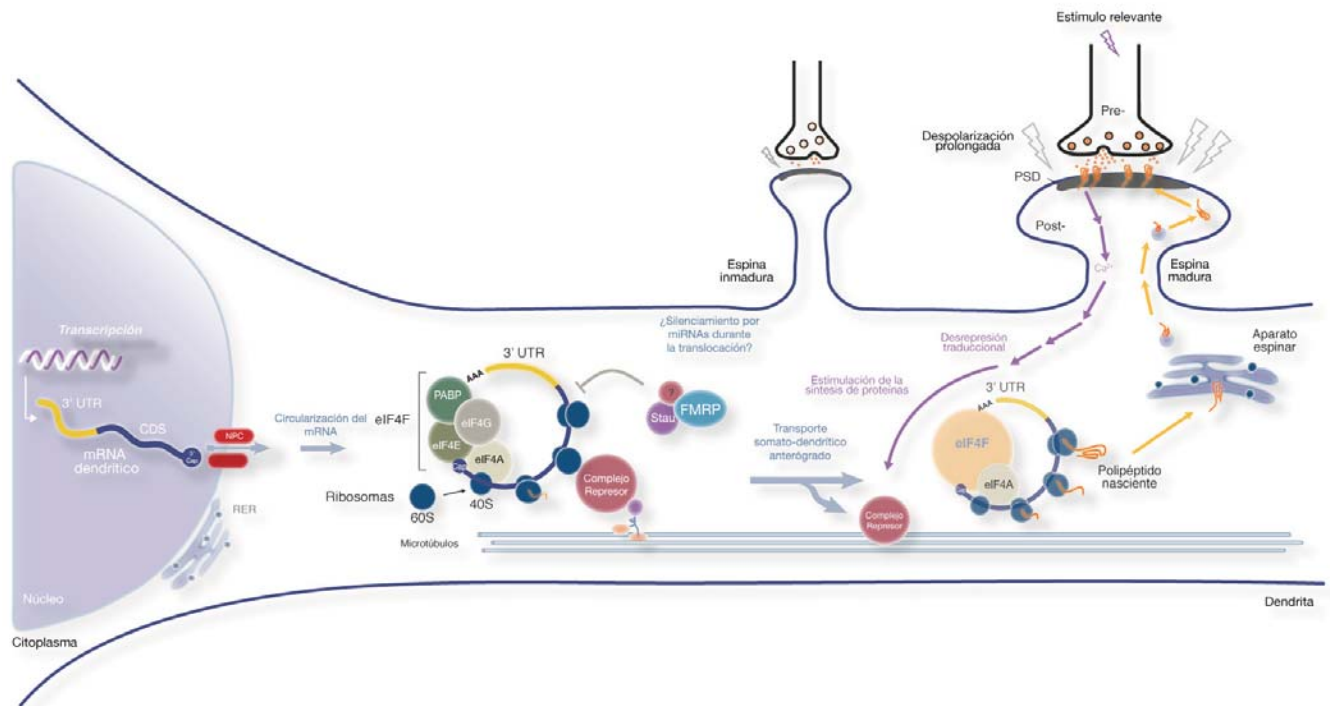
- a) La unión del ncRNA BC1/200 derivado de elementos retrotransposónicos de la familia *Alu* a secuencias complementarias en el extremo 3' UTR, posiblemente unido a FMRP.
- b) El control local de la traducción vía miRNAs.
- c) Y por supuesto otro nivel de regulación está dado por el transporte somato-dendrítico hacia las sinapsis. Como se verá más adelante, la posibilidad de que los miRNAs participen en la regulación traduccional de mensajeros dendríticos es enorme.

Se sabe que en condiciones de despolarización prolongada, inducida por la activación de receptores tipo AMPA, NMDA o bien por alto potasio extracelular (50  $\mu$ M), aumenta la concentración de algunos mRNAs en dendritas<sup>63, 64</sup> y es dependiente de la actividad de la cinesina KIF5<sup>65</sup>. Usualmente estos eventos van acompañados de la disgregación de los NGs y ocurren en una ventana de tiempo de minutos a horas<sup>33</sup>. Un modelo general de estos mecanismos se muestra en la *Fig. 6*.

La regulación fina de la síntesis local de proteínas es un fenómeno clave que aún no ha sido del todo comprendido, dada la dificultad de su estudio a nivel subcelular, y de la velocidad con la que ocurre (generalmente de unos pocos segundos a unos pocos minutos).

Hay una característica por la cual el hallazgo de miRNAs en sinapsis es tan importante y es la de regular la dosis génica. Como se verá más adelante, los miRNAs no solamente tienen una alta selectividad por su blanco pues se unen de forma específica y complementaria, sino que funcionan como reostatos, como moduladores de la cantidad de proteína sin apagar completamente toda la señal. Adicionalmente, muchos de ellos trabajan de forma concertada, uniéndose más de un miRNA por cada mRNA regulado. De hecho, muchos mensajeros somato-dendríticos poseen múltiples sitios de regulación por miRNAs en sus extremos 3' UTR.

## Síntesis de Proteínas en Dendritas



**Figura 6. Transporte Anterógrado de mRNAs Somato-Dendríticos Hacia Espinas Dendríticas.** Los mRNAs que contienen secuencias de localización dendrítica son translocados hacia las dendritas, en donde existe la maquinaria de síntesis local de proteínas así como RNPs regulatorias. El aumento en la intensidad de señalización de una sinapsis favorece una mayor tasa de localización dendrítica y de proteína sintetizada que reforzará la actividad sináptica. Ver texto para detalles.

Por su potencial funcional, los miRNAs moléculas pueden constituir uno de los eslabones de regulación de los procesos de señalización rápidos y los cambios mas tardíos que conducen a la transcripción de nuevos genes necesarios en la sinapsis.

Este trabajo ayuda a identificar su identidad en la vecindad sináptica así como su distribución somato-dendrítica y neuroanatómica con la finalidad de caracterizar mejor estas poblaciones con alto potencial regulatorio.

Creemos que la caracterización de dichas moléculas en los compartimientos sinápticos puede ser de capital importancia para entender la fisiología de las sinapsis, ya sea durante el desarrollo embrionario, en condiciones de lesiones y patologías, así como en funciones adaptativas normales como en la memoria y el aprendizaje.



# CAPÍTULO I

## MICRORNAS EN EUKARIONTES

### 1.1 Los microRNAs Pertenecen a una Gran Familia de RNAs No Codificantes (ncRNAs) con Funciones Diversas.

En las últimas dos décadas se ha gestado una revolución conceptual con respecto al papel funcional del RNA en la biología celular y evolutiva. Ha dejado de pertenecer únicamente a la categoría operativa de un marco de lectura abierto (ORF), conteniendo exones alternativos en eucariotas, y que sólo funge como un intermediario entre el DNA y las proteínas, para ser considerado como un actor preponderante en muchos procesos de regulación de la fisiología celular<sup>66, 67</sup>.

Desde luego me refiero al **RNA no codificante (ncRNA)** que constituye una megafamilia de varios miles de miembros en los diferentes reinos (*Tabla 1*), con miembros que actúan tanto en *cis* como en *trans*, y que participan en funciones como de almacén de información digital en viriones (1, 2, 3, 4 → A, U, G, C), actividad catalítica, anti-toxina, regulador transcripcional y post-transcripcional de la expresión génica, sensor de catabolitos, inhibición de virus, transporte molecular, amortiguador de mutágenos, y muy probablemente como hormona también (aspecto al que me referiré más adelante con profundidad). Tan sólo en humano existen 15, 952 genes no codificantes de RNA como producto activo (GRCh37.p8, July 2012, v.68.34), en ratón hay 6, 875 (GRCm38, July 2012, v.68.38) en rata se contabilizan 4, 828 genes de este tipo (RGSC 3.4, May 2010, v.68.34), aunque en ésta última es probable que aún se descubran más, puesto que aún hay pocos estudios de secuenciación masiva que abarquen el genoma completo de este organismo.

Los recientes avances en los métodos de secuenciación masiva y del análisis de expresión han permitido reconocer por ejemplo que un gran porcentaje de regiones no codificantes, que constituyen cerca del 70% de todo el genoma en humanos, son transcritas en algún nivel en eucariotes<sup>68</sup>. Un gran número de RNAs grandes (>200 nt) y pequeños (<200 nt), conservados filogenéticamente o no, modifican su expresión en respuesta a una gran cantidad de estímulos, bajo diferentes condiciones celulares. Además una gran cantidad de evidencia disponible apunta a que tales RNAs participan activamente en procesos de diferenciación celular, del control de agregación de la cromatina, del estado de senescencia celular, del bloqueo del efecto saltatorio de transposones y retrotransposones, así como de la regulación de programas completos de expresión génica.

Aún a inicios de la década de los 80 sólo se consideraban a los RNAs involucrados con la traducción como los tRNAs y rRNAs como ejemplos clásicos de no codificantes (ncRNAs). No fue sino hasta el descubrimiento de la actividad catalítica del RNA en el **splicing** (i. e., snRNAs U4-U6 ó RNAsa P) que se comenzó a brindarle un papel más activo al ncRNA<sup>69</sup>.

En la medida en la que apareció el primer borrador del genoma humano se reconoció que el número de genes codificantes (aprox. 22, 000) era sensiblemente menor al postulado originalmente (cerca de 30, 000) cuando el genoma humano apenas estaba por secuenciarse a finales de los años 80.



<b>Acrónimo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Función</b>	<b>Distribución biológica</b>
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>	Traducción	Todos los organismos
7SL ó SRP RNA	<i>Signal recognition particle RNA</i>	Integración en membrana	Todos los organismos
tRNA	<i>Transfer RNA</i>	Traducción	Todos los organismos
tmRNA	<i>Transfer-messenger RNA</i>	Rescate de ribosomas arrestados	Bacterias
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>	Splicing y otras funciones	Eucariontes y Arqueobacterias
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>	Modificación de nucleótidos (metilación, pseudouridilación)	Eucariontes y Arqueobacterias
SmY	<i>SmY RNA</i>	Trans-splicing de mRNA	Nemátodos
scaRNA	<i>Small Cajal body-specific RNA</i>	Una clase de snoRNA / Modificación de nucleótidos	Eucariontes
gRNA	<i>Guide RNA</i>	Modificación de nucleótidos en el mRNA	Cinetoplastido de la mitocondria
RNase P	<i>Ribonuclease P</i>	Maduración de tRNAs	Todos los organismos
RNase MRP	<i>Ribonuclease MRP</i>	Maduración de rRNAs / Duplicación de DNA	Eucariontes
Y RNA	<i>Y RNA</i>	Procesamiento de RNA / Duplicación de DNA / Degradación de virus	Eumetozoa (animales multicelulares)
Telomerase RNA	<i>Telomerase RNA</i>	Guía durante la re-síntesis del telómero	Mayoría de eucariontes
aRNA	<i>Antisense RNA</i>	Atenuación transcripcional / Degradación de mRNA / Estabilización de mRNAs / Bloqueo de la traducción	¿Ubicuo?
cnatRNA	<i>Cis-natural antisense transcript</i>	Regulación de la expresión génica	Eucariontes
crRNA	<i>CRISPR RNA</i>	Resistencia a parásitos (DNA como probable blanco)	Mamíferos
Long ncRNA	<i>Long noncoding RNA</i>	Varias (Silenciamiento de cromatina / Control de transposones / Pseudogenes)	¿Ubicuo?
<b>miRNA</b>	<b>MicroRNA</b>	<b>Regulación post-transcripcional de la expresión génica</b>	<b>Todos los organismos excepto hongos</b>
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>	Defensa contra transposones, metilación de islas CpG, ¿otras posibles funciones?	Células germinales de animales; algunos en soma
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>	Regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional	Eucariontes
tasiRNA	<i>Trans-acting siRNA</i>	Regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional	Plantas
tiRNAs	<i>Transcription initiation</i>	Asociada al sitio de inicio de la transcripción en promotores ricos en G-C que mapean de -60 a +120 con mayor densidad de +10 a +30.	Mosca de la fruta, pollo y humano
rasiRNA	<i>Repeat associated siRNA</i>	Tipo de piRNA / Defensa contra transposones	Plantas
7SK	<i>7SK RNA</i>	Regulación negativa del complejo CDK9/Ciclina T	Eucariontes
Autopropagante	<i>Retrotransposon</i>	Propagación genética	Eucariontes y algunas bacterias
Acarreador de información	<i>Viral genome</i>	Replicación viral	Virus de RNA de doble hebra, de hebra positiva, negativa, variados virus satélite y retrovirus
Autopropagante	<i>Viroid</i>	Replicación viral	Plantas infectadas
Autopropagante	<i>Satellite RNA</i>	Desconocida	Células infectadas
vRNA	<i>Vault RNA</i>	Posible rol en la expulsión de xenobióticos	Mamíferos
TUFs	<i>Transcripts of unknown function</i>	Productos de transcripción pervasiva, trans-splicing o de regiones intergénicas, pseudogenes; función no determinada.	Eucariontes

**Tabla 1. Algunas Clases de RNAs No Codificantes (ncRNA) con Funciones Variadas.** Cada clase de ncRNA se agrupó de acuerdo con las funciones asociadas a procesos comunes entre cada familia, aunque algunas categorías contienen más de una. En esta tabla se identifica cada proceso con un tono gris específico. **1er. bloque** en blanco, ncRNAs relacionados con la síntesis de proteínas; **2º bloque**, RNAs asociados a modificaciones post-transcripcionales o de replicación de DNA; **3er. bloque**, RNAs relacionados con regulación de la expresión génica, ciclo celular y control de elementos transponibles; **4o. bloque**, ncRNAs con funciones parásitas; **5o. bloque**, función diversa, e. g., vRNA se une al compuesto quimioterapéutico mitoxantrona como una estrategia para modular su toxicidad. **6o. bloque**, transcritos con función desconocida, usualmente RNAs 200 nt. En este caso se han omitido a los riboswitches pues usualmente están contenidos en genes codificantes, aunque su función ocurre en *cis* y depende del plegamiento secundario de una parte de la secuencia, inducido por la unión a un metabolito. Modificado de <http://rfam.sanger.ac.uk/> y [http://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_RNAs](http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_RNAs).

Estos nuevos datos sólo dejaron un gran espacio en el DNA cuya función no estaba clara y al cual le denominaron “*junk DNA*”, lo que a su vez alimentó la paradoja del **valor C**. Este concepto se refiere a que el tamaño de los genomas en los organismos no presenta una correlación directa con su supuesta complejidad biológica, siendo un caso particular el de las plantas donde se ha observado una multiciplidad excepcional de genes con una alta diversidad que sobrepasan por mucho el número de genes en humano.

Con estas observaciones y con estudios de secuenciación de otros organismos se ponderó el papel que podría jugar el *splicing* alternativo para compensar la aparente falta de genes codificantes y generar múltiples proteínas a partir de uno solo. No obstante, aunque el *splicing* no explica la gran variabilidad de estructuras y funciones que nos distinguen de otras especies, el valor C se ve compensado cuando se analiza el número de transcritos detectables, que en humano alcanza un número abrumador de 194, 015, comparado con el ratón que tiene 90, 956, o la rata con 39, 549 (<http://www.ensembl.org>).

Por un lado, diversos estudios de clonación y secuenciación de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) por el método de SAGE, que se utilizaron para corroborar los fragmentos de clonas de DNA genómico que se iban generando a la par de los grandes proyectos de secuenciación principales, encontraron que mapeaban en regiones intergénicas. Ello sugería la existencia de transcripción pervasiva en regiones que flanqueaban ORFs. Se llegó a pensar que estos transcritos pertenecían a la categoría de transcritos basales no útiles para la célula. Estos datos también se corroboraron mediante los llamados *tiling arrays*, que son microarreglos de sondas que contienen secuencias de DNA genómico que se traslapan unas con otras de forma progresiva.

Sin embargo, la expresión concertada de muchos de estos transcritos dependía del contexto y estado celular específico, lo que sugería que estos eventos tal vez no eran del todo estocásticos. Con ello se reivindicaba un poco el mencionado valor C y por otro renovó con gran expectación al vasto espacio de genes codificantes dentro del enorme espacio del *junk DNA*.

Fue gracias a proyectos multi-institucionales como el proyecto ENCODE, que ha caracterizado desde 2008 el 1% del genoma humano a nivel transcripcional y de estructura de cromatina, que se ha reportado que el transcriptoma en células de mamífero puede abarcar entre el 90-95% de todo el DNA nuclear. Aunque dicha actividad se reconoció altamente variable dependiendo del tipo celular y/o la etapa del desarrollo en la que dicha célula se encuentre.

En este sentido, los nuevos descubrimientos han transformado el panorama genómico, en tal magnitud que el propio concepto de gen se ha modificado. Hoy en día se le define como una ***unión de secuencias genómicas que codifican un juego coherente de productos funcionales potencialmente sobrelapados***<sup>70</sup> y ya no como una unidad discreta heredable (fragmento de DNA que contiene un marco de lectura abierto (ORF) cuyos productos se circunscriben a las proteínas como elementos activos que dan origen a un fenotipo).

Estos proyectos han identificado a una gran cantidad de RNAs no codificantes (ncRNAs) -cuya nomenclatura para la mayoría de estas especies de RNA recae en la dificultad para asignarles un marco de lectura abierto (que a veces codifican para productos <100 aminoácidos), y que pertenecen a regiones intergénicas o intrónicas, o que se traslapan con otros transcritos codificantes, en sentido o antisentido.

Hasta la fecha se han clasificado 106 clanes de ncRNAs, envueltos en al menos 26 procesos y funciones celulares (*pfclass*). Sin embargo el número de familias ha crecido exponencialmente desde el advenimiento de los sistemas de secuenciación masiva en paralelo y hasta agosto de 2012 se reportan al menos 2, 208 familias en la base de datos Rfam del Instituto Sanger (rfam v.11). Ver *Tabla 2*.

Acrónimo	Tipo	Longitud (nt)	Organismo	No.	Función
miRNAs	microRNAs	~21-24 (forma madura)	Plantas, algas, protozoarios, animales y virus	21, 264	
	miRtrons	Precusores en lariat durante splicing	Mamíferos	254 (477 h/m) (25 mo)	Desestabilización y arresto traduccional de mRNAs parcial o totalmente complementarios. Interacción en nucleótidos 2-8 en extremo 5' del miRNA ("seed seq")
	Simtrons (miR-1225 & -1228)	Procesamiento desconocido; independientes de splicing	Mamíferos	2	
	moRNAs (miRNA off-set)	Precusores adyacentes a pre-miRNAs canónicos; derivados de la actividad de Drosha	Drosophila	1, 246 (h/m)	
21U	Uracilo en extremo 5'	21	<i>C. elegans</i>	> 5, 000	Asociada a los piRNAs
Exo-siRNAs	Exogenous Small-interfering	21 (dsRNAs con 2 nt desapareados en 3')	Sintéticos, virales o transgénicos	ND	Degradación de RNA perfectamente complementario a la cadena líder del siRNA
Endo-siRNAs	Endogenous Small-interfering	21 (dsRNA con 2 nt desapareados en 3')	Plantas, algas, animales, hongos y protistas	ND	Degradación de RNA perfectamente complementario a la cadena líder del siRNA
casiRNAs (rasiRNAs)	Cis-acting (repeat associated)	21 (saRNA con 2 nt desapareados en 3')	Plantas	ND	Silenciamiento de transposones y secuencias repetidas en el DNA; modificación de cromatina
natRNAs	Natural occurring siRNAs	21 (dsRNA con 2 nt desapareados en 3')	Plantas y células germinales en mamífero	ND	Regulación de la respuesta de estrés
tasiRNA	Trans-acting siRNA	21 (derivados del loci TAS)	Plantas	ND	siRNAs endógenos que requieren un miRNA para su maduración y posterior silenciamiento del loci TAS
26G	Guanina en extremo 5'	26	<i>C. elegans</i>	ND	Desconocida
piRNAs	PIWI-associated (Aubergine-associated)	~30	Metazoarios excepto <i>Trichoplax adherens</i>	174, 724	Regulación de transposones en líneas germinales, metilación del promotor de CREB2 en la facilitación a largo plazo en <i>Aplysia</i>
piRNA-like	PIWI-associated	~30	<i>D. melanogaster</i> (mutantes de Ago2)	ND	Desconocida. Presentes en células somáticas.
LincRNAs	Long-intergenic	±4-100 kb	Mamíferos, otros?	ND	Imprinting, dosis génica, silenciamiento del cromosoma X, etc.; modificación de cromatina; ¿otras?

**Tabla 2. Clases de RNAs No Codificantes (ncRNAs) Asociados al Silenciamiento Génico.** Se muestran sólo algunas familias de RNAs que participan en el silenciamiento génico a nivel pre- y post-transcripcional, aunque se han clasificado alrededor de 2, 208 familias de ncRNAs diferentes en diversas especies. Cada familia se ha ordenado de acuerdo con su tamaño. \*Secuencias que corresponden a 103 especies en donde se han identificado. El número de miRtrons reportados depende de la base de datos consultada (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Genomics>). Se cuantifican 254 en 11 metazoarios por predicción posicional, sin embargo en los datos de deep-seq arrojan una cifra de varios cientos en humano (h) y ratón (m). *Trichoplax adherens* es un animal marino del phylum *placozoa* de 1 mm de diámetro que se alimenta de bacterias y sólo se compone de dos capas de células. Está relacionado con animales coloniales como las esponjas marinas y se propone como antecesor de los animales bilateralizados. LincRNAs corresponden a RNA grandes, por convención >200 nt, como una referencia a otras grandes familias de ncRNAs asociadas a silenciamiento génico. Para consultar más información sobre éstos y otros ncRNAs conocidos se puede consultar en <http://rfamsanger.ac.uk>. ND; no determinado. Modificado de *Nat Rev Genet.* 2009 Feb;10(2):94-108<sup>71</sup>.

Este gran número de RNAs pertenecientes a miembros de los tres dominios (*eucarya*, *archaea* y *eubacteria*) poseen funciones enormemente diversas, sin embargo, solamente unas pocas familias se relacionan con procesos de regulación de la expresión genética a nivel post-transcripcional.

La mayor parte de los transcritos no codificantes son productos de la RNA polimerasa tipo II (RNA Pol II), exceptuando los casos del rRNA 5S, que son sintetizados por la RNA Pol III (i.e., U6, tRNAs) o algunos otros por la RNAPol I (i.e., rRNAs).

El origen de muchos de ellos recae en productos de la transcripción pervasiva del genoma, en regiones mucho más elongadas con respecto a los extremos 3' o 5' UTR anotados para muchos mRNAs, que se extienden incluso varias kilobases río arriba (*upstream*) más allá de los sitios de inicio de transcripción<sup>66</sup>.

Las funciones de estos ncRNAs es muy variable, en algunos casos están está relacionadas con el silenciamiento de la cromatina, en otros como reguladores de la actividad de transposones, unos más regulan la expresión de genes hospedero mediante la síntesis de las secuencias antisentido, unos más resultan ser los productos de pseudogenes, etc<sup>71</sup>.

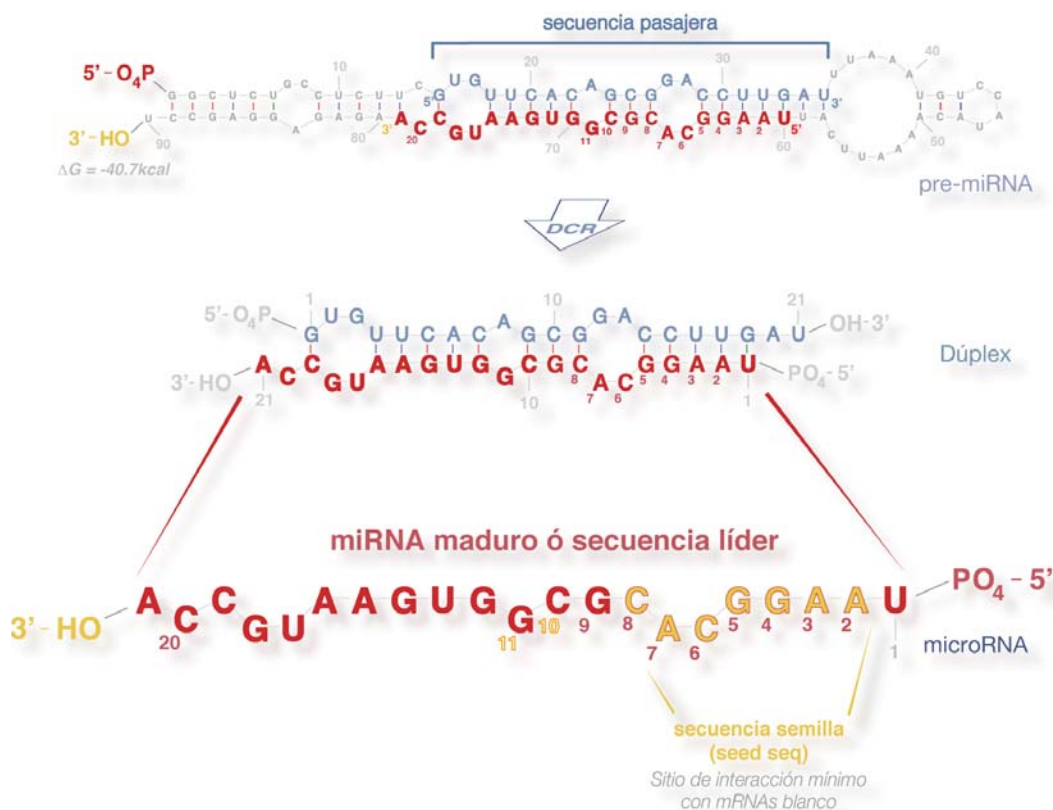
En el caso particular de los miRNAs, éstos son producto de la transcripción de la RNAPol II<sup>72</sup>, o bien, productos de procesamiento de intrones en el *splicing*<sup>73</sup>, cuya transcripción depende del gen hospedero<sup>74</sup>.

Desde que se descubrió el primer miRNA en *C. elegans*, *lin-4*<sup>75,76</sup>, se consideraba un ejemplo más bien exótico de RNAs con capacidad regulatoria, sin embargo pronto iniciarían una revolución conceptual a la que le seguirían nuevas especies moleculares como los piRNAs o los 21-U RNAs, los endo-siRNAs, entre otros.

## 1.2 Nomenclatura, Definición Estructural y Operativa de los microRNAs.

Estructuralmente **los microRNAs son fragmentos endógenos de RNA de cadena sencilla (ssRNA) cuya longitud es de ~22nt, que contienen residuos 5'-PO<sub>4</sub> y 3'-OH en sus extremos**. Canónicamente, los miRNAs son el producto de una maduración secuencial derivada de cortes endonucleolíticos progresivos sobre precursores largos y autoplegados. Éstos son blanco de la acción enzimática de dos RNasas tipo III (**Drosha** en el núcleo<sup>77</sup> y **Dicer** en el citoplasma<sup>78</sup>), cuyos sustratos consisten de RNA de cadena doble (dsRNA) presente en las regiones autohbridadas de los precursores. La forma activa final de ssRNA, se logra por la acción de **Ago2**<sup>79, 80</sup>, una endonucleasa que hidroliza un enlace fosfodiéster en la cadena complementaria al miRNA maduro y favorece su rápida degradación.

Los precursores citoplasmáticos más inmediatos de los miRNAs maduros, se conocen como **pre-miRNAs**, y tienen una longitud de 60-100 nt<sup>81</sup>. Presentan una estructura secundaria que asemeja a un pasador (**hairpin**), ya que al autohbridarse parcialmente como dsRNA en el tallo, forman un asa (*loop*) en uno de sus extremos. (Fig. 1.2.1).



**Figura 1.2.1. Estructura de un microRNA maduro y su precursor.** Estructura secundaria del precursor del microRNA de rata mo-miR-124-1, calculada mediante el algoritmo Mfold en UNAFold v.3.6 (Dinamelt (<http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu>) con la menor  $\Delta G'$  (1M NaCl sin cationes divalentes). Los 90 nt modelados corresponden a la secuencia más frecuente clonada en rata del precursor después del corte de Drosha/Drosha a partir de un pri-miRNA (>1 kb de longitud; no representado). La mayoría de los miRNAs canónicos se originan a partir de este tipo de precursores. El producto de Dicer/TRBP genera un dúplex entre la secuencia pasajera (azul) y la líder (rojo) con 2 nt sobresalientes (*overhangs*) en el extremo 3'. El segmento que corresponde al microRNA maduro (21 nt) o secuencia líder es la forma activa del miRNA que se hibrida a los mensajeros blanco a través de una región mínima de unión conocida como "secuencia semilla", que incluye a los nucleótidos 2-7(8) (en amarillo) de acuerdo con cada miRNA particular.



Así como los miRNAs maduros, los precursores presentan residuos 5'-P mono-fosfatados y 3'-OH hidroxilados en cada extremo terminal<sup>82</sup>. En la mayoría de los casos, los pre-miRNAs presentan nucleótidos desapareados (*mismatches*) recurrentemente en el tallo, formando pequeñas protuberancias que pueden afectar el procesamiento enzimático durante su maduración<sup>78</sup>.

Adicionalmente, los pre-miRNAs contienen dos nucleótidos desapareados en una de las hebras hacia el extremo terminal 3', lo que también constituye una marca característica de las RNAsas Tipo III clase 2 como Droscha, y que son esenciales en el reconocimiento por diversas ribonucleoproteínas<sup>83</sup>.

Los pre-miRNAs son sustratos de Dicer, una RNasa citoplasmática que se encarga de liberar al **dúplex**, conformado por el miRNA maduro (**hebra líder**) y la secuencia complementaria (**hebra pasajera ó miR\***), a partir de la escisión de una porción del tallo y del asa. Esta enzima, en forma de complejo con otras proteínas, es capaz de transferirlo al Complejo de Silenciamiento Inducido por RNAi (**RISC**), en donde se selecciona la hebra líder (mediante la degradación de la hebra pasajera), que será la forma activa del miRNA maduro<sup>84</sup>.

En muchas especies, la longitud promedio de los miRNAs maduros es de 22 nt, aunque oscilan entre los 16 a 29 nt dependiendo de la especie donde se originen (*Fig. 1.2.2*). Esta variación en el tamaño posiblemente se deba a los cambios estructurales que presenta Dicer propias de cada especie o bien al tipo de procesamiento que les da origen (mediado o no por *splicing*).

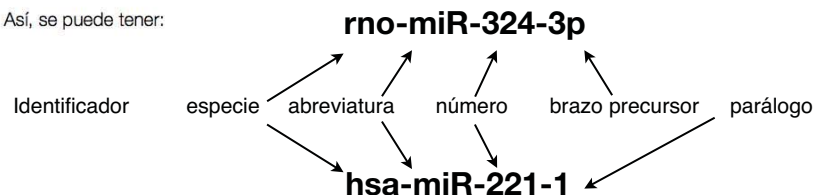
Adicionalmente, es frecuente encontrar miRNAs que difieren del tamaño convencional que se acepta para cada tipo. Algunos presentan de 1 a 3 nt extra en uno o ambos extremos de la secuencia consenso. A estas variantes se les denomina "isomiRs" y longitud final puede variar en función del contexto celular<sup>85, 86</sup>.

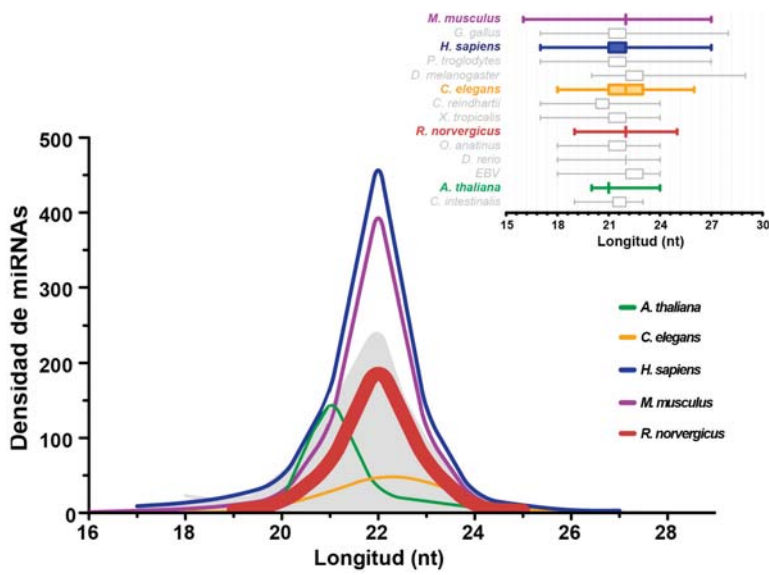
## Nomenclatura

En el año 2003 se reunió una comisión de investigadores líderes en el campo para definir la nomenclatura de los microRNAs<sup>256</sup>. En ella se hicieron los siguientes lineamientos, mismos que se han refinado hasta la fecha:

1. Se abrevian **miRNAs ó miRs**.
2. El nombre individual se anota en *cuatro partes separadas por un guión*, siguiendo estas reglas:
  - a) Las siglas en minúscula de la especie (e. g., **hsa-**, **mmu-** o **rno-** si es humano (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*) o rata (*Rattus norvegicus*), respectivamente).
  - b) Las iniciales **mir-** ó **miR-**, (cuya diferencia en la letra "r" minúscula indica si se trata del precursor, o si es el microRNA maduro, que se escribe con "R" mayúscula). Las excepciones a esta regla son "**let-**", "**lin-**" "**bantam**" y "**lsy**" que son mutantes en *C. elegans* y *D. Melanogaster* descubiertas y caracterizadas antes de la fundación de dichas reglas. e. g., let-7-a ó lin-4.
  - c) El **número** de la secuencia reportada, de acuerdo con su descubrimiento y anotación en la base de datos oficial miRBase (<http://www.miRBase.org>), por lo que siguen un orden cronológico, e. g., miR-1, miR-2, etc.
  - d) La ubicación dentro del precursor, ya sea en el brazo más próximo al extremo 3' ó 5', por lo que se nombra **-3p ó -5p**.
  - e) Para diferenciar dos microRNAs que provienen del mismo precursor, se solía identificarlos con una "s" ó "as" (sense ó antisense), o bien, con un asterisco al final del nombre de acuerdo con su nivel de expresión (e. g., let-7d se expresa más que let-7d\*), pero esto cambió en la versión 19 del miRBase (Julio, 2012), en donde se desecharon tales anotaciones. Ahora se prefiere la anotación del inciso d).
  - f) Para nombrar a microRNAs **parálogos** que varían hasta en 2 nt entonces se prefiere usar una **letra** del alfabeto seguida del número, e. g., miR-125a, miR-125b, let-7a, let-7b.
  - g) Si los parálogos provienen de  **cromosomas diferentes** y su secuencia es 100% idéntica, entonces se utiliza un **carácter numérico** después del número de identificación del miRNA, precedido de un guión, e. g., miR-124-1 ó miR-124-2.
  - h) Finalmente, si los miRNAs tienen un origen viral entonces se antepone una letra "v" al nombre de la secuencia.

Así, se puede tener:





**Figura 1.2.2. Longitud Promedio de microRNAs en Diferentes Especies.** El tamaño de los miRNAs (miRBase v.18) muestra una distribución normal con una moda de 22nt para la mayoría de los organismos (panel inferior). El número de miRNAs maduros en *H. sapiens* (azul) es de 1, 921; en ratón (*M. musculus*; violeta) 1, 157; en rata (*R. norvegicus*; rojo, línea gruesa) 680. En gris se muestra la misma distribución en 8 eucariotes adicionales (enunciados abajo) y del virus de Epstein-Barr (EBV). Nótese que el tamaño de los fragmentos puede variar entre 17 a 29nt según la especie (ver box plot en panel superior). La línea central representa la mediana y la caja alrededor corresponde al 50% de la población. Las líneas extendidas representan la dispersión de datos hacia cada lado de la curva. *G. gallus*, pollo; *P. troglodytes*, chimpancé; *D. melanogaster*, mosca de la fruta; *C. reinhardtii*, alga; *X. tropicalis*, rana africana; *O. anatinus*, omeletorino; *D. rerio*, pez cebra; *C. intestinalis*, asociado a los primeros organismos multicelulares.

Algunos pre-miRNAs son sustratos de enzimas con actividad de adenosina deaminasa (e. g., Adar1 y Adar2), que convierten residuos de adenina en inosina (A→I) en un proceso llamado 'edición del RNA'<sup>87</sup>, lo que puede afectar negativamente su procesamiento, pues puede inhibir el corte endonucleolítico producido por Dicer<sup>88</sup>. Estas modificaciones no se han detectado en los miRNAs maduros, lo que indica que dichos cambios pueden ser muy sensibles y deletéreos para su función, y por tanto no se han seleccionado durante la evolución.

En plantas y en *Drosophila*, los miRNAs pueden sufrir una 2-O-metilación en el extremo 3' por acción de HEN1, una S-adenosilmetil-transferasa dependiente de metionina. Estos residuos son críticos para mantener su estabilidad en el citoplasma.

En mamíferos en cambio, algunos miRNAs maduros sufren una poliadenilación progresiva en el extremo 3', vía una transferasa terminal de adeninas (Tut4) que reconoce dinucleótidos de AU específicamente posicionados en el asa, como una marca previa a su degradación selectiva<sup>89</sup>. Pero esto solamente ocurre una vez que están cargados en el RISC maduro.

Tanto en plantas como en animales, los miRNAs se caracterizan por favorecer la desestabilización de mRNAs que son complementarios a su secuencia, especialmente en la región semilla o '**seed sequence**'. Ésta secuencia crítica, comprende los nucleótidos 2-7 del extremo 5' del miRNA maduro y es la región mínima para unirse con su blanco<sup>90</sup>. Sin embargo, al menos la mitad de los miRNAs en humano extienden la región semilla hasta el nt 8, mientras que otros pueden complementarla usando los nt 12-20, según sea el caso.

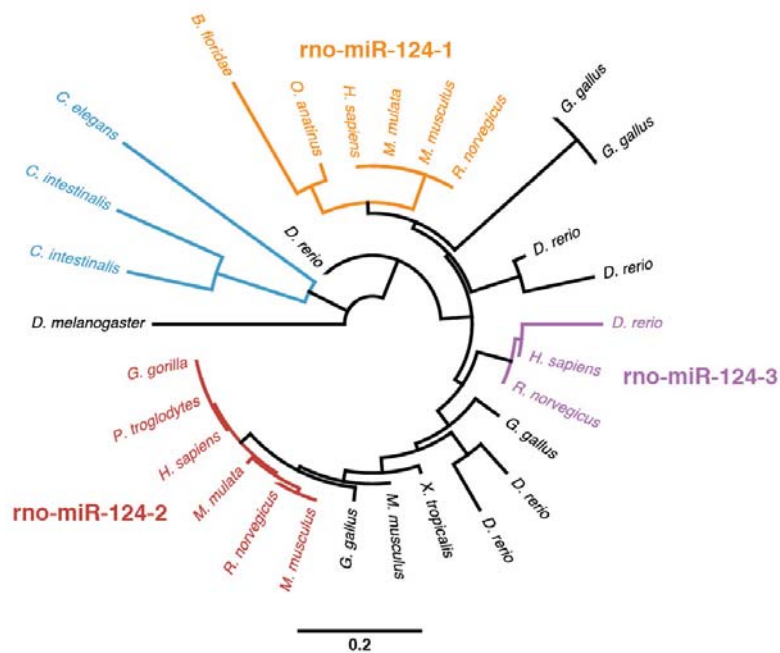
En plantas y en mucho menor medida en animales, la interacción con el mensajero suele ser perfecta entre los 21 nt del miRNA y su blanco, lo cual provoca el corte endonucleolítico de este último por acción de la proteína Argonauta, contenida en RISC, en un mecanismo semejante al RNA de interferencia (**RNAi**) que rápidamente desestabiliza al mRNA y promueve su degradación; aunque esto no es una regla absoluta. En mamíferos la unión suele ser imperfecta entre ambas moléculas, lo que induce un arresto traduccional y el direccionamiento del mRNA a sitios de degradación más lentos como los cuerpos de procesamiento ó **P-bodies**.



Operativamente, los miRNAs de mamífero se definen como **RNAs que actúan en *trans* y que regulan negativamente la traducción y/o la estabilidad de RNAs parcial o totalmente complementarios a su secuencia semilla, en sitios denominados Elementos de Reconocimiento de microRNAs ó MREs (*miRNA recognition element*)**.

Desde el punto de vista evolutivo, estas secuencias son las que muestran una tasa de evolución rápida en función de la adquisición de nuevos miRNAs. Una vez que surge uno nuevo, éste tiende a permanecer por largo tiempo en una especie y entonces ocurre un fenómeno coevolutivo a la par de su(s) mRNA(s) blanco(s). Sin embargo, algunos miRNAs presentan una alta conservación filogenética entre invertebrados e vertebrados, cuyas líneas evolutivas divergieron desde hace 500 millones de años, en especial en la región semilla<sup>11</sup>.

Un ejemplo de ello es miR-124, que es muy abundante y específico del sistema nervioso en metazoarios. Éste presenta un porcentaje de identidad en la secuencia líder de 86.1% entre 30 especies de animales (Fig. 1.2.3), lo que probablemente correlaciona con su función crítica para la formación y mantenimiento del fenotipo neuronal en el sistema nervioso<sup>91, 92</sup>.

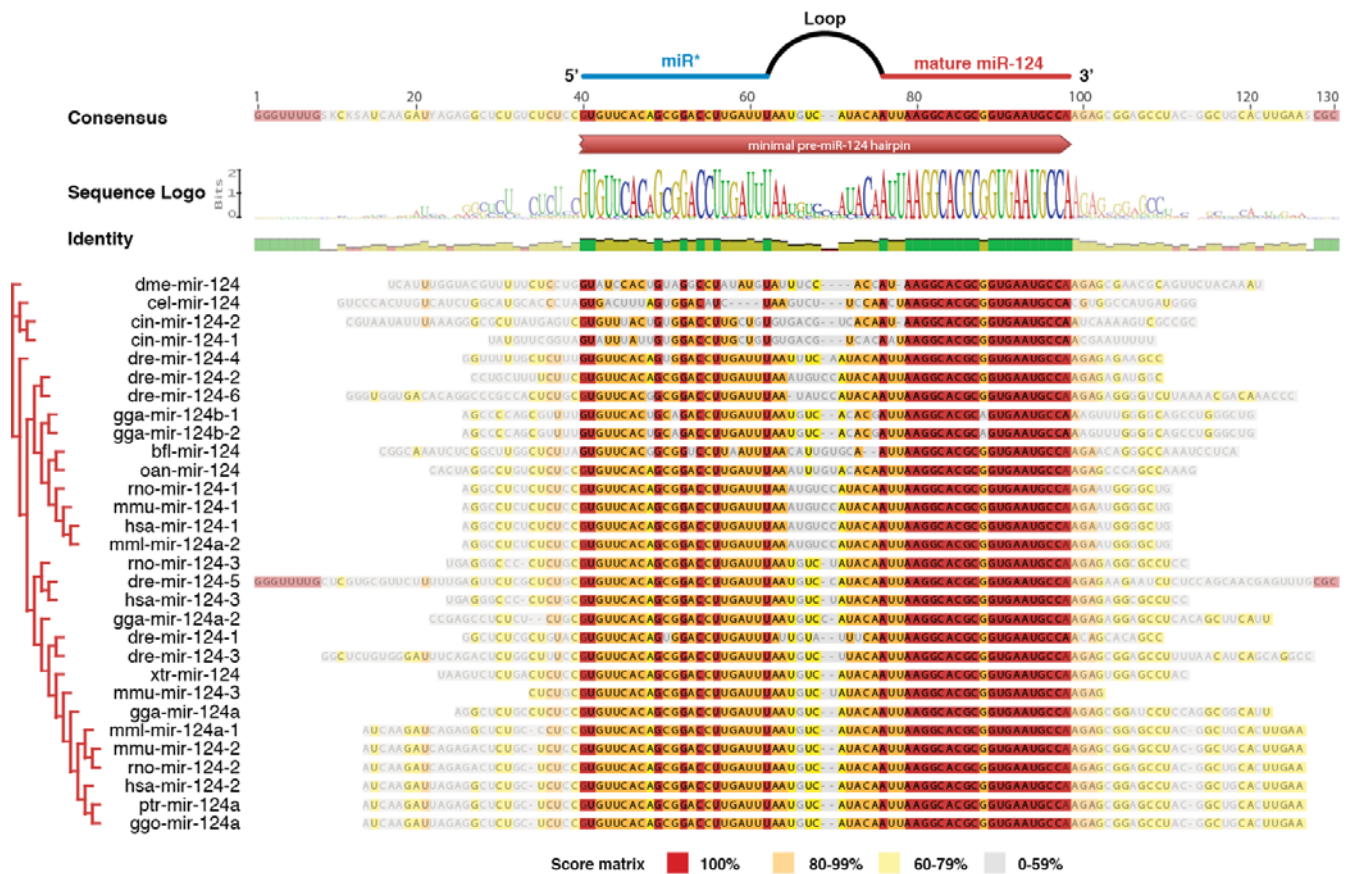


**Figura 1.2.3. Árbol Filogenético del microRNA Neuronal miR-124.**

Análisis pareado por Jukes-Cantor de la secuencia del pre-miR-124 e isoformas de 30 especies de animales cuya expresión es específica del sistema nervioso. Los clados marcados con color corresponden a los parálogos más cercanos a las tres isoformas existentes en rata (por ser el objeto de estudio de esta tesis) donde se muestra la aparición progresiva por duplicación. En azul, el clado más antiguo; en naranja, púrpura y rojo, cada isoforma de rata (rno-miR-124-1,-2,-3) respectivamente. *B. floridae* corresponde al notocordado *Amphioxus*, como ejemplo de un predecesor de los vertebrados. La longitud de la barra inferior indica el número de sustituciones por sitio.

Dado que las regiones aledañas a la secuencia líder juegan un papel menos preponderante para la función del miRNA, éstas son poco conservadas filogenéticamente, especialmente en la porción del asa, la secuencia pasajera y la sección del tallo localizado fuera del dúplex (Fig. 1.2.4).

Los miRNAs constituyen una familia a la que continuamente se le han añadido miembros en la medida en que los métodos de secuenciación e identificación bioinformática se han refinado. Hasta el momento se han registrado 25, 141 miRNAs maduros en 164 especies de eucariontes, entre plantas, animales, algunos protistas (incluyendo algas y el ameboide *Dictyostellium discoideum*) así como de 26 virus, de acuerdo con la versión 19 de la base de datos de miRNAs del Instituto Sanger, miRBase, en Cambridge, UK (<http://www.miRBase.org>).



**Figura 1.2.4. Conservación Filogénica del Precursor de miR-124 en Animales.** Alineamiento de la secuencia precursora de miR-124 clonada y/o predicha en 30 especies animales, calculada mediante el algoritmo de ClustalW2. La región central remarcada corresponde a la secuencia mínima que contiene al microRNA maduro y como se indica en el diagrama superior que representa cada región del precursor. Nótese que la región más conservada es la secuencia madura (sombreado rojo). En algunos casos, esta secuencia se ha duplicado e insertado en distintos *loci*, generando parálogos cuya nomenclatura los distingue por un número al final del nombre correspondiente (e. g., miR-124-1 tiene un *locus* distinto a miR-124-2). Todas las secuencias comparten 73.6% de identidad en la región del miRNA maduro. La nomenclatura usada para cada especie contiene la primera letra del género, seguida de las dos primeras letras de la especie, así, *cel*, *C. elegans*; *cni*, *C. intestinalis* (tunicado filtrador marino); *dmo*, *D. melanogaster*; *dre*, *D. rerio* (pez cebra); *gga*, *G. gallus* (pollo); *ggo*, *G. gorilla*; *hsa*, *H. sapiens*; *mml*, *M. mulatta* (mono Rhesus); *mmu*, *M. musculus* (ratón); *ona*, *O. anatinus* (omitorrinco); *ptr*, *P. troglodytes* (chimpancé); *xtr*, *X. tropicalis* (rana).

Tan solo en humano constituyen 5.5% de todo el genoma, 2.45% en rata y 4.49% en ratón (Tabla 3).

Organismo	miRNAs	Precusores	Genes Codificantes	ncRNAs	Genes Totales	miRNAs/Genoma (%)	Transcritos Totales (TT)	miRNAs/TT (%)	Versión del Ensamblaje
Humano	2,042	1,600	21,224	15,952	37,176	5.49	194,015	1.05	GRCh37.p8 v68.37 (July, 2012)
Rata	723	446	22,920	4,828	27,548	2.63	39,549	1.82	RGSC v68.34 (May, 2010)
Ratón	1,281	855	21,638	6,875	28,513	4.49	90,956	1.41	GRCh38 v68.38 (July 2012)

**Tabla 3. Número de microRNAs por Genoma en Humano, Ratón y Rata.** Contenido génico proporcional de miRNAs en mamífero. Datos obtenidos del servidor miRBase ([www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)) y Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Nótese que el valor de complejidad C aumenta en humano si se toma en cuenta el número de transcritos totales y la abundancia de ncRNAs, incluyendo a los miRNAs.

Sin embargo, diversos estudios basados en secuenciación masiva multiparalela (MPSS) capaces de secuenciar el transcriptoma completo de una célula en menos de una semana, predicen que la cuenta pronto aumentará a varios miles de ejemplares más, basados en el análisis *in silico* del número de secuencias halladas, cuyo contexto genómico predice la potencialidad de formar estructuras secundarias de tallo y asa sobre sí mismas (en forma de pre-miRNAs), incluyendo la probabilidad de presentar sitios potenciales de unión a mRNAs (MRE's), tomando en cuenta sus sitios semilla, así como algunos otros argumentos.

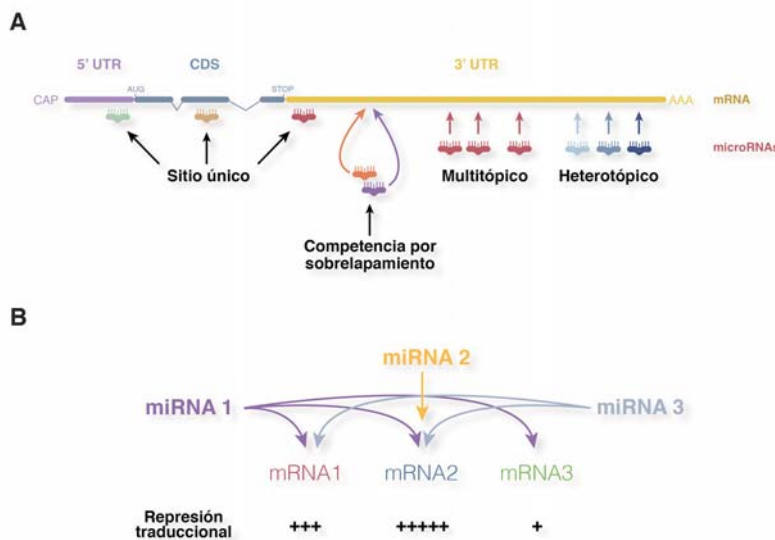
Con esta aproximación experimental también se ha podido observar que el número y tipo de miRNAs mantiene una correlación importante con el estado de diferenciación celular y con el tipo celular específico del que se trate, lo cual hace aún más complicada la diversidad de estas moléculas.

A la fecha, se estima que la frecuencia del número de sitios potenciales de unión a miRNAs (MREs) en mRNAs codificantes es tan alto que, al menos la mitad de todos los transcritos producidos en cualquier momento es regulada por estas moléculas<sup>93</sup>. Sin embargo, cuando nuevos miembros se añadan a la familia, se refinan los métodos bioinformáticos y al mismo tiempo, se expanda la capacidad de evaluación global de su función, es probable que el número de blancos aumente.

Por otro lado, los miRNAs no han sido formalmente identificados en bacterias, *archaea* o en hongos como *S. cerevisiae*. Esto sugiere que los mecanismos de silenciamiento génico vía RNA se han diversificado más ampliamente en plantas y animales posiblemente como una forma de regulación fina de genomas cada vez más grandes y complejos dentro de un contexto de pluricelularidad con tejidos diferenciados.

En los metazoarios, la forma predominante de regulación por miRNAs es mediada por el apareamiento imperfecto al extremo 3' UTR en un mRNA blanco. Esta acción resulta, como se verá más adelante, en la atenuación de la producción de proteínas, incluyendo, pero no de forma exclusiva, el corte del mRNA cuando se aparean con el mRNA de forma perfecta (en el proceso conocido como RNA de interferencia o RNAi), la deadenilación rápida, inhibición del inicio de la traducción, el “despegado” ribosomal durante la elongación, y el secuestro del mRNA a los cuerpos de procesamiento (*P-bodies*). Evidencia reciente apunta que los miRNAs pueden jugar un papel importante en la activación de la traducción, que puede depender del contexto celular.

Es común que muchos mensajeros contengan más de un elemento de reconocimiento de miRNAs (MREs) en su secuencia, lo que los hace susceptibles de regulación múltiple (*Fig. 1.2.5*). Más aún, puede existir más un MRE para el mismo miRNA en la secuencia del mensajero, lo que indica que el grado de represión puede ser sinérgico. De hecho se ha observado que este suele ser el caso<sup>94-96</sup>.



**Figura 1.2.5 Modalidades de Interacción de microRNAs con su Blanco. (A)**

Los modos de interacción están denotados por el tipo y número de sitios complementarios a la secuencia semilla (MREs) que cada miRNA tiene en el blanco. Cada tipo de miRNA coexpresado se representa con un color distinto. **(B)** La intensidad de la represión traduccional, medida como la cantidad de proteína producida, tiene un comportamiento sinérgico, siempre y cuando no exista competencia por solapamiento, y la distancia entre cada MRE sea 20-40 nt de separación. El efecto es mayor cuando los MREs son más próximos al codón de termino (STOP) o a la cola de poly-A en el extremo 3'-UTR del mensajero.

Es probable que esta multiplicidad de sitios favorezca el control de expresión espacio-temporal que caracteriza a los miRNAs, otorgando un control extremadamente fino en cuanto a la dosis génica de un mRNA particular

Aunque no es el único criterio de selección que utilizan los diversos algoritmos de predicción de MREs, muchos de éstos se ha identificado como secuencias de regulación altamente conservadas en vertebrados, lo que los hace fuertes candidatos para su evaluación experimental.

Así el repertorio de miRNAs ha ido incrementando con el tiempo y sus funciones también, la cuales pueden afectar la fisiología de cualquier célula y jugar un papel importante en una variedad de procesos, por ejemplo en las neuronas, durante la diferenciación o en procesos adaptativos como la memoria y el aprendizaje.

## 1.3 Cascada de Procesamiento de microRNAs en Eucariontes.

La descripción del procesamiento se hará de acuerdo con la *Fig. 1.3.1*, en donde se indica cada paso en la vía de procesamiento y maduración de miRNAs. Se recomienda consultar las revisiones de Krol et al.<sup>97</sup>, Bartel DP<sup>90</sup>, Ghildiyal & Zamore<sup>71</sup>, Fabian et al.<sup>98</sup>, Pillai et al.<sup>99</sup>, y Filipowicz et al.<sup>100</sup> así como las referencias citadas para entender con mayor profundidad los detalles de la regulación por miRNAs en mamíferos.

Los miRNAs se sintetizan en el núcleo celular, mayoritariamente por la acción de la RNA Polimerasa II (RNAPol II)<sup>72, 101</sup>, cuyos largos transcritos de varias kilobases de longitud, son poliadenilados y contienen un *cap* (7mpppG) en el extremo 5'<sup>102</sup>. En muchos casos estos transcritos contienen más de un miRNA en el mismo precursor (policistrónicos), o bien, pueden madurarse a partir intrones localizados dentro de genes codificantes (miRtrons)<sup>103-105</sup>.

El mecanismo de maduración de los miRtrons difiere de la vía canónica pues es independiente de la acción de Drosha:DGCR8 que se describe abajo. Requieren la acción de una enzima “desramificadora” (*debranching*) presente en el spliceosoma. En algunos casos se estima que hasta el 40% de todos los miRNAs en humano se derivan de este tipo de precursores intrónicos que son del *lariat* como paso previo, sin embargo el número parece reducirse a sólo unas pocas decenas<sup>106</sup>.

Los largos transcritos, denominados **pri-miRNAs** o precursores primarios, se pliegan en sí mismos formando estructuras secundarias con tallos de dsRNA recurrentes a lo largo del pri-miRNA. Éstos son selectivamente escindidos mediante un complejo de dos proteínas, **Drosha (RNASEN) y DGCR8** (homólogos de Drosha y Pasha en *Drosophila*, respectivamente), al cual también se le conoce como **complejo microprocesador** por la actividad endonucleolítica, dependiente de ATP y Mg<sup>2+</sup>, que cataliza selectivamente la escisión de los miRNAs contenidos en las estructuras de tallo-asa<sup>77, 107-111</sup>. La actividad de este complejo no es restrictiva a la vía de miRNAs, también es necesaria para el procesamiento de los precursores de los rRNA 5.8S y 28S, lo que sugiere que la selectividad de este complejo depende primariamente de la estructura secundaria que pueden presentar estos y otros RNAs en el núcleo<sup>112</sup> así como de las RNPs asociadas (e.g., nucleolina<sup>113</sup>).

Los productos del complejo microprocesador se llaman **pre-miRNAs** y miden aproximadamente **60-100 nt** de longitud y contienen dos nucleótidos no hibridados hacia el extremo 3', llamados **overhang**. De hecho estos extremos, productos característicos de las RNAsas tipo III, son reconocidos por la Exportina5 que se une a la GTPasa Ran y transloca a los precursores hacia el citoplasma a través del complejo de poro nuclear (NPC)<sup>107, 114-117</sup>.

Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs se convierten en sustratos del complejo **Dicer-TRBP**, homólogos en mamífero de Dcr-1 y Loqs (Loquacious) en *D. melanogaster*, cuya actividad de endonucleasa tipo III clase 3, elimina el asa y la base del tallo de los pre-miRNAs, dejando como producto un **dúplex** (hebra líder:hebra pasajera) que es reminiscente de la estructura de siRNAs (ver p.31), cuya longitud es de **~19-22 nt** de longitud por hebra, pero que están imperfectamente apareadas<sup>118-122</sup>.

El par Dicer-TRBP se denomina también **complejo de cargado en RISC (RLC)**. El RLC tiene la propiedad de seleccionar cuál de las dos hebras se quedará en Ago2, que es la proteína efectora del **Complejo de Silenciamiento Inducido por RNAi (RISC)**. Dicha función recae en TRBP quien sensa, mediante su actividad de helicasa y en asociación con otras RNPs, y “elige” cuál extremo 5' del dúplex es más lábil, el que posee la menor energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y por tanto la menor Tm, basado en el menor número de puentes de hidrógeno entre sus nucleótidos, y por tanto el que es más probable de deshibridar<sup>84, 123</sup>.

Una vez que el dúplex es cargado en RISC, la actividad endonucleolítica de **Ago2** (eIF2C2), también llamada “*slicer*”, localizada en el dominio PIWI, destruye la hebra pasajera o estrella (miR\*) justamente entre los nucleótidos 10-11, de la misma forma en la que se destruye un mRNA blanco cargado en el complejo en la vía de RNAi<sup>80</sup>. De esta forma la hebra que sobrevive es la **hebra líder** de 20-22 nt en forma ssRNA que es el miRNA maduro, que se encuentra dentro de un miRISC activo y listo para cargar un mRNA complementario a la **secuencia semilla** del miRNA<sup>84, 123-126</sup>.

Cuando la estabilidad termodinámica ( $\Delta G$ ) es muy similar entre los extremos del dúplex, la probabilidad de que RISC se quede con una de las dos hebras es aproximadamente 50%, por lo que algunos pre-miRNAs pueden contener miRNAs que potencialmente pueden ser cargados en RISC, a través del dominio PAZ de Ago2.

Aunque Ago2 es la única isoforma de la familia que posee actividad endonucleolítica, las 4 son capaces de cargar miRNAs maduros en un mecanismo que no se ha identificado plenamente<sup>127, 128</sup>. Es posible que durante el recambio de miRNAs en RISC, las otras isoformas pueden tomar y cargar las hebras maduras por sí solas.

Al RISC que es competente para el silenciamiento vía miRNAs se le denomina miRISC, para diferenciarlo del que participa en la vía de RNAi, en cuyo caso el siRNA (*small interfering RNA*) cargado es totalmente complementario a la secuencia blanco, al menos entre los nucleótidos 2 al 11 del siRNA<sup>129-131</sup>.

El número de proteínas que pueden unirse al RLC o RISC y modular su actividad, asciende al menos a 38, entre las que se encuentran MOV10, FMRP, hnRNPA1, Hsp90, Fxr1, ADAR1/2, GW182, p72, p68, Lin28, KSRP, SMAD, SNIP1, ARS2, entre muchas más<sup>97</sup>, algunas de las cuales también se han encontrado localizadas en dendritas. Algunas tienen un efecto negativo sobre su función y otras refuerzan su actividad represora.

Una vez que se ha montado un miRISC funcional, el complejo se une a su mRNA blanco en un mecanismo aún incomprendido que requiere modificaciones estructurales de Ago2<sup>132</sup> así como la unión a helicasas de RNA tipo DExD/H (MOV10, RCK/p54, RHA, etc) que son dependientes de ATP y cuya función probablemente sea el de permitir un “escaneo” mediante apareamiento con el miRNA, desenrollando progresivamente al mensajero en turno.

El silenciamiento canónicamente asociado a la función de miRISC requiere la unión a la proteína **GW182**<sup>133</sup>, rica en trectos de glicina/triptofano de 182 kDa, la cual permite la localización del complejo hacia los **cuerpos de procesamiento (P-bodies)**, que son gránulos no membranosos muy dinámicos que contienen exonucleasas con dirección 5'-3' y 3'-5', así como deadenilasas y decapasas en donde se degradan selectivamente muchos RNAs<sup>97</sup>. La dinámica de estos gránulos depende en gran parte del estado celular (estrés por falta de nutrientes o metales pesados, fase del ciclo, etc) y están en estrecha relación con otros cuerpos celulares como los gránulos de estrés (SGs) o los gránulos neuronales (NGs)<sup>134</sup>.

El reclutamiento de otros factores al miRISC depende de la presencia de RNA en el complejo, lo que sugiere que tal vez se recluten principalmente por el mensajero y sus elementos en *cis*, adicionalmente a las interacciones que se puedan establecer entre las proteínas participantes.



# Maduración de miRNAs y Silenciamiento Postranscripcional

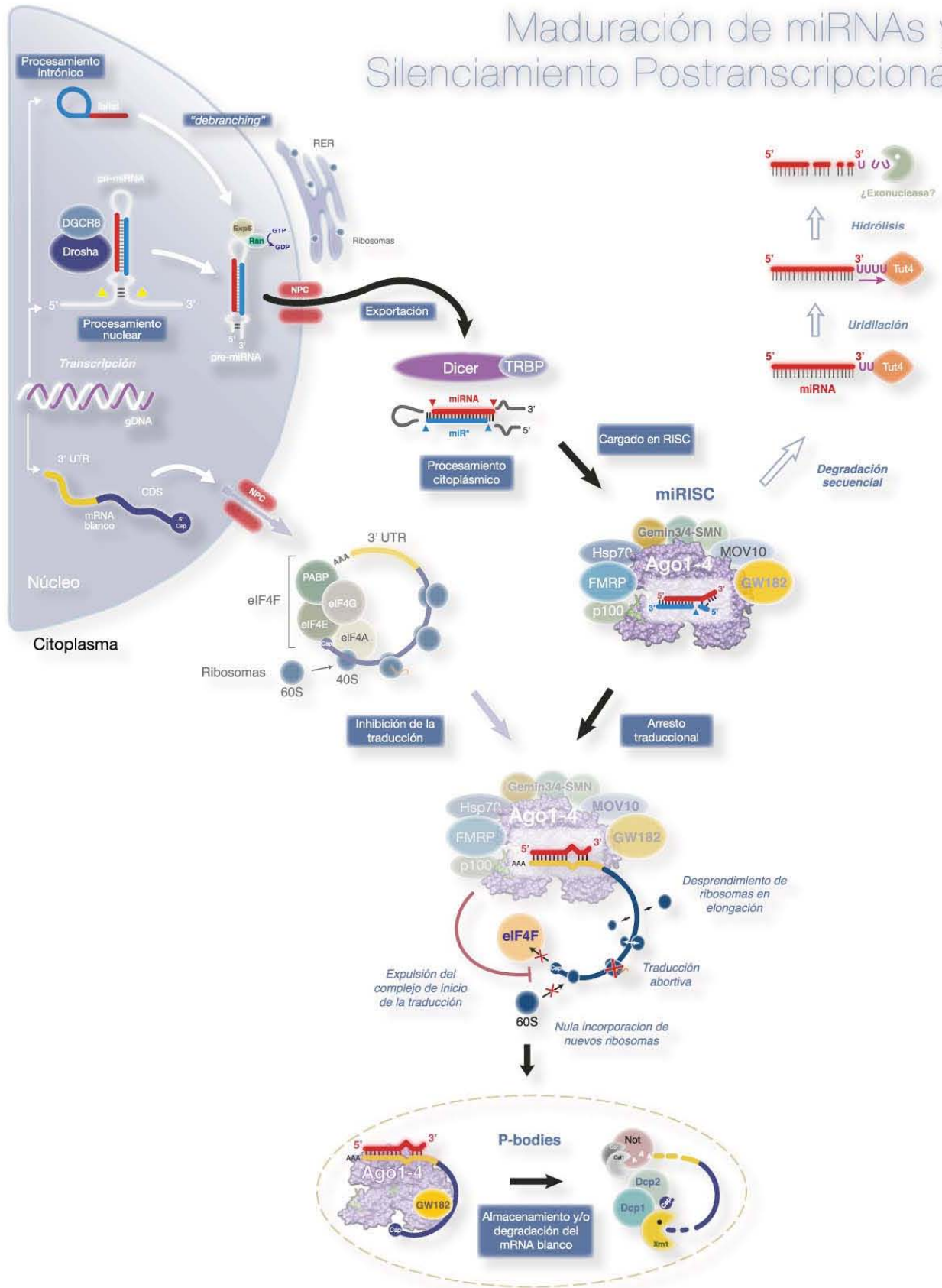


Fig. 1.3.1 Vía de Maduración de miRNAs en Mamíferos. Ver texto para detalles.

El reclutamiento de miRISC a un mRNA puede ocurrir durante la fase de elongación de la traducción<sup>135</sup>, y rápidamente provocar la disociación de los ribosomas, y al mismo tiempo evitando la formación del complejo de inicio de la traducción; ya sea por el reclutamiento del factor eIF6<sup>136</sup>, que impide la unión de las subunidades ribosomales 40S y 60S, o bien limitando la unión de eIF4E al cap y por tanto impidiendo la formación de eIF4F que a su vez recluta a la subunidad mayor del ribosoma (60S)<sup>137-139</sup>. Acerca de cuál es el mecanismo predominante o el evento inicial que desencadena la represión aún sigue en discusión.

Aparentemente, estos mecanismos pueden ser inducidos solamente por el reclutamiento de Ago al complejo traduccional activo en el mRNA blanco, sin embargo en este modelo forzosamente se requieren otras RNPs, en particular GW182 para que la inhibición sea exitosa<sup>140</sup>.

Originalmente, cuando se descubrieron los miRNAs, se pensaba que aún cuando la síntesis de proteínas se detenía, el nivel de expresión del mRNA se mantenía estable<sup>75, 76, 141, 142</sup>. No obstante ahora se acepta que esta observación es más una excepción a la regla. Los mRNAs que son regulados vía RISC son degradados<sup>143, 144</sup>, aunque permanecen almacenados por un tiempo en cerca de los *P-bodies* hasta que, bajo ciertas condiciones celulares, puedan ser traducidos según se requieran<sup>145</sup>.

En animales, la gran mayoría de los miRNAs se une de forma imperfecta a los mRNAs blanco y siguen la vía que se ha descrito arriba. Pero existen algunos casos en los que pueden aparearse de forma perfecta a sus blancos y actuar en la vía del RNAi, como es el caso de miR-196 cuyo blanco es HOXB8<sup>146</sup>, donde una vez que se expresa el miRNA en embriones de ratón entonces se promueve una degradación de su blanco a por acción directa de Ago2.

# CAPÍTULO II

## MICRORNAs DEL SISTEMA NERVIOSO

### 2.1 Función Durante el Desarrollo Embrionario, en el Mantenimiento del Fenotipo Neuronal y en la Plasticidad Sináptica.

El fenómeno regulatorio de los miRNAs está muy conservado en muchos clados, desde plantas hasta animales, excluyendo a los hongos, en donde no parece existir este mecanismo de regulación.

A la fecha sólo existen algunos mRNAs identificados como blancos de miRNAs, esta información en combinación con los datos de expresión en tejido y los análisis funcionales, han mostrado que los miRNAs pueden jugar un papel más global afectando una diversidad de funciones. Entre ellas, los procesos celulares y sistémicos como el metabolismo de lípidos, la secreción de insulina, la apoptosis, el ciclo celular, la transición madre-cigoto, la defensa viral, el patrón del eje de especificación durante el desarrollo embrional, la formación de tejido, la especificación y diferenciación de células madre, etc., todas asociadas a la actividad de miRNAs<sup>90</sup>.

Así como en otros tejidos, los miRNAs son activos jugadores en el desarrollo del sistema nervioso en animales. Son muy importantes para definir la especificación de linaje en células madre así como en el mantenimiento de su fenotipo terminal. Esto lo logran mediante el control múltiple de genes involucrados en el control de programas de transcripción completos pro-neuronales<sup>91, 92</sup>.

En modelos de *knock-out* de Dicer en ratón y pez cebra muestran una rápida hipotrofia del cerebro, incremento en la apoptosis y degeneración de las espinas dendríticas<sup>147, 148</sup>, lo que muestra el papel preponderante que tiene la vía de miRNAs en este órgano.

Al menos dos miRNAs se han determinado como genes maestros que cambian el balance de diferenciación en neuronas: miR-9/9\* y miR-124<sup>149</sup>. Cada uno controla un grupo numeroso de genes y se encuentran entre los miRNAs más abundantes característicos de estas células. Ver *Tabla 4*.

El mayor impacto que tienen estos miRNAs en el desarrollo embrional se da a través de la regulación de factores de transcripción (Foxg1, Sox9) o de modificadores de la cromatina (REST/Co-REST) o de factores de *splicing* pro-neuronal (PTBP1). De hecho, la sola sobreexpresión de miR-124 en células epiteliales provoca un cambio de expresión de hasta el 50% del transcriptoma hacia un fenotipo neuronal<sup>143</sup>. Otros, como let-7, miR-10, miR-17, miR-34, miR-125, miR-132, miR-324-5p y miR-326<sup>92</sup>, también se han involucrado en estos procesos y todos mantienen un alta expresión en el adulto.

<b>Función de miR-9/9*</b>	<b>Especie</b>	<b>Blancos</b>
Suprime la producción de precursores de órganos sensoriales (SOP)	<i>D. melanogaster</i>	Sens
Promueve la ramificación dendrítica	<i>D. melanogaster</i>	??
Restringe la extensión de la frontera del meséncéfalo y telencéfalo (MHB)	Pez cebra	FGF8, FGFR1
Promueve la diferenciación neuronal cerca de la MBH	Pez cebra	Her5, Her9
Limita la generación de células Cajal-Retzius	Roedores	Foxg1
Promueve la diferenciación neuronal de células madre adultas	Roedores	TLX
Potencia la tolerancia al alcohol en el cerebro maduro	Roedores	BK channels
Inhibe la diferenciación astrogliar	Roedores	??
Promueve la proliferación/Limita la migración de precursores neuronales derivados de hESCs	Humano	Stathmin
Puede contribuir a enfermedades neurodegenerativas	Humano	NEFH, REST
Conversión de fibroblastos a iPSCs		
<b>Función de miR-124</b>		
Inhibe la facilitación de largo plazo en sinapsis de neuronas sensorio-motoras	<i>Aplysia</i>	CREB
Suprime la ramificación dendrítica cuando se sobreexpresa	<i>D. melanogaster</i>	??
Promueve la diferenciación neuronal en la espina dorsal/cierre del tubo neural	Pollo	SCP1
Promueve el crecimiento de neuritas	P19 (teratocarcinoma)	RhoA
Regula el crecimiento dendrítico dependiente de la actividad de BAF53b	Roedores	BAF53b
Promueve la diferenciación neuronal durante el desarrollo del cerebro	Roedores	REST, PTBP1, Ephrin-B1
Promueve la neurogénesis en el adulto	Roedores	Sox9
Promueve la diferenciación neuronal	Roedores	??
Plasticidad sináptica inducida por cocaína en el cerebro adulto	Roedores	CREB, BDNF

**Tabla 4. Funciones Asociadas a microRNAs Pro-Neuronales.** Ambos miRNAs realizan participan en el control de programas de expresión complementarios y a veces antagónicos, dependiendo de la etapa del desarrollo y el contexto celular. hESCs, células madre embrionarias de humano; iPSCs, células pluripotenciales inducidas. Modificado de Gao, FB. Ver las referencias contenidas<sup>149</sup>

De hecho, una variedad de miRNAs están asociados a una rápida divergencia evolutiva en humano con respecto a otros primates, incluyendo nuestro antepasado homínido más cercano en el Neanderthal (e. g. miR-34c), los cuales muy posiblemente estén involucrados en procesos de plasticidad sináptica<sup>150, 151</sup>.

Varios autores han reportado alteraciones en la fisiología y estructura sináptica en diversos organismos con mutaciones en proteínas de la vía de maduración de miRNAs. Por ejemplo, mutantes hipomórficas en Drosha, DGCR8 (Pasha) y Dicer-1 en *D. Melanogaster* muestran niveles reducidos de miRNAs y deficiencias en la transmisión sináptica de los fotorreceptores en los ojos de la mosca, aunque interesantemente no muestran defectos neuronales durante el desarrollo<sup>152</sup>. En ratones condicionales para Dicer muestran alteraciones a nivel de espinas dendríticas<sup>147</sup>, que en tiempos cortos estimulan el aprendizaje en tareas de reconocimiento de objetos novedosos<sup>153</sup>. Sin embargo estos animales muestran defectos en la arborización dendrítica y una pobre transmisión excitatoria.

Este tipo de alteraciones también pueden ocurrir cuando proteínas accesorias de RISC funcionan incorrectamente. Entre ellas se encuentran FMRP<sup>3, 154, 155</sup>, que funciona como un puente molecular entre RISC y los gránulos neuronales (NGs)<sup>156</sup>, participa en el silenciamiento post-transcripcional de una variedad de mensajeros dendríticos y acarrea miRNAs como miR-125b y miR-128 que tienen blancos sinápticos<sup>157</sup> y también se asocia a los cuerpos de procesamiento de RNA (p-bodies)<sup>158</sup>. En ocasiones, cuando su promotor está hipermetilado gracias a una expansión anormal de islas CpG en el DNA<sup>5</sup>, FMRP no se sintetiza y consecuentemente la síntesis de proteínas es anormalmente alta en las neuronas, en particular en las dendritas. Este fenómeno se ha observado en al menos el 50% de los casos de retraso mental en humanos<sup>159</sup>. Su deficiencia provoca el crecimiento desmedido de espinas dendríticas inmaduras y una pobre comunicación interneuronal<sup>160</sup>.

No es de sorprender que alteraciones en estas proteínas tengan un efecto pleiotrópico de tal magnitud. Fxr1 también participa en el procesamiento de miR-9 y miR-124, los cuales regulan negativamente su expresión en un sistema de asa de regulación negativo, ya que el mRNA que lo codifica contiene MREs para ambos miRNAs<sup>161, 162</sup>.

Por otra parte, alteraciones en otras proteínas como Atx2 y Me31b, que se asocian a NGs y son causantes de ataxia en humanos cuando están mutadas, también tienen un efecto deletéreo en la plasticidad sináptica en moscas y ratones<sup>163-166</sup>.

El homólogo en mamíferos de Armitage en *Drosophila*, MOV10 (*Moloney Leukemia Virus 10*), una helicasa dependiente de ATP del tipo DEaD box que también se asocia a RISC<sup>167</sup>, es esencial para el aprendizaje condicionado de aromas en neuronas de los cuerpos pedunculados (*mushroom bodies*) y es abundante en dendritas. Cuando ocurre un incremento en la transmisión excitatoria acompañada de una elevación de calcio momentánea, se induce la degradación de Armitage y se libera la represión traduccional de RISC. Ello permite la traducción de mensajeros dendríticos como CamK2 que refuerza la eficacia sináptica<sup>10</sup>. En mamíferos un fenómeno semejante se ha encontrado en neuronas de hipocampo de ratón<sup>165</sup>.

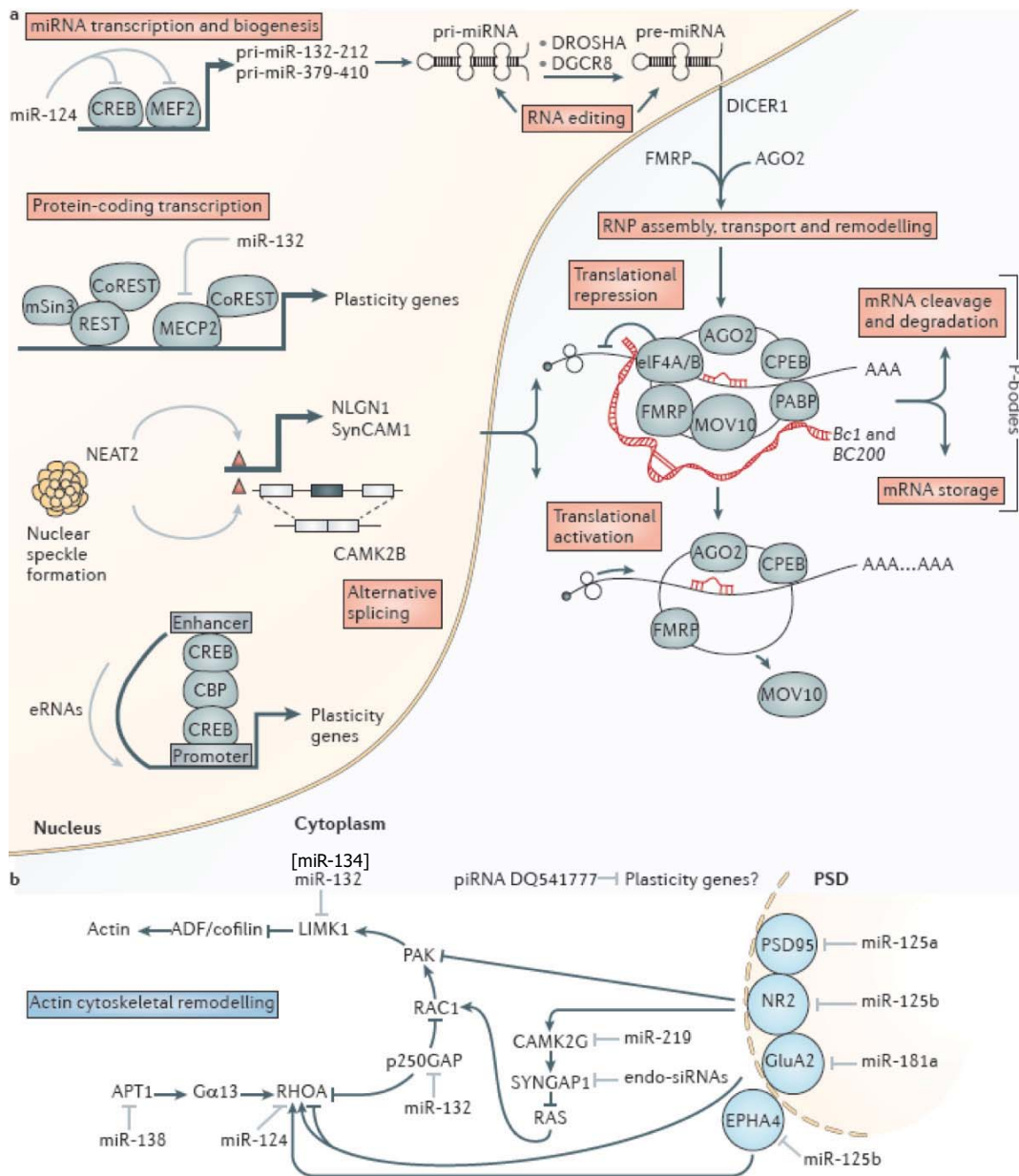
A la fecha al menos 12 miRNAs se han asociado con plasticidad sináptica, en particular con fenómenos de potenciación y depresión a largo plazo (LTP y LTD respectivamente)<sup>168-170</sup>. Ver Fig. 2.1.1 y Tabla 5.

<b>Función</b>	<b>miRNAs</b>	<b>Biancos</b>
Modulación del crecimiento arborización dendrítico	miR-124, miR-125b, miR-132, miR-134, miR-137 y miR-485	RhoA/CREB/MEF2, Nr2a , MeCP2, Limk1, KRas y Sv2a
Formación de sinapsis	let-7, miR-125b, miR-132, miR-138 y miR-485	KRas, Epha4, pGAP250, Apt1, Sv2a
Función sináptica y plasticidad	miR-1, miR-132, miR-134, miR-181a, miR-219, miR-284 y miR-485	Nrx1, Nr2a, Limk1, Glua2, Camka2g, GluR2a/b, Sv2a

**Tabla 5. microRNAs Implicados con Plasticidad Sináptica.** Funciones generales de regulación de la plasticidad sináptica y los miRNAs asociados con dichos cambios y sus blancos moleculares. Modificado de Qureshi & Mehler<sup>66</sup>.

Fue en el molusco *Aplysia californica* en donde se identificó por vez primera el control de CREB por miR-124 y su papel en la facilitación sináptica, que es una forma de LTP en invertebrados<sup>171</sup>. En este paradigma, la hipoexpresión dendrítica de miR-124 en neuronas sensoriomotoras, derivada la estimulación con serotonina, aumenta la eficacia sináptica y el aprendizaje condicionado de la neurona motora. A diferencia de los mamíferos, miR-124 sí está enriquecido en las dendritas de la neurona motora. En este mismo modelo se ha demostrado que otros sncRNAs participan en la consolidación de la memoria. En este sistema se descubrieron varios cientos de piRNAs que cambiaban su expresión después de entrenar al animal bajo el mismo paradigma. En especial un piRNA, DQ541777, ha demostrado tener un papel de silenciamiento de genes no consolidantes de la facilitación como CREB2, que es el mayor inhibidor para el establecimiento de la memoria en *Aplysia*<sup>172</sup>. Este miRNA ayuda a metilar el promotor en respuesta al incremento de estimulación con serotonina (5-HT).

En resumen, en neuronas los miRNAs cumplen un papel preponderante no solamente en los eventos globales de diferenciación celular sino también en el control de una de las funciones primordiales que llevan a cabo las neuronas: la comunicación sináptica. Apenas se está descubriendo el el papel que estas pequeñas moléculas tienen en neuronas del adulto en condiciones normales y patológicas en donde parecen tener un rol central.



**Fig. 2.2.1. Funciones Asociadas de microRNAs con el Control de la Expresión Génica Global y de LTP en Neuronas.** (a) Las cajas anaranjadas enlistan funciones en las que se han implicado a los miRNAs (y otros ncRNAs) en neuronas maduras así como algunos de los factores de transcripción que son regulados o que controlan la expresión de miRNAs. (b) Esquema general miRNAs y mensajeros involucrados en la remodelación de la estructura de las espinas dendríticas (izquierda) así como de genes centrales en la plasticidad sináptica (derecha). Se incluye al único piRNA asociado a la facilitación a largo plazo en el molusco *Aplysia*. Tomado de Qureshi & Mehler<sup>66</sup>. *Erratum*: La expresión de LIMK1 en espinas dendríticas de hipocampo está controlado por miR-134 y no por miR-132 como se indica en la figura original.

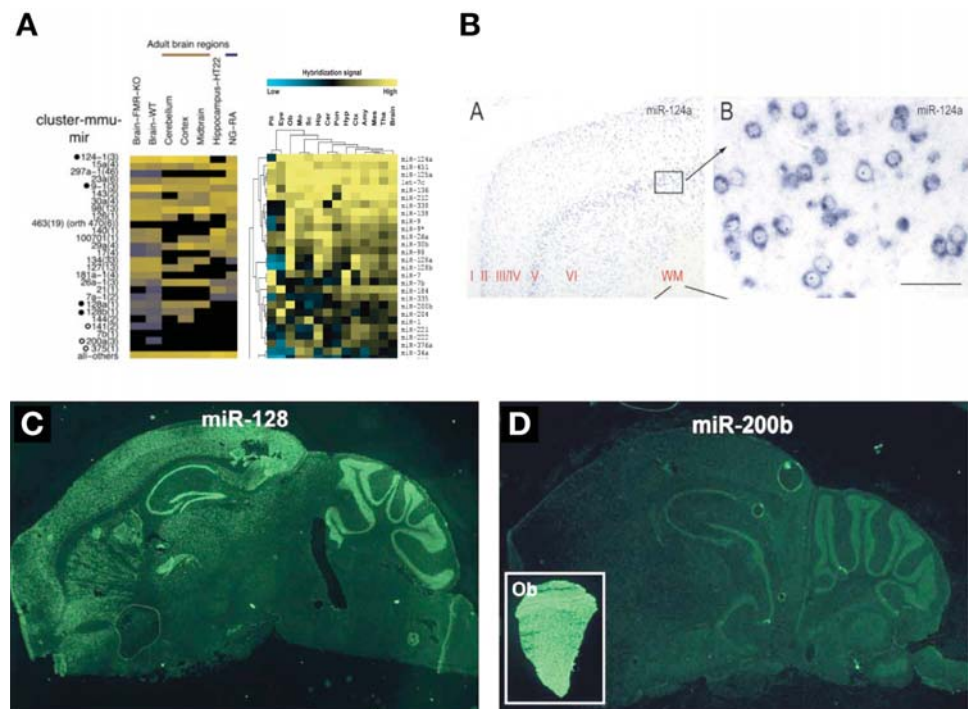


## 2.2 Expresión Neuroanatómica y Subcelular Variable de microRNAs Neuronales.

Desde que se comenzaron a clonar los primeros miRNAs, rápidamente se encontró que tenían patrones de expresión espacio-temporales bien definidos, y esto también es cierto en el sistema nervioso<sup>19, 173</sup>. Como se mencionó anteriormente existe una población de miRNAs que son importantes para la función neuronal. De hecho se estima que al menos el 50% de todos los miRNAs en el humano y en la rata son expresados en este tejido.

Como en muchos casos, en el cerebro y en el resto del sistema nervioso central (SNC) hay gradientes de expresión de miRNAs que dependen del tipo celular y de la región de que se trate. Esta estrategia biológica permite adquirir o mantener un nivel de especialización que correlaciona con su función particular.

A la fecha existen varios mapas neuroanatómicos de expresión de miRNAs en los cuales se han identificado áreas de expresión específica y compartida de miRNAs<sup>18, 23, 24, 74, 174, 175</sup> (Fig. 2.2.1).

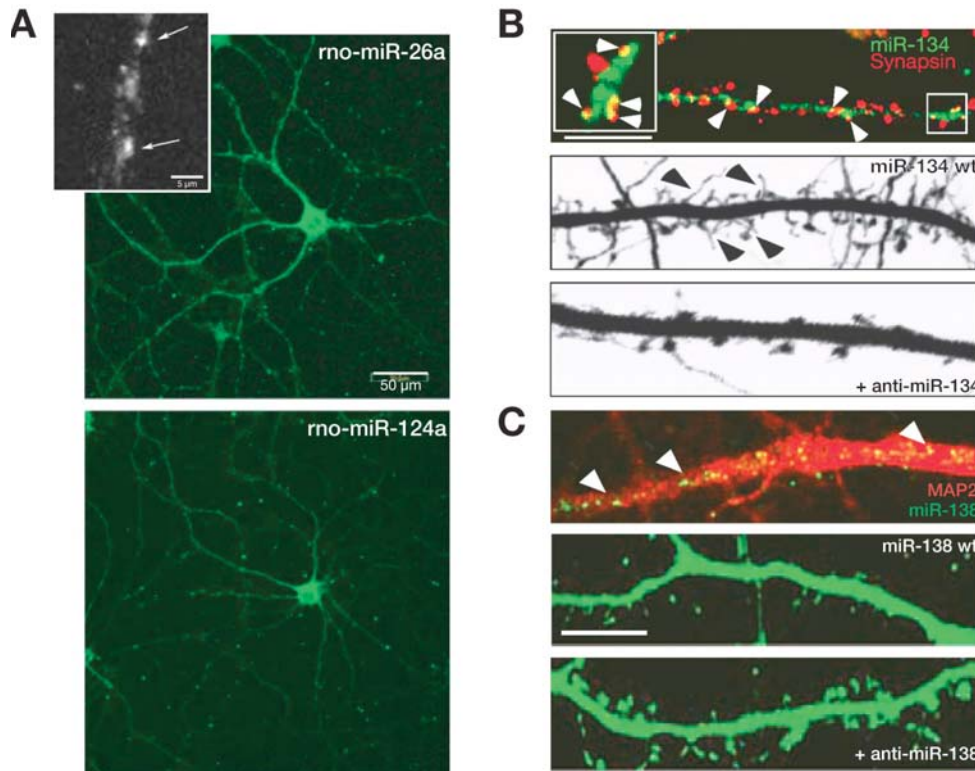


**Figura 2.2.1. Expresión de microRNAs en el Cerebro de Roedor.** (A) Microarreglos de expresión de miRNAs de diferentes áreas del cerebro. Landgraf et al.<sup>18</sup> (izquierda); Bak et al.<sup>24</sup> (derecha) (B) Hibridación in situ (ISH) de miR-124, con sondas LNA, en corteza frontal de ratón. La figura de la derecha B es un acercamiento que denota localización preferente en la soma neuronal. Nelson et al.<sup>257</sup> (C) ISH fluorescente (FISH) de miR-128 enriquecido en corteza, cuerpo estriado, hipocampo y cerebelo. (D) FISH de miR-200b de expresión casi exclusiva de bulbo olfatorio. Bak et al.

Se ha demostrado que existe una subpoblación de miRNAs neuronales que tienen una distribución somato-dendrítica que les permite regular de forma local la expresión de mensajeros blanco colocalizados. Éstos se detectaron primero en dendritas disecadas con láser, mediante qRT-PCR multiplexado<sup>176</sup>, y después en SN obtenidos por filtración secuencial, mediante análisis de microarreglo, mismos que se validaron por NB, ISH, FISH y estudios funcionales.

Entre los miRNAs dendríticos mejor caracterizados están miR-29a/b, miR-134, miR-132, miR-138 y miR-181a entre otros. La función local más evidente ha sido la de regular la morfología de las espinas dendríticas en función de estímulos como la exposi-

ción a BDNF, (una neurotrofina necesaria para la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica), despolarización prolongada y aumento local de calcio en la sinapsis<sup>2, 15, 177, 178</sup> (Fig. 2.2.2).



**Figura 2.2.2. microRNAs Somato-Dendríticos con Función Localizada en Espinas Dendríticas.**

(A) ISH con sondas de LNA de miR-26a y miR-124a en neuronas hipocámpales de cultivo primario (18 DIV). Nótese el patrón punteado en el inserto (flechas blancas)<sup>176</sup>. (B) Colocalización de una sonda marcada con FITC (verde) e hibridada con miR-134 y un anticuerpo marcado con rodamina anti-Synapsina, un marcador post-sináptico (rojo). Los puntos amarillos indican vecindad entre las moléculas. En condiciones basales (panel central), las espinas dendríticas son largas y delgadas, es decir, inmaduras. Cuando se agrega un oligo 2-O-metilado que titula a miR-134, las espinas se tornan enanas y anchas, o sea, maduras. El mismo efecto se observa con BDNF<sup>2</sup> (panel inferior). (C) Colocalización de miR-138 y MAP2 (proteína de citoesqueleto) en dendritas de neuronas hipocámpales de cultivo primario (18 DIV)<sup>15</sup>. La transfección de un 2-O-metil-oligo complementario a miR-138 favorece una estructura madura de las espinas dendríticas, similar a la inhibición de miR-134 (panel inferior), aunque mediante mecanismos diferentes. Ver texto. La barra blanca indica 20 µm en C y D.

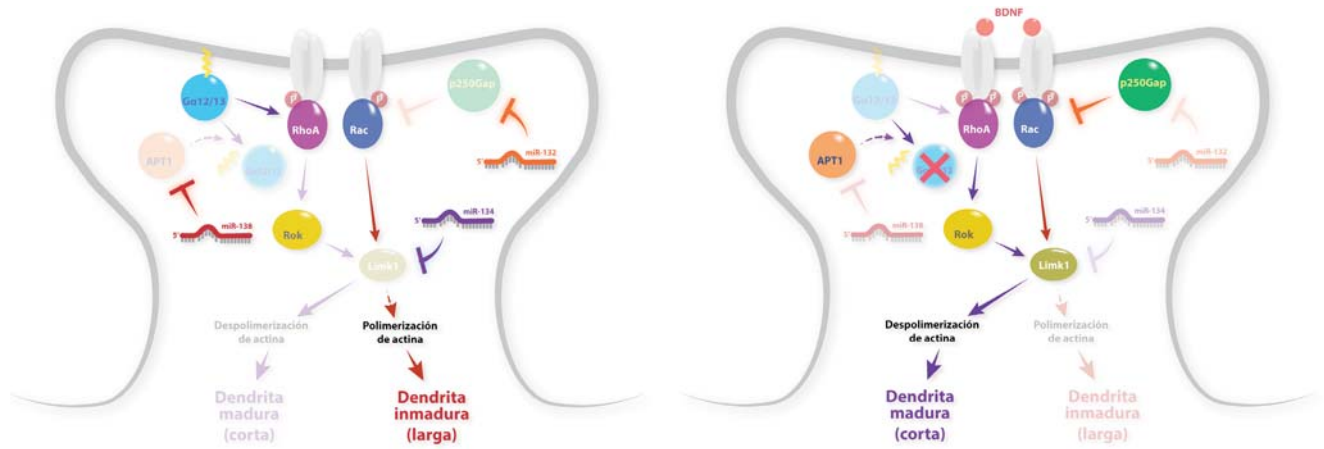
miR-134 regula a Limk1, una cinasa que fosforila al complejo ADF/Cofilina que despolimeriza los filamentos de actina que le dan altura a la espina dendrítica. En presencia de BDNF, el receptor TrkB se autofosforila y activa la vía de Rac, lo que a su vez provoca la liberación del miRNA del mensajero de Limk1, causando la desagregación de actina F localmente. Esto disminuye la extensión de la espina y adquiere un fenotipo enano y maduro.

miR-132 tiene un efecto antagónico a miR-134, al regular a p250Gap, una Rho GTPasa que actúa río arriba en la vía, inhibe a Rac, que es un regulador positivo de Limk1<sup>179, 180</sup>. Cuando la represión traduccional por estos miRNAs se retira (e. g., en presencia de BDNF), por un lado aumenta la expresión de Limk1 acelerando la despolimerización de actina, pero por otro también va aumentando gradualmente el p250Gap, para ir frenando a la actividad de Limk1 y evitar la retracción total de la espina dendrítica. Cuando este sistema está frenado por ambos miRNAs el fenotipo de la espina es alto y estrecho.

En suma, este mecanismo no apaga totalmente la expresión de ambos genes, sino que dosifica su abundancia local, la cual cambia únicamente en función de los estímulos externos que activan cascadas de señalización apropiadas.

miR-138 tiene un efecto opuesto al anterior, favorece la maduración morfológica de la espina (corta y ancha). Tiene como blanco a una proteína acil-tio-esterasa (Apt-1/Lypla-1) que normalmente retira un residuo de ácido mirístico de una proteína G trimérica, Gα12/13, lo que provoca que pierda su anclaje a la membrana y se diluya en el dendroplasma. Cuando está anclada, Gα12/13 activa a la GTPasa RhoA (de la familia Ras), que además requiere una fosforilación coincidente por un receptor tipo Trk con ligando. Cuando esto ocurre, se activa a la cinasa Rok y fosforila a Limk1 provocando la desestabilización del citoesqueleto de

actina y reduciendo la altura de la espina, como se explicó arriba. (Fig. 2.2.3). El tiempo en el que BDNF esté presente y la competencia entre ambos mecanismos es lo que en parte define la estructura final de la espina dendrítica.

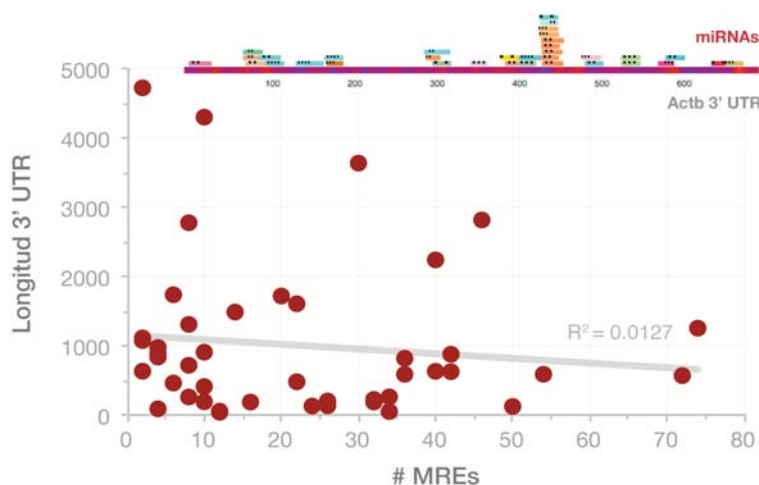


**Figura 2.2.3. Mecanismo Concertado de Regulación Morfológica de las Espinas Dendríticas por microRNAs.** El estado basal (izquierda) ocurre en ausencia de BDNF y la cantidad de proteína de APT1, p250gap y Limk1 es limitada. Cuando el receptor de BDNF se activa (derecha) la represión por miRNAs cesa, pero cuando aumenta p250gap y disminuye Ga12/13 entonces la vía de activación de Limk1 se va autolimitando, hasta que llega a un nuevo equilibrio. Probablemente otras vías confluyan en este mecanismo. Ver texto para detalles.

Dado que los miRNAs actúan concertadamente es probable que haya otros que participen en este y otros procesos dendríticos.

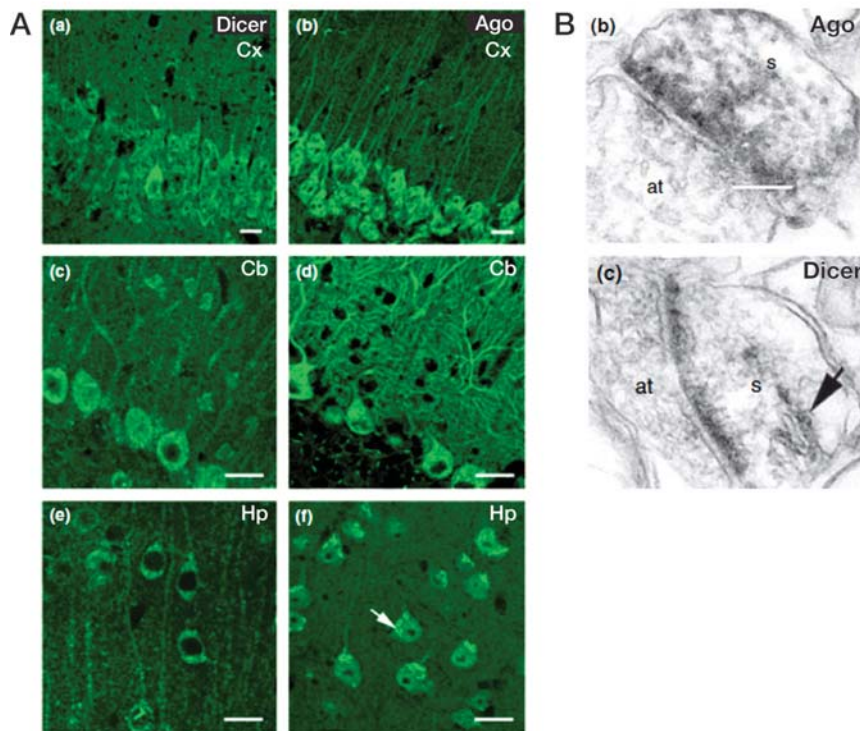
¿Cuántos y cuáles miRNAs tienen la misma distribución intracelular? ¿Cuál es su nivel de expresión local? ¿Éste depende del contexto de cada región del cerebro como ya se había estudiado? ¿Cuáles mRNAs pueden ser los blancos de estos miRNAs dendríticos?

Basado en el estudio publicado por Cajigas et al. (ver sección ii) al menos 64 de 87 mensajeros, que fueron identificados en dendritas mediante FISH, poseen varios centenares de sitios predichos de unión a miRNAs (MREs) en sus secuencias 3' UTR (Fig. 2.2.4). Aunque no existe una correlación entre el tamaño de estas secuencias y el número de MREs presentes, es claro que dichos mensajeros tienen un alto potencial de regulación por otros miRNAs que se expresen en el SNC, en especial en las dendritas.



**Figura 2.2.4. Frecuencia de Secuencias Semilla de microRNAs en Mensajeros Somato-Dendríticos.** Los MREs fueron predichos mediante los algoritmos microCosm y miRanda mediante el servidor miRDip (<http://ophid.utoronto.ca/mirDIP>) usando como referencia 47 mensajeros somato-dendríticos experimentalmente demostrados en el trabajo de Cajigas, IJ. et al. 49 de los cuales se obtuvieron las secuencias 3' UTR de rata de la base de datos de Ensembl mediante Biomart (<http://central.biomart.org/sequence>). Los MREs predichos se basan en un alto grado de conservación (>80% entre 2 a 5 especies de mamíferos). En el inserto superior se ejemplifica la multiplicidad MREs en el extremo 3' UTR del mRNA codificante de beta actina (Actb) de rata. El MRE localizado cerca del codón de Stop (porción izquierda) corresponde a miR.125b que tiene una expresión robusta en dendritas.

Algunas proteínas de la maquinaria del RNAi (i. e., Dicer y Argonauta) son muy abundantes también en los procesos dendríticos de neuronas maduras (Fig. 2.2.5). Aunque no en todos los casos su marca coincide con el marcador post-sináptico PSD-95, lo que sugiere que solamente algunas sinapsis son “marcadas” con este mecanismo de regulación.



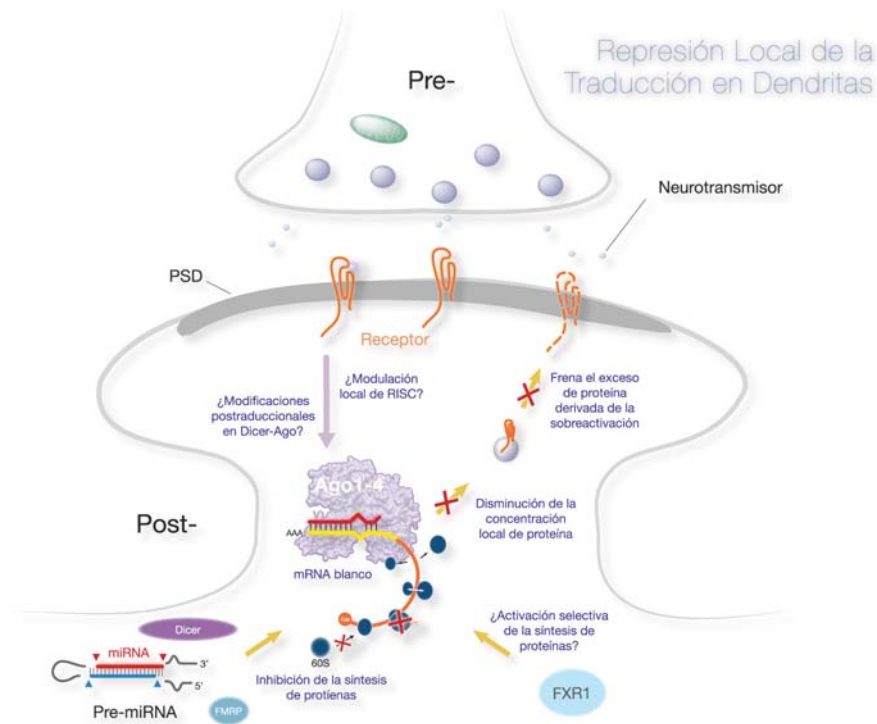
**Figura 2.2.5. Dicer y Ago en Dendritas de Neuronas Maduras.** (A) Inmunohistoquímica de Dicer (paneles a, c, e) y Argonauta (paneles b, d, f) en Corteza (Cx; a-b), Cerebelo (Cb; c-d) e Hipocampo (Hp; e-f) de ratón. Los anticuerpos usados son policlonales y en el caso de Ago detecta todas las isoformas de la proteína. En todos los casos se observan *foci* de Ago en la región perinuclear y nuclear. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ . (B) Inmunolocalización por actividad de peroxidasa de rábano (HRP) acoplada a anticuerpos anti-Ago (b) y anti-Dicer (c) en espinas dendríticas (s). Nótese que la mayor precipitación de la solución de revelado ocurre en la porción post-sináptica. At, terminal axonal. Modificado de Lugli et al.<sup>8</sup>

El enriquecimiento encontrado de estas proteínas en dendritas fue uno de los primeros indicios de que los miRNAs podían ejercer una actividad preponderante en el espacio peri-sináptico. Otros componentes de RISC como la helicasa MOV10 o la nucleasa SMN también han sido encontrados en los mismos procesos membranales, tanto en dendritas<sup>165</sup> como en axones de neuronas en desarrollo<sup>181</sup>.

Un aspecto interesante es que estos componentes, en particular de Ago2, se distribuyen en pequeños *foci* (focos de localización) que presentan un movimiento anterógrado a lo largo de la dendrita, el cual aumenta en función de la estimulación con agonistas de receptores de glutamato de tipo NMDA (excitatorios)<sup>182</sup>. Este tipo de estimulación realizada en terminales sinápticas aisladas aumenta la concentración de calcio local, lo que activa a la proteasa calpaína y provoca la fragmentación de Dicer. Aparentemente esto ayuda a que su actividad catalítica incremente localmente cortando con mayor procesividad sustratos de dsRNA como son los pre-miRNAs. De hecho algunos pre-miRNAs están altamente enriquecidos en estas preparaciones, y en algunos casos su concentración es mucho mayor que que la correspondiente a fragmento maduro<sup>14</sup>.

Esto puede ser un mecanismo en el que se reserva un “*pool*” de miRNAs no comprometido en la traducción que solamente se libera una vez que la actividad neuronal se incrementa, aumentando la capacidad catalítica de Dicer y permitiendo la movilización de nuevos complejos RISC a las sinapsis estimuladas, con el fin de amortiguar el exceso de proteína que potencialmente puede producirse (Fig. 2.2.6). Esto tiene sentido pues la tasa de recambio de hebras líder en RISC *in vitro* es de aproximadamente 5 minutos<sup>78</sup>, tiempo suficiente para iniciar cambios plásticos en la sinapsis.





**Figura 2.2.6. Modelo General de Regulación Traduccional por microRNAs en Espinas Dendríticas.** Además de que la maquinaria de traducción está localizada en la cercanía de las espinas dendríticas, también RISC y Dicer colocalizan en estos sitios. En condiciones basales esta maquinaria puede estar reprimiendo mensajeros que normalmente son translocados a la sinapsis hasta que su traducción sea requerida, por ejemplo bajo condiciones de aumento de la transmisión sináptica. Esto lo hacen fortaleciendo otros mecanismos como por ejemplo los mediados por FMRP. Por otro lado, el silenciamiento local de la traducción puede requerirse para acotar el incremento de la síntesis de proteínas que sobreviene al aumento de la actividad de transmisión sináptica o por la estimulación con factores de crecimiento. Esto activa cascadas de señalización (no indicadas) como de AKT/PKC o MAPK/ERK que modifican a RISC e inhiben su efecto represor, el cual puede estar acompañado de un mayor procesamiento de pre-miRNAs *in situ* con la finalidad de limitar temporalmente la traducción y evitar la sobreactivación. Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes y pueden operar en fases. Un mayor procesamiento de precursores de miRNAs puede estar acompañado de complejos RISC que se movilizan con mayor velocidad después de la activación neuronal. La interacción con otras RNPs puede dirigir el destino de cada complejo RISC funcional. Así, incluso puede revertir su actividad y promover la traducción selectiva de algunas poblaciones de mRNAs, vía FXR1, pero esto requiere mayor escrutinio en el contexto neuronal.

Finalmente, una hipótesis más aventurada es que el complejo RISC no solamente reprima la traducción, sino que bajo ciertas condiciones de hecho la favorezca. Se ha observado que bajo un contexto de privación de suero o de arresto del ciclo celular, la asociación con la proteína FXR1, que es un parálogo de FMRP en mamíferos, favorece la traducción de mRNAs de forma específica mediante un mecanismo que aún no se ha disecado<sup>183, 184</sup>.

Estos escenarios no son mutuamente excluyentes y pueden operar simultáneamente, lo cual es un reto enorme para poder disecar cada vía de acuerdo con el miRNA específico del que se trate.

## 2.4 El Modelo de Sinaptoneurosomas (SN) como Aproximación al Estudio de microRNAs Sinápticos.

Para este proyecto, se probaron varias metodologías de purificación de SN para obtener la mayor pureza posible, libre de contaminantes provenientes del soma neuronal y/o de las células gliales como astrocitos u oligodendrocitos, así como de la actividad de RNAsa. Al final, se modificaron al método de Carlin et al.<sup>185</sup>, con el que obtuvimos la mejor integridad ultraestructural y limpieza de todas.

Esta preparación proporciona varias ventajas, entre las cuales se encuentran:

1. El aislamiento de sinapsis de cualquier área del cerebro de interés, lo que en nuestro caso permitió establecer un mapa neuroanatómico de la expresión de miRNAs en el cerebro, sin precedentes al momento de la publicación del artículo asociado a este trabajo.
2. Un rendimiento de RNA y proteína suficientemente alto para su análisis por medio de técnicas cuantitativas y semi-cuantitativas.
3. Bajo costo relativo a otras técnicas como las de cultivo celular en donde no se pueden aislar sinapsis puras y cuyas diferencias con los organismos vivos pueden ser fundamentales, especialmente a nivel molecular. Muchos trabajos publicados sobre miRNAs sinápticos estaban realizados en neuronas diferenciadas en cultivo.
4. Constituyen una instantánea del estado sináptico de animales vivos adultos con un sistema nervioso intacto al momento de la disección.
5. Son muy útiles dentro de diversos paradigmas experimentales tanto *in vivo* e *in vitro*, para analizar los efectos locales de expresión de una variedad de genes así como de la abundancia local de proteínas e intermediarios químicos en cascadas de señalización. En este caso, el paradigma que se usó fue el de la inducción farmacológica de epilepsia mediante aplicación sistémica de ácido kainico (KA), que es un modelo ampliamente documentado y validado, reminiscente de patologías observadas en humanos y en animales.
6. Constituye un modelo que permite evaluar la expresión de genes en sinapsis de neuronas maduras intactas, en donde se sabe relativamente poco acerca de la expresión de miRNAs sinápticos.
7. Finalmente, que permite comparar el contenido sináptico con las fracciones totales para establecer una diferencia entre el extracto crudo o total, que contiene el núcleo celular y el citoplasma perinuclear, y el sinaptoneurosomal.

Entre las desventajas de este sistema se encuentran:

1. Tener una gran cantidad de tejido (aproximadamente 1 g) para obtener suficiente material de análisis.
2. Que ocupa mucho tiempo por extracción, lo que puede ser crítico cuando se trabaja con RNA de bajo peso molecular.

Como se indica con precisión en el apartado 5.1 del capítulo de materiales y métodos, se utilizó una preparación cuya característica principal era la sedimentación de terminales sinápticas enriquecida con densidades post-sinápticas (PSDs), mediante la centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa.



Este método fue refinado alterando algunos pasos críticos para aumentar la calidad del RNA extraído así como la pureza de las fracciones. Éstas incluyeron el incremento de la velocidad de disección, la adición de inhibidores de RNAsas, la añadidura de pasos en la centrifugación así como una dilación del tiempo de corrida, el número y calidad de los golpes durante la homogeneización, disminución de las revoluciones por minuto aplicadas, y finalmente de la eliminación de un paso de homogeneización con vidrio, que provocaba un daño significativo sobre los SN (al juzgar por el análisis ultraestructural que mostró una amplia edematización mitocondrial y la constante fractura de membranas que no se resellaban durante la extracción

Esta metodología resultó ventajosa, ya que proveía de RNAs contenidos principalmente en los elementos post-sinápticos, que corresponden mayoritariamente a sinapsis axo-dendríticas, tal como se observó más tarde, basados en la medición de algunos marcadores de RNA y de proteína.

El análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró un número importante de sinapsis que aún mantenían los elementos pre- y post-sinápticos unidos; pero también una gran cantidad de densidades post-sinápticas dispersas, semejante a los resultados obtenidos en los trabajos base. La validación de la pureza a nivel de marcadores de RNA y proteína se describe más adelante en la sección 4.1 de resultados.

# CAPÍTULO III

## HIPÓTESIS

Y

## OBJETIVOS

1. Existe una población de microRNAs de localizados en sinapsis del cerebro de la rata adulta, que es detectable en fracciones sinaptoneurosomales puras.

- ▶ Validar un modelo de sinaptoneurosomas (SN) apropiado para el análisis de microRNAs, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), Western blot (WB) y qRT-PCR.
- ▶ Identificar microRNAs en SN mediante Dot blot (DB) y Northern blot (NB).

2. La expresión de microRNAs en el sistema nervioso central presenta una distribución neuroanatómica diferenciada.

- ▶ Analizar la expresión global de los microRNAs sinápticos mediante microarreglo, de SN de cerebro completo de rata adulta y así como de cinco áreas neuroanatómicas diferentes.

3. Hay una distribución asimétrica de microRNAs entre la fracción total y SN que es variable según cada componente neuroanatómico.

- ▶ Determinar las diferencias de expresión de microRNAs sinápticos entre cada fracción total y sinaptoneurosomal respectiva.
- ▶ Confirmar dichas observaciones mediante qRT-PCR y NB de miRNAs seleccionados.

4. La despolarización neuronal prolongada inducida in vivo modifica la expresión de los microRNAs en las sinapsis de forma selectiva y específica de tejido.

- ▶ Medir el efecto epileptogénico del ácido kaínico sobre la expresión de microRNAs sinápticos mediante qRT-PCR y NB.

# CAPÍTULO IV

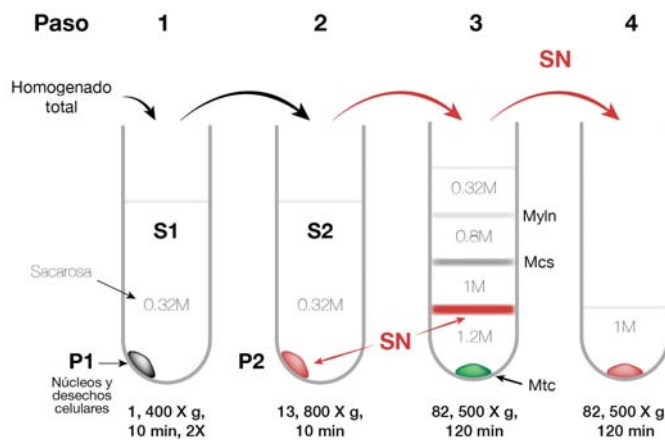
## RESULTADOS I:

### VALIDACIÓN DEL MODELO DE SN PARA EVALUAR LA EXPRESIÓN DE MICRORNAs SINÁPTICOS.

#### 4.1 Microscopía Electrónica.

Originalmente se utilizaron dos métodos distintos de purificación de sinaptoneurosomas (SN), sin embargo uno de estos métodos fue descartado cuando se halló contaminación de RNAs nucleolares (e. g., snoRNA U43) y el otro se adaptó hasta que se obtuvo una nula señal del mismo marcador en SN.

Las adaptaciones realizadas a este último método (Ver Fig. 4.1.1 y sección 8.1 en el Cap. VIII) incluyeron a) un aumento en el volumen de sacarosa utilizado para el gradiente, b) un aumento en el número de pasos de centrifugación, en particular al final de la purificación, así como en c) el tiempo de centrifugación, en los pasos 3 y 4, lo que permitió concentrar mejor cada fracción sin perder integridad estructural de las membranas recuperadas.

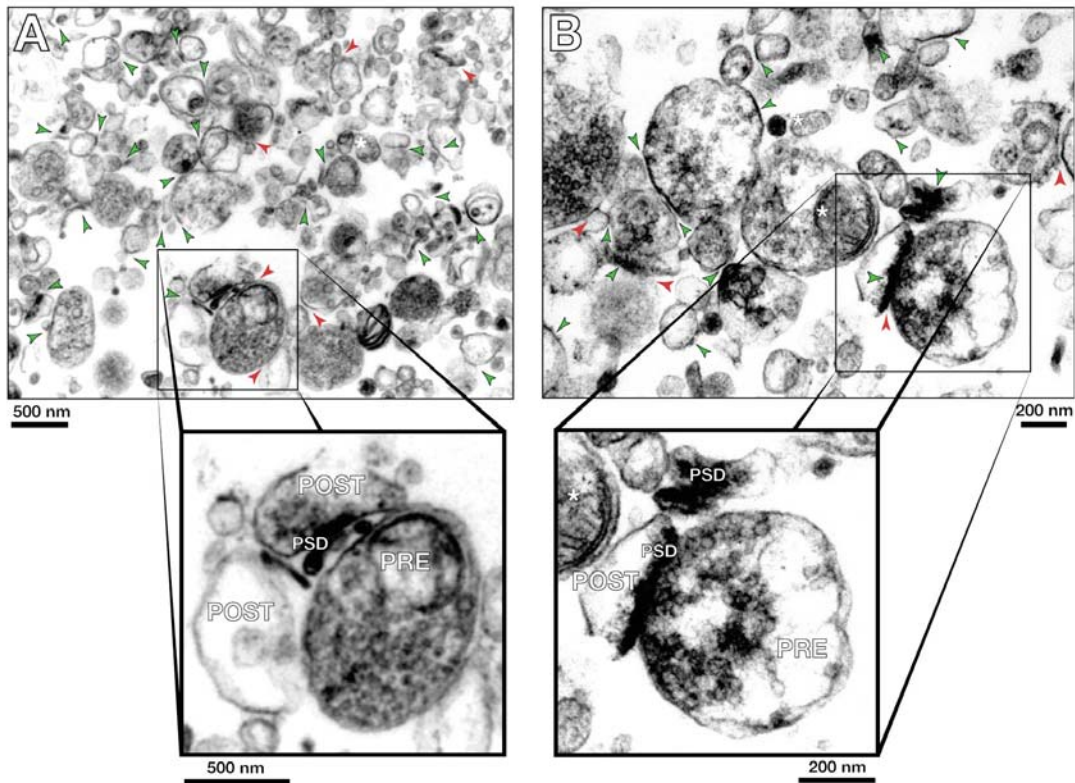


**Figura 4.1.1. Método de Purificación de Sinaptoneurosomas (SN).**

Este método se basa en centrifugación secuencial en gradientes de isopínicos de sacarosa (concentración indicada en cada tubo). Aproximadamente 1g de tejido se homogeneiza -fracción Total- en Buffer A (ver Apéndice IA) y es centrifugado 4 veces hasta obtener un pellet (rojo). En cada paso se recuperan alícuotas de todas las fracciones para ser analizadas por WB. La interbanda SN en el paso 3 se recupera con una pipeta Pasteur. Mtc, mitocondria; SN, sinaptoneurosomas; Mcs, microsomas (retículo endoplásmico fragmentado); Myln, mielina (oligodendrocitos). S1 y S2 indican sobrenadantes. La velocidad y duración de cada corrida se indica en la parte inferior.

El análisis ultraestructural de SNs de cerebro completo, realizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), mostró una alta frecuencia de densidades post-sinápticas (PSDs), asociadas a membranas reselladas. Además se encontró un número menor de sinapsis completas (denominadas sinaptosomas; Syn), reconocidas por a) la presencia de membranas cerradas yuxtapuestas, b) con asimetría electrodensa en un elemento (PSDs), c) y con un contenido vesicular en el otro (Fig. 4.1.2).

Las PSDs fueron encontradas con una proporción aproximada de 20:1 con respecto a los sinaptosomas en al menos 30 campos analizados de las 5 regiones del cerebro que se estudiaron, lo que confirma que la fracción SN está enriquecida con elementos post-sinápticos, más que con sinaptosomas.

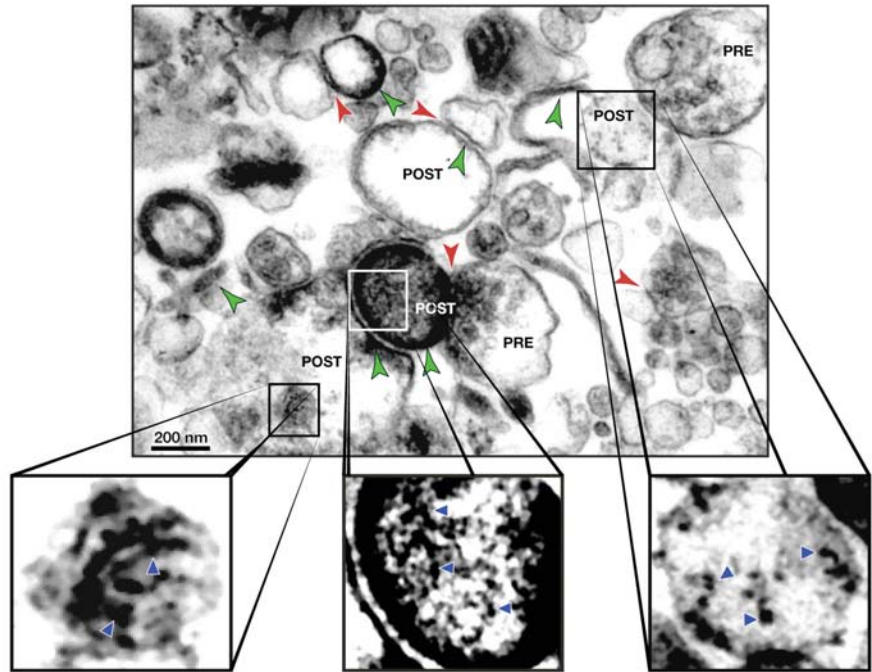


**Figura 4.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión de Sinaptoneurosomas de Cerebro Completo.** (A) Fotomicrografía de SN (20, 000X) que muestra la presencia de densidades post-sinápticas (PSD, flechas verdes). En varios casos sinapsis completas son visibles (flechas rojas). Tanto la pre-sinapsis y la post-sinapsis (PRE y POST, respectivamente), se indican la ampliación). También se detecta la presencia de algunas mitocondrias no edematizadas (asteriscos), normalmente presentes en el elemento pre-sináptico. (B) SN de cerebro completo (40.000X). Los paneles inferiores proyectados corresponden a sinapsis conservadas con ampliación de 50,000X. Nótese que hay una mayor proporción de PSDs que de sinapsis completas.

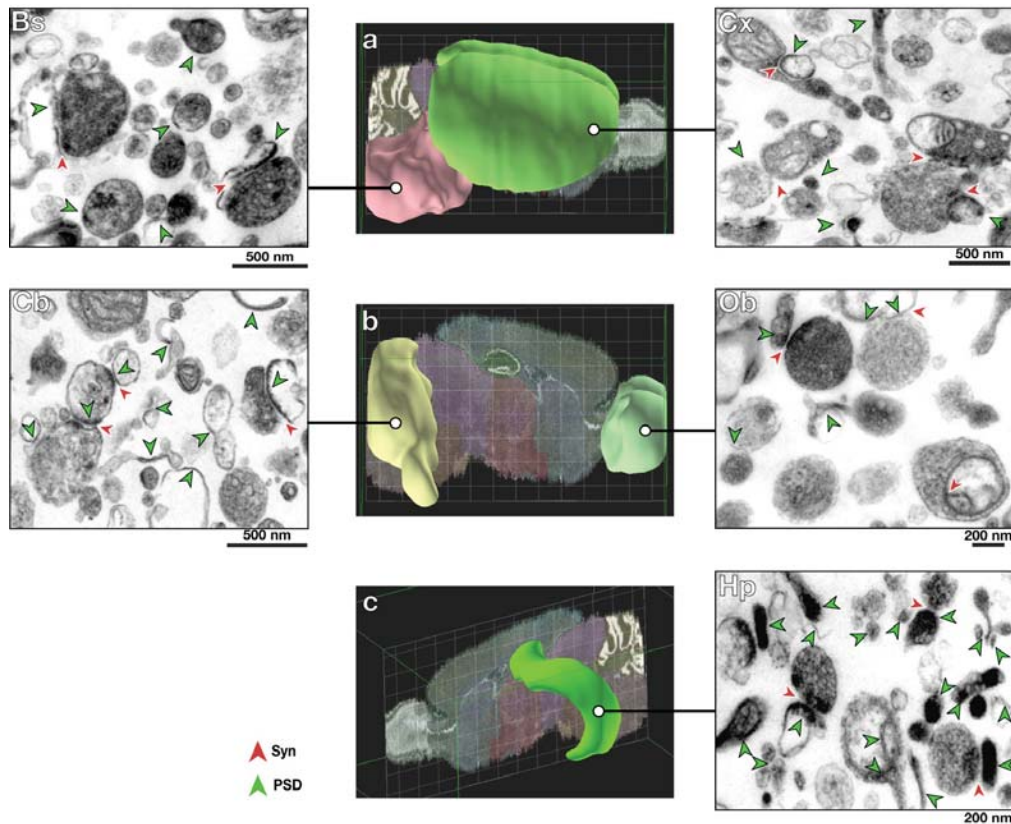
También se encontró un número reducido de mitocondrias pre-sinápticas así como extra-sinápticas. La mayor parte de estos organelos se separan en el paso 3 de purificación en forma de pellet. Otras estructuras como vainas de mielina y/o microsomas fueron de las menos frecuentes.

Otro aspecto que apoya el enriquecimiento de post-sinapsis en SN fue el hallazgo de estructuras en forma de “collar de perlas” y de corpúsculos adosados a partículas electrodensas, que se reconocieron solamente al ampliar las imágenes 60, 000 veces (Fig. 4.1.2). Éstos corresponden a polirribosomas y maquinaria del ‘aparato espinar’ que contiene retículo endoplásmico rugoso (RER) adosado con polirribosomas (Fig. 4.2.4), y posiblemente con fracciones de aparato de Golgi. Dichas observaciones corresponden con hallazgos semejantes realizados mediante TEM sobre tejido cerebral intacto o bien en fracciones SN<sup>39, 185, 186</sup>.

**Figura 4.1.3. Presencia de Polirribosomas contenidos en SN.** Fotomicrografía de SN de cerebro completo de rata adulta (60, 000X) con numerosas densidades post-sinápticas (PSDs, flechas verdes) próximas a estructuras de "collar de perlas" (polirribosomas; flechas azules en panel inferior izquierdo). En todos los casos éstas aparecieron dentro de elementos post-sinápticos (POST) en donde ocurre la síntesis local de proteínas. En algunos casos se detectaron ribosomas asociados al 'aparato espinar' (panel inferior central), aunque también se encontraron desasociados de otras estructuras (panel inferior derecho). En algunas sinapsis (flechas rojas) se observaron PSDs con muy alta electrodensidad, posiblemente debido a que converge más de una sinapsis en ese sitio (panel inferior central).



El mismo análisis realizado sobre SNs de cinco grandes áreas neuroanatómicas mostró resultados parecidos. En todas se observó una proporción mayoritaria de SN/Syn, aunque ésta variaba según cada tejido. El hipocampo en particular fue la región que mas SNs mostró en preparaciones realizadas en paralelo y analizadas en al menos 10 campos por muestra (Fig. 4.1.4).

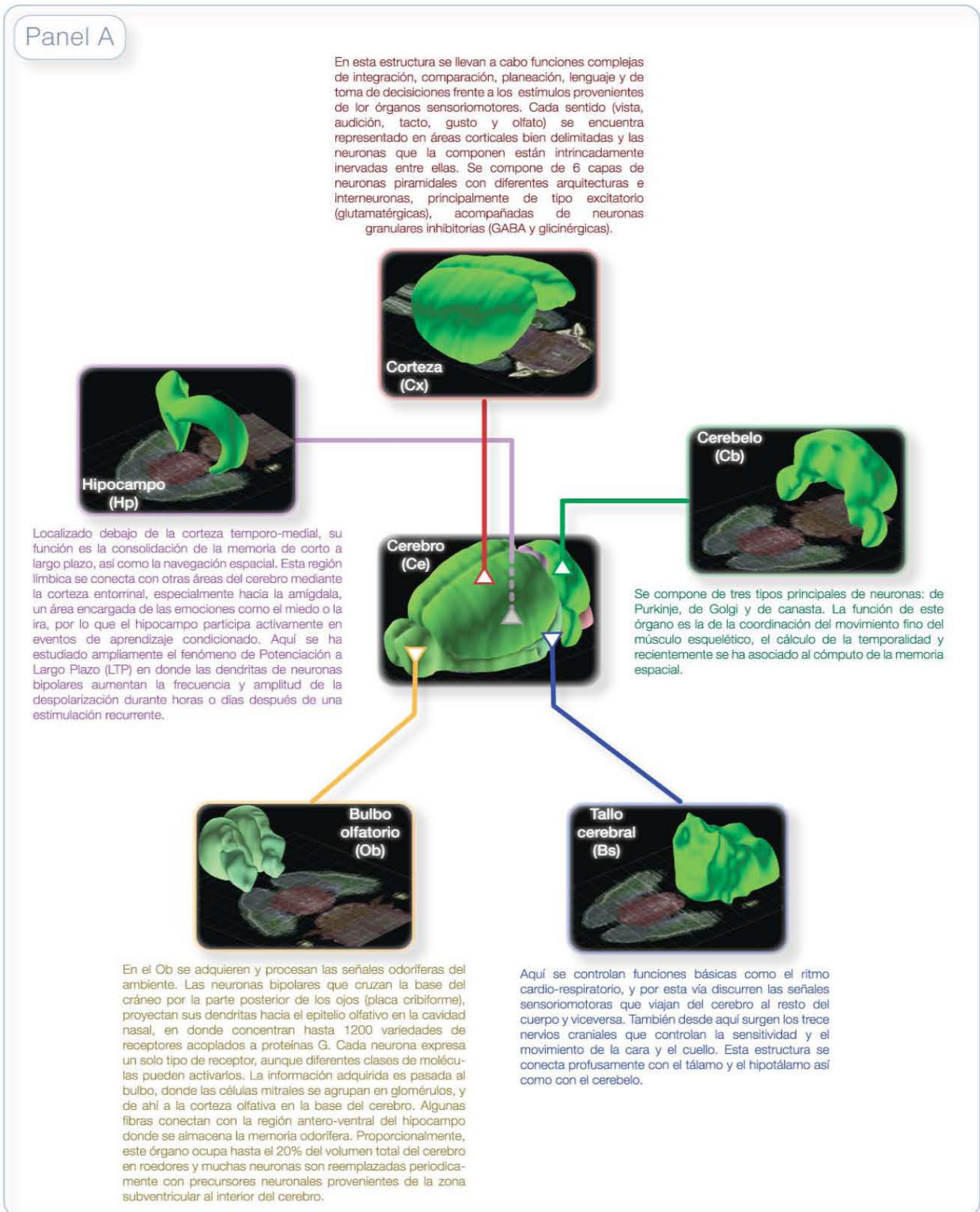


**Figura 4.1.4. Análisis Ultraestructural de SN de Cinco Regiones del Cerebro.** Fotomicrografía representativas de SNs analizados por TEM de cada tejido diseccionado del cerebro. En todos los casos se encontró una alta densidad de PSDs (flechas verdes) y en menor medida sinaptosomas (ySn, flechas rojas). Para indicar el origen anatómico de cada área diseccionada se incluyen imágenes de reconstrucción virtual del cerebro murino, creadas con el software Brain Explorer (v2.2.1) del Allen Institute for Brain Science (<http://www.brain-map.org>). (a) Tallo cerebral (Bs, rosa); Corteza (Cx, verde). (b) Cerebelo (Cb, amarillo); Bulbo olfatorio (Ob, verde claro). (c) Hipocampo (Hp, verde). Syn, sinaptosomas (sinapsis completas); PSD, densidades post-sinápticas.



Las áreas del cerebro que fueron seleccionadas para la identificación de miRNAs fueron: bulbo olfatorio (Ob), corteza (Cx), hipocampo (Hp), cerebelo (Cb) y tallo cerebral (Bs). Ver Panel A.

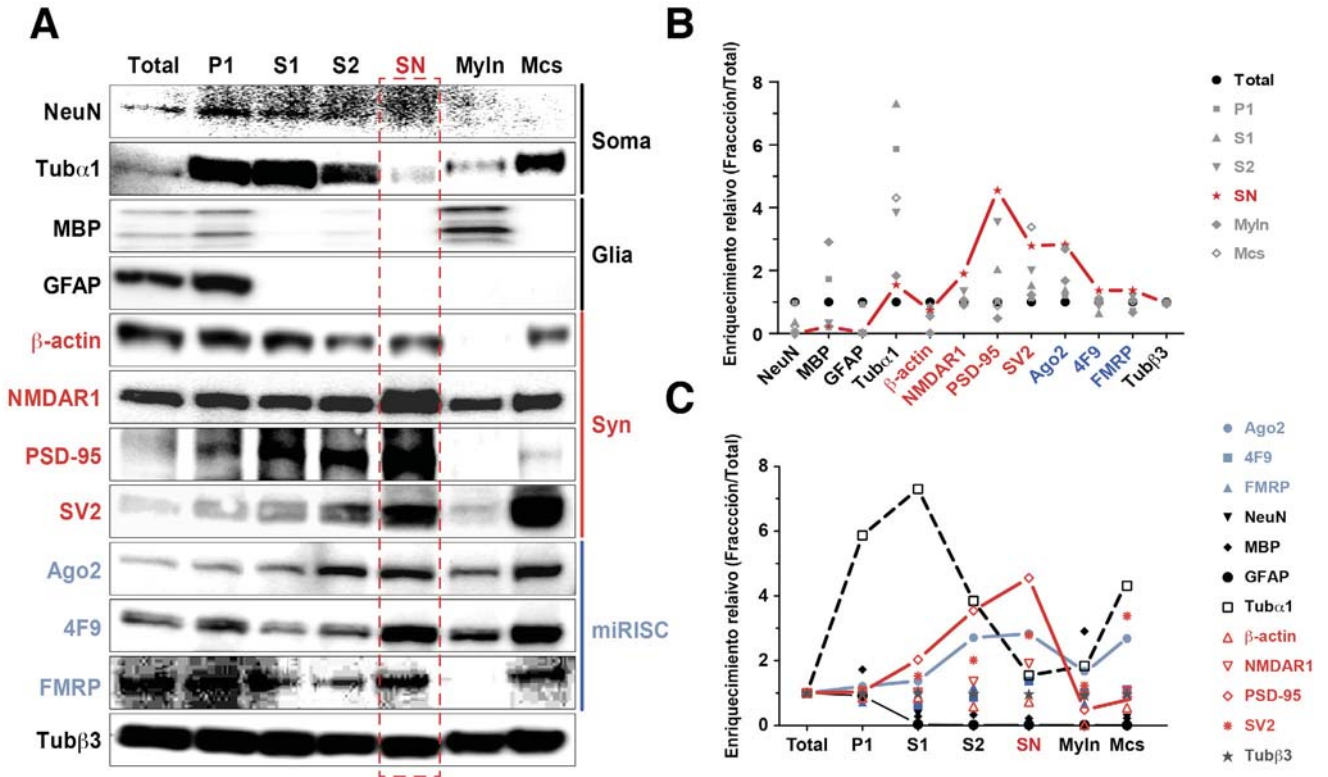
En términos de practicidad, éstas fueron seleccionadas por la facilidad para ser disecadas del cerebro en el menor tiempo posible y con suficiente masa para extraer RNA de alta calidad.





## 4.2 Marcadores de Proteína.

Para medir la pureza de los SN se midieron una serie de marcadores proteicos de núcleo, periplasma nuclear, sinapsis y glía, adicionalmente a algunos componentes de RISC en cada una de las fracciones recuperadas durante la purificación de SNs. Así, se utilizó el método de Western blot (WB) y análisis densitométrico para determinar la abundancia relativa de cada marcador (Fig. 4.2.1).



**Figura 4.2.1 Western Blot de Marcadores de Núcleo, Glía, Soma Neuronal, Sinapsis y RISC en Fracciones Asociadas a la Purificación de SN.** Se utilizaron 2 $\mu$ 5g de proteína de cada fracción extraída de cerebro completo de rata adulta (n=3) (A). Los marcadores de soma (NeuN y Tubulina  $\alpha$ 1) fueron reducidos en SN (recuadro punteado en rojo) así como los de glía (Mbp y Gfap). Los marcadores de sinapsis se observaron notablemente incrementados ( $\beta$ -actina, NMDAR1, Psd-95 y SV2). Compare la fracción P1 vs. SN en todos los casos. Nótese que la concentración de Tuba1 es mayor en la fracción S1 que en el total. Los marcadores de miRISC (Ago2 y FMRP) mostraron un enriquecimiento semejante. El anticuerpo 4F9 detecta las 4 isoformas de las proteínas de Argonauta de rata (eIF2C1-4). Se utilizó Tuba3 como control de cargado ya que su distribución fue homogénea en todas las fracciones. (B) El análisis densitométrico por fracción o por marcador (C) fue calculado con los valores normalizados con respecto al control de cargado (Tub $\beta$ 3). La intensidad medida en el homogenado total (línea negra) y en SN (línea roja) están resaltadas para mejor comparación. Myln, mielina; Mcs, microsomas; Mtc, mitocondria; SN, sinaptoneurosomas.

Esta aproximación mostró que al comparar el homogenado total vs. la fracción SN, ésta última mostraba una reducción importante del marcador nuclear NeuN, que es un factor de transcripción específico de neuronas, así como del marcador de citoesqueleto restringido a soma, tubulina alfa 1 (Tub $\alpha$ 1). Ver *Tabla 6*.

Aunque se cargó la misma masa de proteína por fracción, fue obvio notar que la cantidad observada en el homogenado total era menor que en P1. Esto se explica por el efecto concentrador del método de purificación, que aglutina los fragmentos nucleares y del periplasma nuclear del soma en forma de pellet en el primer paso de centrifugación.

Fracción	Dendritas y Sinapsis				Núcleo y Soma		Glía		RISC			Neuronal
	$\beta$ -actina	NMDAR1	Psd-95	Sv2	NeuN	Tuba1	Mbp	Gfap	Ago2	4F9	FMRP	Tub $\beta$ 3
TOTAL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
<b>P1</b>	<b>0.9</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	<b>1.1</b>	<b>1.0</b>	<b>5.9</b>	<b>1.7</b>	<b>0.9</b>	<b>1.2</b>	<b>1.0</b>	<b>0.7</b>	<b>1.0</b>
S1	0.9	1.0	2.0	1.5	0.4	7.3	0.3	0.0	1.4	0.6	1.1	1.0
S2	0.6	1.4	3.6	2.0	0.0	3.9	0.3	0.0	2.7	0.9	1.2	1.0
<b>SN</b>	<b>0.7</b>	<b>1.9</b>	<b>4.6</b>	<b>2.8</b>	<b>0.0</b>	<b>1.5</b>	<b>0.2</b>	<b>0.0</b>	<b>2.8</b>	<b>1.4</b>	<b>1.4</b>	<b>1.0</b>
MYLN	0.0	0.9	0.5	1.2	0.0	1.8	2.9	0.0	1.7	1.0	0.7	0.9
MCS	0.5	1.1	0.9	3.4	0.2	4.3	0.2	0.0	2.7	1.1	1.0	1.0

**Tabla 6. Valores Densitométrico Relativos de Marcadores Extra- e Intra-Sinápticos en la Fracción SN.** La normalización se calculó como el cociente de los valores densitométricos observados en cada fracción dividido entre la fracción total [F<sub>x</sub>/Total]. La fracción P1 (negro) y SN (rojo) se resaltan para facilitar la visualización del efecto de purificación progresiva de los componentes sinápticos.

La baja abundancia de los marcadores de glía, como la proteína básica de mielina (Mbp) y la proteína glial fibrilar ácida (Gfap), indicó también la ausencia de contaminación glial y mielínica, asociada a oligodendrocitos y astrocitos, respectivamente. Simultáneamente, se halló un enriquecimiento de las proteínas de localización sináptica  $\beta$ -actina (citoesqueleto), NMDAR1 (receptor canal iónico de glutamato permeable a sodio y calcio), Psd-95 (proteína de andamiaje de la densidad post-sináptica) y Sv2 (marcador de vesículas de liberación de neurotransmisores), lo que confirmó el enriquecimiento de terminales sinápticas en los SN. Es importante destacar que el marcado incremento de Psd-95 es refleja de las densidades post-sinápticas, presentes únicamente en las dendritas, lo cual correlaciona con los hallazgos observados mediante TEM.

Adicionalmente se encontró una abundancia importante de las proteínas de la familia de Argonauta así como FMRP, que son marcadores de miRISC, lo que apoya algunas observaciones realizadas previamente en procesos dendríticos y axonales<sup>2, 8, 181, 182</sup>. Fue sorprendente hallar un enriquecimiento en SN de casi tres veces para Ago2 con respecto al total, lo que sugiere un papel activo no sólo cerca de la vecindad sináptica sino también en astrocitos, oligodendrocitos, y en el retículo endoplásmico, dada su alta concentración en la fracción mielínica (Myln) y microsomal (Mcs). Este último caso refleja el también su denominación original cuando no se conocía su función, otrora conocida como GERP95 o proteína granular del retículo endoplásmico de 95 kDa<sup>187</sup>.

La proteína Tub $\beta$ 3 mostró una distribución equitativa (casi ideal) en todas las fracciones, lo que demuestra que su distribución intracelular es homogénea en las neuronas y en la glía, como se ha documentado anteriormente<sup>188</sup>. En este sentido funcionó perfectamente como control de cargado, aunque el efecto de dividir su valor densitométrico al de todas otras las bandas, no causó alteración en las proporciones calculadas.

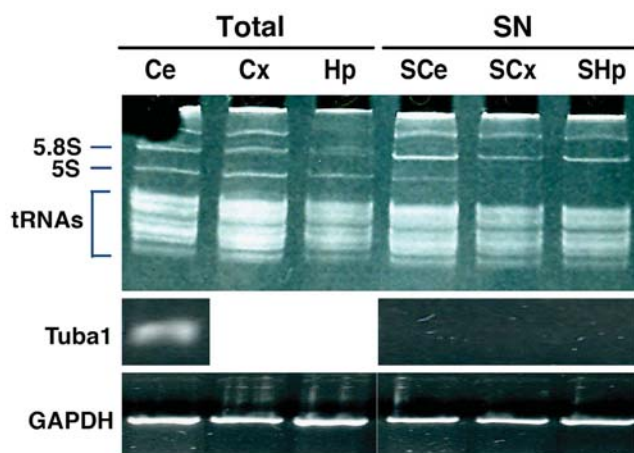
Es importante mencionar que se corrieron todas las muestras en paralelo a partir de muestras frescas mezcladas de 3 animales diferentes, divididas en 4 geles. Las membranas transferidas con la proteína fueron bloqueadas, lavadas y desnudadas hasta 6 veces, sin una pérdida notable de la señal, lo que implica que los valores de proporción calculados para cada fracción celular y para cada marcador estuvieron libres del ruido inherente a los cambios de masa cargada.

Basado en los datos anteriores se concluyó que la fracción SN era altamente pura y mantenía la integridad estructural de los elementos mayoritariamente post-sinápticos.

### 4.3 Integridad y Pureza del RNA en SNs.

Con el fin de determinar si el procedimiento de extracción no dañaba el RNA de los SNs, en especial el de bajo peso molecular (LMW RNA), se realizaron cuatro procedimientos. El primero fue en fraccionar el RNA por tamaño, con un punto de corte >200 nt, mediante precipitación parcial con etanol (ver sección 8.2 en Materiales y Métodos). El segundo procedimiento consistió en amplificar por RT-PCR de punto final la abundancia del mRNA codificante del marcador *Tuba1*, un marcador documentado como de localización semi-restringida al soma<sup>189</sup>.

El análisis por PAGE reveló que no había degradación del RNA de alto y bajo peso molecular, evaluado por tinción con bromuro de edito (EtBr). Por otro lado el RT-PCR de los marcadores *Tuba1* y *Gapdh* de SNs de cerebro completo, corteza e hipocampo, fue negativo para *Tuba1*, aún después de 35 ciclos de corrida, lo que confirmó la ausencia de contaminación de RNAs proveniente del soma neuronal en los SN (Fig. 4.3.1).



**Figura 4.3.1. RT-PCR de punto final de *Tuba1* y *Gapdh* en SN.** Arriba, electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida (PAGE 15%:Urea 8M) teñido con bromuro de etidio (EtBr) que muestra el RNA de bajo peso molecular (<200 nt de longitud) después de ser fraccionado por precipitación parcial con etanol (panel superior). Nótese que las bandas no muestran un "barrido" longitudinal del RNA ribosomal (rRNA), lo que indica que no hay degradación apreciable por este método. Al centro, RT-PCR de *Tuba1* y *Gapdh*, abajo, después de 35 ciclos de amplificación utilizando 5 µg de RNA de alto peso molecular como molde, aislado del tejido total de cerebro (Ce), corteza (Cx) o hipocampo (Hp) y de sus respectivas fracciones sinaptoneurosomales (SCe, SCx, SHp). Las muestras de Cx y Hp para *Tuba1* no fueron procesadas en este experimento (espacio en blanco).

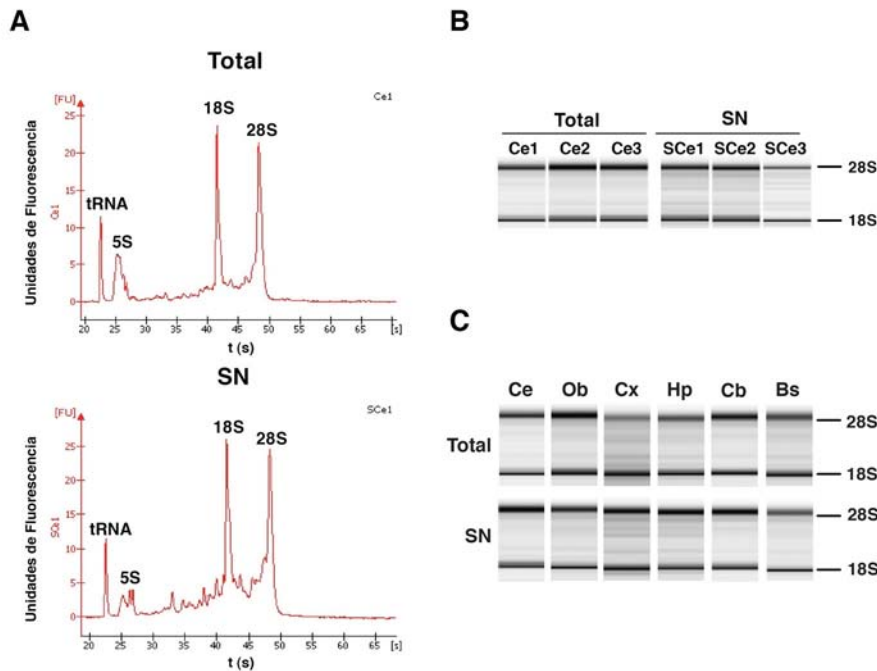
La amplificación del mRNA codificante de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) en ambas fracciones mostró que la integridad del RNA en dicha fracción estaba intacta. No obstante la abundancia de este marcador fue en promedio 20% menor en SN. Este mensajero ya había sido documentado en fracciones sinaptosomales mediante RT-PCR radiactivo<sup>190, 191</sup>.

El tercer procedimiento implicó determinar con precisión la integridad del RNA en SN, utilizando el método de electroforesis microcapilar en chip en un 'bioanalizador' (Agilent Technologies' Bioanalyzer), un instrumento que mide la intensidad de fluorescencia de emisión, en microcapilares grabados en vidrio rellenos con una matriz de gel por donde corre el RNA previamente marcado con un agente intercalante fluorescente, que es excitado por un láser adecuado.

La medición se realiza con un lector láser acoplado a un arreglo de electrodos que selectivamente aplican una corriente eléctrica a cada capilar que contiene una muestra individual. Todas las mediciones se calibran con las de un marcador de peso molecular de RNA, y el patrón resultante se expresa como la intensidad de pixeles en función del tiempo de corrida, y se puede representar en un plano, formando una imagen de un gel virtual.

El resultado del análisis del RNA total de SN de cerebro completo (SCe), así como de cada área del cerebro que se estudió, mostró una alta conservación de los marcadores de RNA más abundantes, los rRNAs 28S, 18S, 5S y 5.8S, así como el de los

tRNAs (Fig. 4.3.2), lo que confirmó las observaciones anteriores. El número RIN (*RNA Integrity Number*) calculado para estas muestras fue >8.9.



**Figura 4.3.2. Integridad del RNA en SN.**

(A) Electroforesis microcapilar de RNA total (50 ng) de homogenado de cerebro completo (Total) y de sinaptoneurosomas (SN). Las gráficas son figuras representativas de muestras individuales. (B) Representación en dos planos de un gel virtual de tres muestras de cerebro completo (Ce) y de (C) las cinco regiones del cerebro analizadas, en donde cada banda representa un pico de intensidad de fluorescencia. Los RNAs ribosomales correspondientes a cada pico en el histograma se indican en cada figura. Ob, bulbo olfatorio; Cx, corteza; Hp, hipocampo; Ob, Cerebelo; Bs, tallo cerebral.

Finalmente el cuarto procedimiento consistió en realizar un perfil de expresión de diversos marcadores de mRNA de localización somato-dendrítica en las fracciones de soma (homogenado total) y de SN, algunos de los cuales codifican para las proteínas que se mencionaron anteriormente. Para ello se utilizó la técnica de qRT-PCR<sup>§</sup>, que tiene una sensibilidad varios órdenes de magnitud mayor que el PCR convencional.

La curva de amplificación de *Tuba1* (Fig. 4.3.3) mostró una diferencia Ct de 3 ciclos aproximadamente entre el homogenado de cerebro total (Ce) y los SN (SCe). Esto significa que la cantidad de molde que había originalmente en SCe fue de  $2^3 = 8$  veces menos, lo cual apoyó las observaciones anteriores en el PCR semicuantitativo.

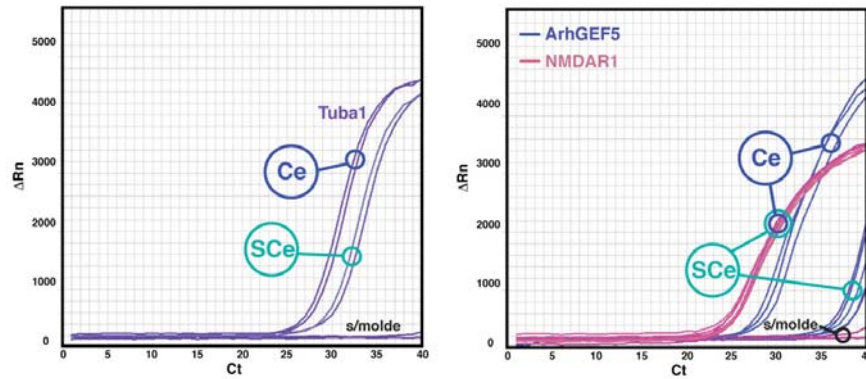
El marcador *ArhGef5*, que codifica para un intercambiador del nucleótido de guanina dependiente de la proteína Rho, involucrada en procesos de señalización que involucran a receptores acoplados a proteínas G, mostró una diferencia de 13 ciclos en

<sup>§</sup> Esta técnica se basa en la amplificación de DNA por una polimerasa de DNA recombinante no termolábil en combinación con un agente fluorescente que aumenta su concentración en la medida en la que se intercala en el DNA de doble cadena (dsDNA), durante la fase de hibridación (*annealing*) por cada ciclo. Así, la intensidad de fluorescencia es una función lineal de la concentración inicial de molde o templado con la que se comienza la amplificación, y por lo tanto, a cada ciclo le corresponde un valor específico de fluorescencia, que va aumentando de forma exponencial hasta convertirse en una curva asintótica. Así, para comparar la expresión de un amplicón entre dos muestras biológicas, se toma como referencia el valor de fluorescencia observado en un ciclo de corte delimitado en el inicio de la fase exponencial, que se denomina ciclo límite de referencia ó Ct (*cycle threshold*).

Dado que en cada ciclo de PCR hay una duplicación de cada cadena de DNA, entonces es posible expresar el valor de Ct con la expresión  $2^n$ , donde  $n=Ct$ . En consecuencia, el incremento de una unidad del valor de Ct indica el doble de DNA molde. Por tanto, la diferencia de una unidad de Ct indica la mitad de la concentración de DNA molde inicial.

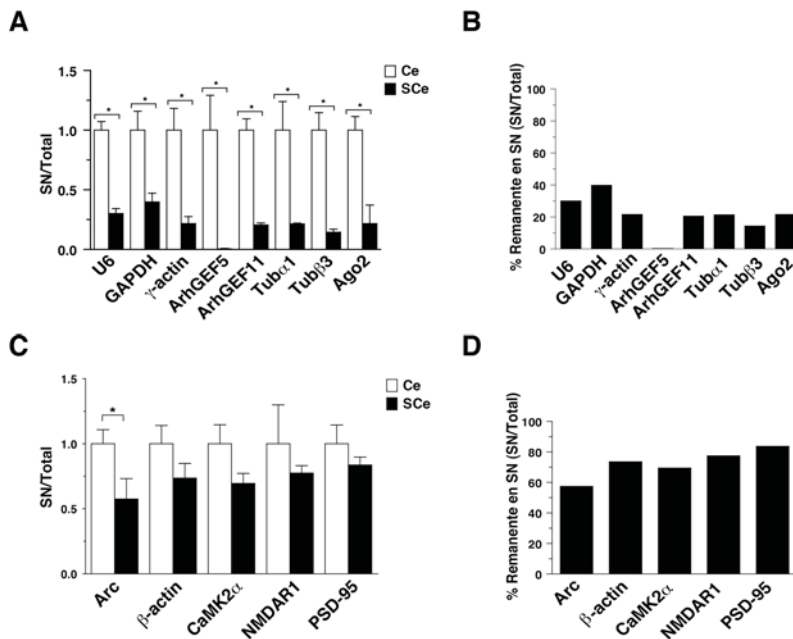
Debe tomarse en cuenta que el valor de Ct calculado para un amplicón específico (~100nt de longitud en este estudio) sólo depende de la eficiencia de hibridación del par de oligonucleótidos (*primers*) que se empleen, por lo cual no es posible usar la comparación directa del valor de Ct de un gen con el otro de un gen distinto. De esta forma, el único criterio de comparación aceptable usado en este trabajo fue el cambio de Ct para un gen específico, entre dos o más muestras biológicas, denominado delta Ct (dCt).

promedio, siendo ésta mayor para SCe. Esto confirma las observaciones previas indicando su presencia únicamente en el soma neuronal.



**Figura 4.3.3. Curvas de Amplificación por qRT-PCR de mRNAs de Soma y Sinapsis.** La abundancia de marcadores de RNA que se expresan primordialmente en el soma neuronal (Tuba1, panel izquierdo; ArhGef5, líneas azules en panel derecho) es significativamente menor en SN. El marcador de sinapsis (NMDAR1, línea color lavanda en panel derecho). Cada línea representa un ensayo individual en un experimento realizado con SN de cerebro completo, usando 50 ng de RNA total como molde, por triplicado (n=3 animales) o de muestras combinadas de varios animales. El valor  $\Delta Rn$  corresponde a la fluorescencia normalizada o efectiva una vez restado el valor de la referencia pasiva (ROX). En la amplificación se incluyó un control negativo que no contiene molde de RNA pero sí el par de oligos específicos para cada reacción. Ce, cerebro completo; SCe, SN de cerebro.

Contrariamente, el mRNA de NMDAR1 de localización somato-dendrítica no mostró una diferencia significativa entre ambas fracciones, lo que demuestra que los niveles de expresión en SN son tan altos como en el soma neuronal. La cuantificación del perfil general de amplificación de marcadores somato-dendríticos (incluyendo los anteriores) confirmó los resultados obtenidos en el WB (Fig. 4.3.4).



**Figura 4.3.4. Perfil de Expresión de mRNAs de Soma y Somato-Dendríticos en SCe.** Cuantificación relativa (SN/Total) por qRT-PCR de marcadores de soma (A & B) o de sinapsis (C & D), incluyendo además el mRNA de Ago2; (n=3 animales, por duplicado). (B & D) Los valores porcentuales de retención en SN para cada marcador fueron calculados como  $100 \times (\text{SN}/\text{Total})$ . Éstos indican cuánto molde se retuvo al final de la purificación de SN. La significancia estadística se calculó con una prueba pareada de t de Student de dos colas;  $*P \leq 0.01$ . Ce, homogenizado total de cerebro; SCe, SN de cerebro completo.

Al analizar el cociente del valor de  $2^{\text{Ct}}$  SN/Total de los mRNAs de soma, se halló que todos están disminuidos en más del 50% tan sólo en la fracción SN, como se determinó por el factor de retención en SN (PS/T). Este valor expresa porcentualmente la abundancia de cada marcador con respecto al homogenizado total (100%) después de la purificación.

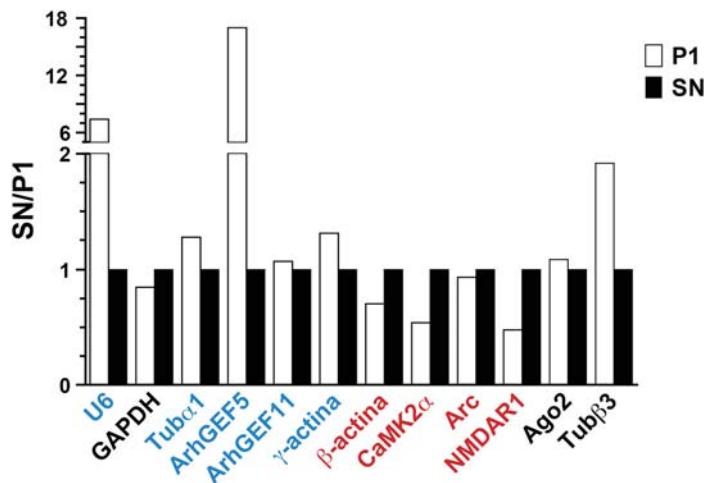
Tales resultados validaron la pureza de los SN, especialmente al analizar la expresión de marcadores como ArhGef5 y ArhGef11, que codifican para un factor intercambiador de GDP por GTP en citosol, cuya diferencia de expresión entre ambas fracciones (PS/T de 0.05% y 0.2%, respectivamente) no se había reportado con anterioridad.

Por otro lado, los marcadores de localización dendrítica mostraron un enriquecimiento promedio mayor al 70% en la fracción SN, cuyos mRNAs contienen secuencias de localización dendrítica en su extremo 3' UTR como es el caso de Camk2α. Estas observaciones confirman hallazgos similares reportados previamente.

Finalmente, el mRNA codificante de Ago2 mostró un factor de retención en SN cercano al 20%, lo que sugiere que también puede ser parcialmente localizado cerca de las sinapsis en las neuronas del animal adulto.

De forma notable, este método no pudo discriminar completamente la presencia del snRNA U6 en SN, un RNA que forma parte del complejo del espliceosoma. Como veremos más adelante, la posibilidad de que este RNA también tenga una localización dendrítica aún no descrita se mantiene latente, ya que se ha documentado la actividad extranuclear de splicing en dendritas de neuronas hipocampales en cultivo, y ello pudiera justificar nuestra observación, cuyo escrutinio experimental se mantiene.

Sin embargo, la expresión relativa de U6 en la fracción P1, que contiene núcleos y otros debris, fue 7.4 veces mayor que en SN, y 5.1 veces que la observada en la fracción total. Esto supone una disminución real del 86% en SN al final del proceso de purificación. En el mismo sentido, el enriquecimiento de ArhGef5 (17X) y Tubβ3 (2.3X) en P1 confirma que la abundancia de RNAs perinucleares es significativamente menor en SN (Fig. 4.3.5).



**Figura 4.3.5. Expresión de mRNAs Marcadores de Soma o Sinapsis en la Fracción Nuclear P1.** Para realizar el perfil de expresión medido por qRT-PCR, se usaron ~100ng de RNA total de cada fracción como molde para la reacción de transcripción reversa (n=2). Se graficó el cociente del valor de Ct observado en SN y en P1 (eje "Y") en función de cada marcador. Nótese que los RNAs U6 y ArhGef5 están altamente concentrados en el núcleo (>6 veces). Contrariamente, los marcadores dendríticos (β-Actina, Camk2α, Arc, y NMDAR1) están más enriquecidos en los SN, lo que indica la presencia de un transporte activo hacia las cercanías de los contactos sinápticos.

En conclusión, las modificaciones realizadas al método de extracción de SN reportado por Carlin y cols., permitieron una segregación importante de marcadores de proteína y de RNA que confirman que el material proveniente de SN es bona fide, ya que contiene mayoritariamente terminales post-sinápticas aisladas. Adicionalmente, no tiene contaminación proveniente de otras células como astrocitos y oligodendrocitos. Por lo tanto determinamos que esta preparación era aceptable para estudiar su contenido de miRNAs, como se describirá más adelante.

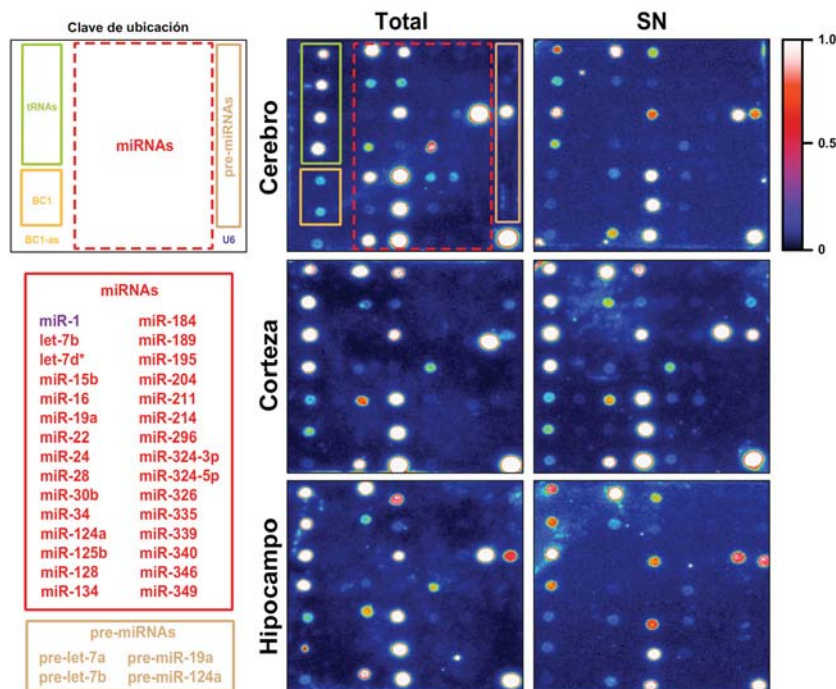


## 4.4 Dot-blot.

Para contestar la pregunta sobre si los miRNAs maduros y sus precursores podrían localizarse en las terminales sinápticas, utilizamos la técnica de dot-blot (DB) como una estrategia para realizar un análisis inicial que fuera rápido y barato. Se inició con el estudio de homogenado total y SN en cerebro completo, así como en la corteza (Cx) y el hipocampo (Hp).

El DB consiste en la hibridación de una muestra de RNA marcada con el isótopo radiactivo  $^{32}\text{P}$ , sobre una membrana nitrada de nylon, que contiene oligonucleótidos de DNA goteados y entrecruzados a la matriz mediante luz UV. De esta forma se pueden generar miniarreglos con la cantidad de sondas que se requiera. El nivel de expresión se evalúa como la intensidad radiométrica medida en función de la cantidad de un RNA particular que se mantenga retenido a una sonda mediante hibridación complementaria. Dicha actividad se revela con una placa ultrafotossensible, como son las placas radiográficas o bien las pantallas de Phosphorimager (Amersham).

Para este experimento se utilizaron 36 sondas, de las cuales 29 fueron diseñadas para detectar miRNAs que previamente habían sido reportados como de expresión neuronal robusta en una variedad de tejidos y líneas celulares<sup>19, 20, 192, 193</sup>. De éstos, algunos fueron escogidos por presentar MREs predichos por los algoritmos TargetScan y miRanda, en los 3' UTR de mRNAs documentados como de expresión dendrítica, entre los cuales estaba NMDAR1, Camk2a y Arc. Estos mRNAs se seleccionaron a su vez por su relevancia en el establecimiento de la plasticidad sináptica en la potenciación y/o depresión a largo plazo (LTP y LTD, respectivamente) y por su distribución somato-dendrítica (Fig. 4.4.1).



**Figura 4.4.1. Análisis de Expresión de microRNAs Sinápticos por Dot Blot.** Se usó 1 µg de RNA <200 nt de cerebro completo (Ce), corteza (Cx) e hipocampo (Hp); n=5 animales, marcado con  $^{32}\text{P}$  para hibridarlo a 37 °C en un miniarreglo con 36 sondas (indicadas en panel izquierdo). La imagen representa un autorradiograma de cada condición, con la intensidad de la señal indicada en pseudocolor. Como control positivo se utilizaron sondas para 4 tRNAs y para el ncRNA BC1, que es un marcador de RNA dendrítico, enriquecido en sinapsis. Las sondas que identifican a 4 pre-miRNAs se diseñaron contra la región del loop, excepto la de miR-124a, que abarca todo el precursor.

Los controles que se incluyeron fueron el miRNA muscular miR-1 (control negativo), snRNA U6 (107 nt en rata; sólo presente en la fracción total) y el ncRNA retrotransposónico de localización dendrítica BC1/BC200 (158 nt; somato-dendrítico que participa en la inactivación del factor de traducción eIF4A y su unión a la subunidad 18S del ribosoma<sup>194</sup>), y 4 tRNAs (Ala, Asp, Lys y Phe). Adicionalmente se incluyeron 5 sondas dirigidas contra la región del asa (loop) de los precursores de miRNAs let-7a-1, let-7e y

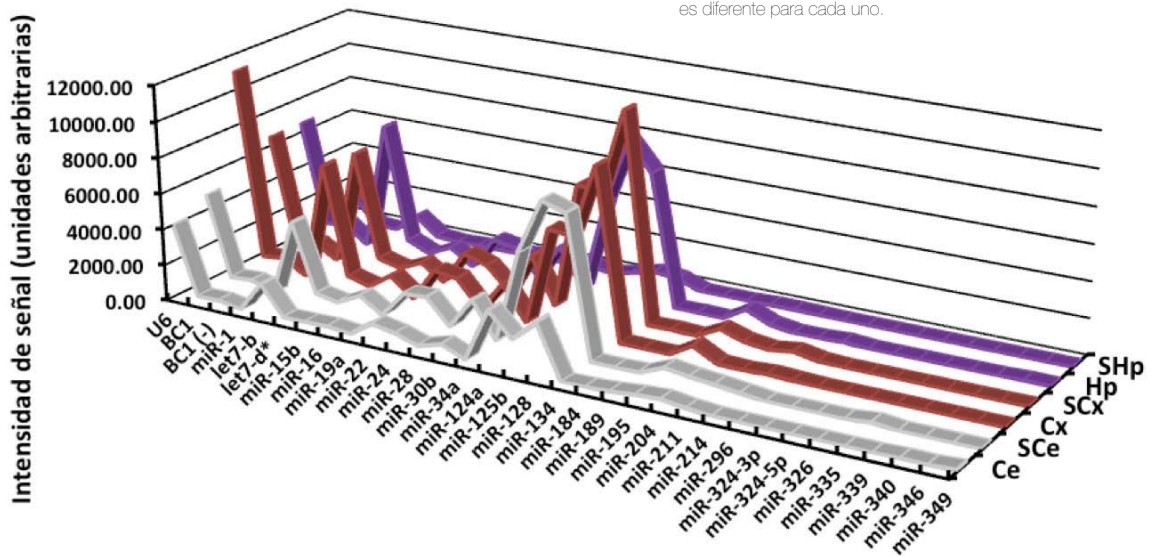
let-7d, miR-19a y miR-124a (60-100 nt de longitud), para determinar si éstos también podían expresarse cerca de los contactos sinápticos.

El RNA total, extraído de tejido completo o de los SN, fue fraccionado por peso molecular mediante precipitación parcial con etanol y 1 µg que contenía a las especies <200 nt de longitud fue usado para el marcaje con <sup>32</sup>P. Esta maniobra permitió reducir la hibridación inespecífica dada por las especies de alto peso molecular (>200 nt).

Cabe destacar que para alcanzar la masa crítica de detección, previamente evaluada en una curva de intervalo dinámico (datos no mostrados), fue necesario mezclar el RNA de 3 a 5 animales, lo que a su vez penalizó el poder estadístico de nuestras observaciones. Pero estos datos exploratorios dieron la pauta para realizar experimentos subsecuentes.

La inspección de la expresión de miRNAs en la corteza y en el hipocampo demostró ser diferente a la observada en el cerebro completo para algunos miRNAs como let-7b, miR-34a, miR-128, miR-195 entre otros. Sin embargo, entre los miRNAs que mostraron mayores diferencias entre la fracción total y la SN fueron miR-124a y miR-125b y miR-128.

**Figura 4.4.2. Histograma de Expresión de microRNAs Sinápticos Analizados por DB.** Los miRNAs de mayor expresión en el homogenizado total de cada tejido muestran una variabilidad en su fracción SN. La baja sensibilidad de este método no permitió definir la expresión de los miRNAs miR-324-3p en adelante, como sí ocurrió en el análisis de microarreglo. Nótese que el snRNA U6 fue detectado en todas las fracciones. Es importante destacar que no es posible realizar una comparación de expresión entre distintos genes ya que la eficiencia de hibridación es diferente para cada uno.



Otros miRNAs como miR-22, miR-24, miR-30b o miR-195b (y otros de menor expresión) mostraron abundancias similares en ambas fracciones. De manera importante, miR-340, miR-346 y miR-349, no fueron detectados en SN, pero sí en la fracción total. Ver *Tabla 7*.

Sonda	Ce	SCe	SCe/Ce	Cx	SCx	SCx/Cx	Hp	SHP	SHp/HP
U6	4034.7	4846.2	1.2	11052.7	6525.7	0.6	6536.0	350.8	0.1
BC1	201.9	350.5	1.7	641.1	646.4	1.0	795.8	1465.9	1.8
miR-1	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND
let7-b	1688.0	4266.4	2.5	6608.3	6449.7	1.0	7200.6	1055.4	0.2
let7-d*	100.2	489.7	4.9	539.6	645.3	1.2	790.4	100.8	0.1
miR-15b	122.3	251.9	2.1	210.9	311.1	1.5	246.8	18.0	0.1
miR-16	152.9	904.1	5.9	1060.7	891.7	0.8	875.3	79.1	0.1
miR-19a	23.1	90.2	3.9	47.4	65.0	1.4	0.0	9.0	ND
miR-22	858.7	1567.7	1.8	1917.4	1939.9	1.0	1841.6	123.9	0.1
miR-24-1	615.1	1642.2	2.7	1724.0	1528.4	0.9	1616.1	197.6	0.1
miR-28	211.1	280.9	1.3	263.4	281.5	1.1	209.3	57.1	0.3
miR-30b	592.8	2042.0	3.4	1948.8	2622.4	1.4	2203.8	246.9	0.1
miR-34a	53.3	72.4	1.4	75.7	31.7	0.4	22.5	6.2	0.3
miR-124a	2996.8	5202.7	1.7	5540.0	7052.5	1.3	5203.8	298.9	0.1
miR-125b	1733.0	8205.5	4.7	5407.8	7090.2	1.3	8901.6	616.1	0.1
miR-128	2924.5	7793.8	2.7	9455.0	11622.9	1.2	7359.9	488.6	0.1
miR-134	0.0	33.0	ND	46.7	56.6	1.2	11.1	5.5	0.5
miR-184	29.0	29.3	1.0	18.9	84.9	4.5	32.3	5.4	0.2
miR-189	102.2	72.9	0.7	0.0	21.3	ND	0.0	9.4	ND
miR-195	230.7	620.5	2.7	772.2	694.9	0.9	791.8	63.8	0.1
miR-204	302.1	427.0	1.4	74.6	274.2	3.7	212.1	61.8	0.3
miR-211	124.1	303.5	2.5	29.8	116.4	3.9	22.2	24.3	1.1
miR-214	12.4	149.9	12.1	113.2	305.2	2.7	35.8	7.0	0.2
miR-296	0.0	0.0	ND	54.9	56.9	1.0	108.0	8.6	0.1
miR-324-3p	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND
miR-324-5p	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND
miR-326	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND
miR-335	0.0	150.5	ND	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND
miR-339	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND	0.0	0.0	ND
miR-340	49.1	0.0	0.0	7.9	0.0	0.0	0.0	0.7	ND
miR-346	24.0	0.0	0.0	0.0	0.0	ND	52.3	0.0	0.0
miR-349	113.2	0.0	0.0	0.0	10.3	ND	21.2	0.0	0.0

**Tabla 7. Valores de Densitometría de microRNAs Maduros Cuantificados por DB.** El análisis densitométrico se realizó con el programa ImageJ (NIH) utilizando el tRNA<sup>Phe</sup> como normalizador para las muestras de Cerebro Completo (Ce), Corteza (Cx) e Hipocampo (Hp). Se presentan en escala de color, en donde rojo representa la máxima intensidad de señal autorradiográfica y en violeta profundo, la mínima. Las barras horizontales reflejan esos mismos cambios. La sonda let-7d\* se hibrida con la secuencia pasajera de let-7d (let-7d-3p), que es la hebra complementaria al miRNA maduro en el precursor. Los cocientes SN/Total están indicados para cada muestra, en donde la fracción SN de cada tejido se denomina SCe, SCx y SHp, respectivamente. La sonda de miR-1 corresponde a un miRNA de expresión muscular únicamente. Nótese que la estimación de enriquecimiento sináptico se ve afectada en mayor medida cuando los valores de expresión son muy bajos. ND, no detectado en el total (ver texto para detalles). Los renglones sombreados indican las sondas que se utilizaron para el análisis por Northern blot (el cual se explica más adelante). El miRNA miR-189 cambió de nombre a miR-124-1\* de la v8.0 a la v13.0 del miRBase, éste último se usará en adelante. Dicha secuencia es parte del precursor de miR-24-1.

Es posible que los miRNAs enriquecidos en Ce (let-7b, miR-124a, miR-125b, miR-128, miR-134 y miR-195) sean mayoritariamente una contribución de la corteza principalmente y en menor medida del Hp. Aunque es posible que otros miRNAs como miR-16, miR-22, miR-24 o miR-30b (altamente expresados en SCe) provengan de otras regiones como el estriado, el tálamo, el hipotálamo o el cuerpo caloso, tejidos no fueron investigados individualmente que se hallan en la base del cerebro.

La expresión de los pre-miRNAs fue sensiblemente más baja en lo general, comparado los miRNAs maduros, excepto para el pre-miR-124a, cuya abundancia fue alta en SCe y SCx, pero no en SHp. Dado que la sonda que detecta el precursor de miR-124 también se puede hibridar con el miRNA maduro de 21 nt, es posible que la señal detectada sea la sumatoria de la fracción madura con la del precursor. Sin embargo, cuando se compararon las dos señales individualmente, la sonda del precursor tuvo un incremento de señal mayor al 30% en todos los casos, excepto en SHp, lo que indica que la señal remanente es probablemente *bona fide* (Tabla 8). Por lo cual es posible aventurar que es probable que este precursor también se localice en las terminales sinápticas.

Tejido	Cerebro Completo			Corteza			Hipocampo		
	Ce	SCe	SCe/Ce	Cx	SCx	Cx/SCx	Hp	SHp	Hp/SHp
let-7a1 loop	64.46	107.00	1.66	105.97	0.00	0.00	119.65	4.20	0.04
let-7e loop	145.22	199.60	1.37	405.55	489.96	1.21	56.57	23.93	0.42
let-7d64	3,101.70	1,875.42	0.60	523.27	1,966.22	3.76	1,378.48	367.33	0.27
mir-19a loop	58.17	21.36	0.37	14.97	7.24	0.48	12.61	0.00	0.00
mir-19a (-)	0.00	38.02	ND	42.45	6.71	0.16	0.00	0.53	ND
mir-124a FL	6,339.17	10,896.12	1.72	11,032.37	12,036.29	1.09	10,508.42	610.00	0.06

**Tabla 8. Valores de Densitometría de pre-miRNAs Cuantificados por DB.** Las sondas utilizadas para detectar a los precursores de miRNAs están dirigidas contra la región del asa. miR-19a(-) corresponde a la sonda antisentido que detecta la secuencia pasajera. miR-124a FL detecta la secuencia completa del precursor. ND, no detectado en el total.

Con los resultados anteriores se concluyó que los miRNAs y algunos de sus precursores cosedimentan en una fracción que está enriquecida en terminales sinápticas que tienen una amplia representación de densidades post-sinápticas, cuya expresión en algunos casos es idéntica en la fracción total y en la SN. Además, que la expresión de algunos miRNAs maduros correlaciona, y es mayor incluso, que la proporción observada para un ncRNA marcador dendrítico BC1/BC200. Finalmente, la distribución soma-sinapsis de los miRNAs medidos por DB, muestra que es distinta entre el cerebro completo y la corteza o el hipocampo, lo que confirma la hipótesis de la localización sináptica de miRNAs, variable en éstas áreas del cerebro. Sin embargo, este análisis demostró por vez primera que el enriquecimiento de miRNAs en sinapsis es un fenómeno variable y que tiene un componente de especificidad de tejido.

A pesar de la relevancia de estos hallazgos, el estudio de DB careció de tres aspectos fundamentales: 1) el número de muestras necesarias para establecer una significancia estadística en las diferencias de expresión de cada miRNA, 2) la certeza de que los fragmentos detectados correspondan al tamaño esperado para un miRNA, y 3) un mayor espectro de cobertura de la expresión de miRNAs en la rata. Aunque se utilizaron varios animales y los datos representan la contribución de individuos mezclados, no fue posible calcular una desviación estándar que ayudara a realizar un análisis estadístico más profundo. 4) En suma, este método sólo serviría como un medio exploratorio para ahondar en dichas diferencias mediante otras metodologías, más cuantitativas y específicas.

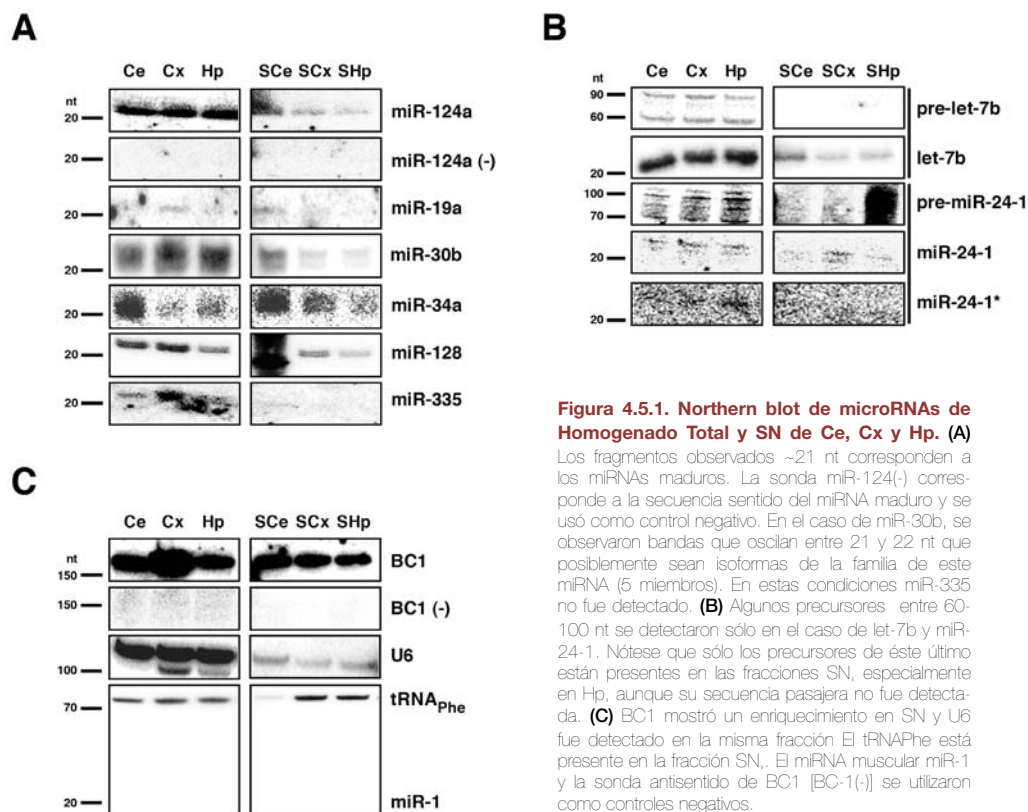
## 4.5 Northern blot I.

Para validar la señal observada en el ensayo de DB para algunos miRNAs se decidió utilizar la técnica de Northern blot (NB), que brevemente consiste en la hibridación de una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  a una membrana de nylon nitrada a la cual se le ha transferido y fijado el RNA de bajo peso molecular (<200 nt) de cada muestra. Éste previamente fue resuelto por electroforesis en un gel desnaturante de acrilamida (PAGE) al 15%/Urea 8 M para resolver cada uno de los RNAs de acuerdo con su tamaño. De esta forma al hibridarse a la membrana permanecerá la marca y por tanto puede ser revelada en una placa fotosensible.

Como se muestra en la *Fig. 4.5.1*, las sondas diseñadas para los miRNAs let-7b, miR-124a, miR-19a, miR-24-1, miR-30b, miR-34, miR-128, miR-189 y miR-335 detectaron fragmentos ~21 nt de longitud, confirmando que tales especies tienen el tamaño esperado para un miRNA.



Sin embargo, no todos los miRNAs observados en las fracciones totales de Ce, Cx y Hp tuvieron el mismo nivel de expresión en SN. Así, miR-19a, miR-189 y miR-335 sólo fueron detectadas en SCe y no en los SN de Cx y Hp. También se confirmó que BC1 y el tRNAPhe se expresan prominentemente en SN, incluyendo al snRNA U6 que fue detectado con menor nivel de expresión.



**Figura 4.5.1. Northern blot de microRNAs de Homogenado Total y SN de Ce, Cx y Hp.** (A) Los fragmentos observados ~21 nt corresponden a los miRNAs maduros. La sonda miR-124(-) corresponde a la secuencia sentido del miRNA maduro y se usó como control negativo. En el caso de miR-30b, se observaron bandas que oscilan entre 21 y 22 nt que posiblemente sean isoformas de la familia de este miRNA (5 miembros). En estas condiciones miR-335 no fue detectado. (B) Algunos precursores entre 60-100 nt se detectaron sólo en el caso de let-7b y miR-24-1. Nótese que sólo los precursores de éste último están presentes en las fracciones SN, especialmente en Hp, aunque su secuencia pasajera no fue detectada. (C) BC1 mostró un enriquecimiento en SN y U6 fue detectado en la misma fracción. El tRNAPhe está presente en la fracción SN. El miRNA muscular miR-1 y la sonda antisentido de BC1 [BC-1(-)] se utilizaron como controles negativos.

Paralelamente, sólo los precursores de let-7b y miR-24-1 dieron señal positiva en fragmentos entre 60 a 100 nt de longitud. Esto puede deberse a que dichas sondas estén detectando los precursores de otras isoformas, como es el caso de let-7 que tiene hasta 8 miembros en rata, o bien que es modificado post-transcripcionalmente, por ejemplo por la acción de uridilasas como Tut4 (ver Discusión), como sería posible en el caso de miR-24 cuyo precursor sólo es monogénico. No obstante éste sólo fue identificado en SHp, aunque la secuencia pasajera, miR-24-1\*, no lo fue.

Aún cuando los resultados del análisis de NB no correlacionaron totalmente con los de DB, algunos miRNAs como miR-19a, miR-24-1, miR-30b y miR-124a sí lo hicieron positivamente, a diferencia de los miRNAs miR-34a, miR-128, miR-335 (cfr. Tabla 5). Estas disparidades entre los métodos pueden explicarse por las diferencias de masa de RNA utilizadas entre las fracciones total y SN. Mientras que en los tejidos totales se utilizaron entre 30 a 50 µg de RNA total, en las fracciones SN sólo se usó de 1 µg de RNA de bajo peso molecular. La razón de ello obedeció a que los datos serían normalizados con un tRNA y a que la masa requerida para detectarlos a partir de tejido completo requería el sacrificio de múltiples animales y el consecuente gasto exacerbado de columnas de purificación y fraccionamiento de RNA. Por ello se optó por tomar estos datos solamente como la verificación del tamaño de los miRNAs, por lo que estos resultados fueron considerados solamente desde el punto de vista cualitativo.

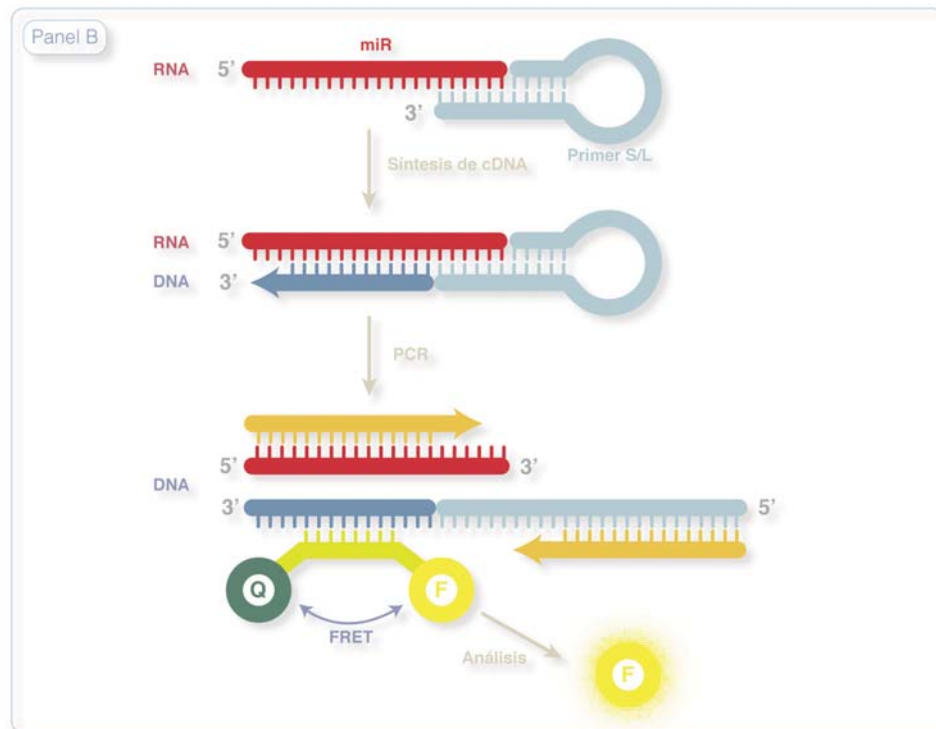
Aunque los datos no se complementan del todo con las metodologías presentadas, dadas las restricciones metodológicas que se describieron arriba, en lo general se sustentaron mutuamente y, como se describirá más adelante, estos datos se confirmaron con otras herramientas más robustas y precisas.



En resumen, los datos aportados por las metodologías de DB y NB muestran que los miRNAs maduros, y algunos precursores, se localizan en sinapsis aisladas del cerebro completo así como de la corteza e hipocampo. Estos muestran un patrón diferencial de expresión entre las fracciones total y SN que varían de acuerdo con el tejido.

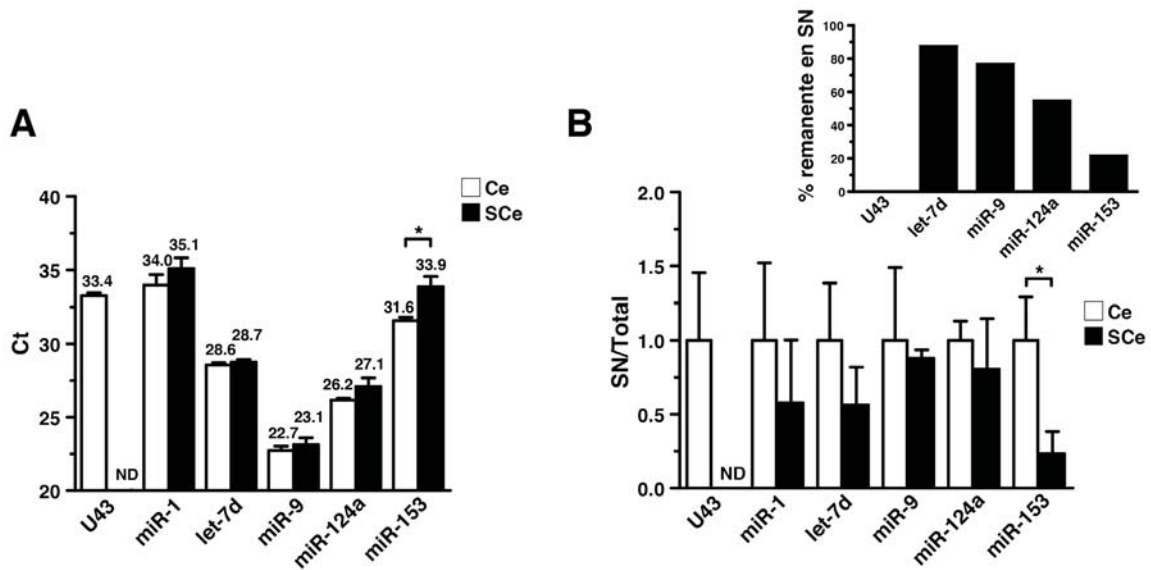
## 4.6 Amplificación Mediante qRT-PCR.

Con la finalidad de cuantificar de forma más precisa las diferencias de expresión de miRNAs entre el tejido total y los SN, utilizamos la técnica de PCR cuantitativo ó qRT-PCR, en especial el método de Taqman® (ABI-Life Technologies) que consiste en la amplificación de las secuencias maduras de miRNAs de forma específica, capaz de discernir entre isoformas altamente conservadas con una resolución de hasta un nucleótido, así como de discriminar entre precursores y secuencias maduras, con una alta sensibilidad (en el orden fM). Ver *Panel B*.



**Panel B. Método de Amplificación por qRT-PCR de microRNAs con Sondas Taqman®.** Este método utiliza cuatro primers. El primero tiene un estructura de tallo y asa despareado por 5-7 nt en el extremo 3' (azul claro). Éste se utiliza para sintetizar el cDNA, uniéndose a una región del miRNA maduro en el extremo 3' (rojo). La hibridación se logra por incubación a 16 °C por 15 min y la transcripción reversa (RT) a 50 °C por 30-45 min. Una porción del cDNA. Los otros tres se utilizan simultáneamente durante el qPCR en donde se utilizan dos oligos convencionales, uno que se une a la secuencia complementaria a la copia del miRNA (FWD) y el otro (REV) y un tercero que contiene un fluoróforo (F) y un apagador (Q) en cada extremo del oligo, mismo que se aparea parcialmente río abajo a la secuencia complementaria del miRNA, en el cDNA previamente sintetizado. Una vez que la Taq polimerasa elonga la cadena desde el primer REV, a su paso desaparece y degrada el oligo modificado mediante su actividad de exonucleasa 5'-3', lo que libera al fluoróforo de la acción del apagador, y esto produce la fluorescencia que registra el instrumento. El apagador, usualmente variantes químicas de rodamina, apaga la señal del fluoróforo activo (variantes de fluoresceína) mediante FRET (*Förster resonance energy transfer*) cuando está a una proximidad <10 nm.

Con este ensayo se encontró que de cinco miRNAs analizados, solamente cuatro eran detectables en la fracción sináptica de cerebro completo, y que miR-153 estaba casi ausente de dicha fracción (*Fig. 4.5.1*).



**Figura 4.6.1. qRT-PCR de microRNAs Maduros en SN.** Se usaron 200 ng de RNA de tres animales por fracción como molde de la transcripción reversa (RT). **(A)** La media y desviación estándar de los datos de Ct crudos fue graficada en función de cada miRNA medido, para demostrar la baja variabilidad observada entre cada animal; Dada la carencia de un marcador equivalentemente expresado entre ambas fracciones, no se llevó a cabo una normalización de datos. Recuérdese que los valores de Ct son inversamente proporcionales a la abundancia original de un amplión, por lo que a mayor valor de Ct, menor es la abundancia del molde o templado. Así, el miRNA miR-153 tuvo una diferencia de 2.3 ciclos entre el total y los SN, lo que equivale a 22.3=4.9 veces mayor expresión en la fracción total de cerebro (Ce) con respecto a la fracción SN (SCe). El miRNA de expresión en músculo presentó los valores de Ct más altos, indicando su ausencia en SCe. La amplificación observada en Ce probablemente se genera a partir de las células del músculo liso del endotelio capilar. **(B)** Cuantificación relativa (SN/Total) de cada miRNA expresada en SN. Note que la única diferencia estadísticamente significativa pertenece a miR-153, calculada por una prueba pareada t de Student de dos colas ( $P \leq 0.05$ ). Las barras de error se incrementan al convertir los valores de Ct individuales en el espacio lineal ( $2^{Ct}$ ). Los miRNAs let-7d, miR-9 y miR-124 mostraron diferencias no significativas, por lo que se asume que están localizados en la vecindad sináptica. El porcentaje de miRNA retenido en la fracción SN se graficó como  $[(SN/Total) \times 100]$ , denominado el factor PS/T (inserto superior). ND, no detectado.

Aún más evidente fue la diferencia encontrada para el snRNA U43, de localización nuclear, el cual no pudo ser amplificado en los SN, confirmando una vez más que dicha fracción está libre de contaminación de RNAs nucleares. Lo cual sugiere que el snRNA U6 antes detectado tiene una localización dendrítica que es bona fide.

Al mismo tiempo, miR-1, de expresión muscular fue detectado en niveles sumamente bajos, a diferencia de los miRNAs neuronales let-7d, miR-9 y miR-124, que refuerzan las observaciones realizadas anteriormente para el primero y el último miRNAs.

Dado que la expresión de miR-153 fue significativamente menor en SN, concluimos que la localización de miRNAs en la vecindad sináptica debe ser un fenómeno altamente selectivo, que envía en diferentes concentraciones a los miRNAs a regiones cercanas a las sinapsis, posiblemente basado en las diferencias de las secuencias de cada miRNA o bien por un efecto de difusión que estuviera en función de la abundancia de cada miRNA. Más tarde veríamos que éste no fue el caso.

Aunque este método fue el más sensible que pudimos utilizar en su momento, la limitante financiera nos obligó a elegir una plataforma de qPCR más barata para los experimentos subsecuentes. Sin embargo, con los datos mostrados arriba, decidimos realizar un análisis global de todos los miRNAs reportados hasta entonces, mediante la técnica de microarreglo, con el fin de mapear las diferencias de expresión entre ambas fracciones, tanto en cerebro completo como en diferentes subregiones.

Para ello se estableció una colaboración con el Dr. Ronald P. Hart de la Universidad Estatal de Nueva Jersey, en EU, quién desarrolló y validó la plataforma de miRNAs bautizada originalmente con el nombre de miRmax, comercializada posteriormente por Invitrogen bajo el nombre de NCode®. Los resultados se describen en el capítulo 5.

## Sinaptoneurosomas

El modelo de SN mostró una clara separación entre marcadores de proteína y RNA, usando altos volúmenes de sacarosa en cada paso de centrifugación, para diluir cada componente extra-sináptico hasta donde fuese posible. La adición de un paso extra al final de la corrida ayudó a eliminar contaminación microsomal (retículo endoplásmico y Golgi) y glial que se agregaba al sacar la interfase de SN en el paso 3, mediante una pipeta Pasteur. Esto se logró colocando la muestra sobre una “cama” de sacarosa con una densidad alta (1M) pero que sólo permite la sedimentación de SN.

Las desventajas de este método son a) que se requiere bastante tejido para obtener suficiente material de análisis (3 a 5 animales por extracción), ya que se pierde hasta un 50% de material durante la centrifugación, y b) que es muy prolongado ya que cada extracción toma al menos 4 horas. Aunque, desde luego, la calidad es mayor que con otros métodos.

Otras estrategias, como la de Loscher et al.<sup>195</sup>, que se enfoca principalmente en la extracción de sinaptosomas (Syn), fueron descartadas por la pobre separación de marcadores de RNA entre fracciones, adicional a la falta de enriquecimiento en PSDs. También la metodología de Villasana et al.<sup>186</sup>, basada en la filtración secuencial con membranas de nylon de porosidad decreciente, porque la mayoría de las membranas post-sinápticas tienden a romperse con mayor facilidad, especialmente cuando no se humedecen antes de ser utilizadas. Esto resulta en una hiper-dilución del citodendroplasma y la potencial pérdida de moléculas relevantes.

Las modificaciones al método de Carlin et al., no afectaron la integridad ultraestructural de la fracción. De hecho al realizar un comparativo de sus resultados con los nuestros, no se encontraron diferencias ni en la proporción de PSDs ni en el grado de edematización mitocondrial<sup>185</sup>, que suele ser un factor morfológico que se toma en cuenta para evaluar el impacto del método. Además la evaluación por expertos que revisaron nuestra fracción SN concluyeron que era una preparación adecuada.

Entre otros factores que se modificaron al método estándar fueron a) la reducción de la velocidad de homogeneización con pistilo de teflón y no de vidrio, b) la homogeneización de los pellets colectados disgregando con pipeta Pasteur en lugar de un homogeneizador de vidrio, c) la preparación y mantenimiento de los gradientes de densidad de sacarosa a 4 °C de forma constante, d) la minimización en la producción de burbujas durante el pipeteo, e) la rapidez con la que se efectuó la disección de cada región del cerebro en frío constante, y f) el incremento de la concentración de inhibidores de RNasas en cada solución.

Así, este método provee una buena base para el análisis de componentes post-sinápticos sin pérdida excesiva de citodendroplasma, útil para estudiar miRNAs sinápticos.

## Western Blot

La separación de marcadores del cuerpo neuronal y dendríticos si bien no fue absoluta, permitió maximizar el enriquecimiento de proteínas sinápticas en la fracción SN (Psd-95 y Sv2), una reducción dramática de los marcadores de soma y una desaparición de los gliales (Gfap y Mbp). La separación de proteínas basada en su distribución subcelular es un proceso complicado, especialmente con ultracentrifugación, pues en general obtienen gradientes de abundancia. Esto es más aparente con proteínas que no están discretamente localizadas, a diferencia de las proteínas nucleares o de otros organelos.

La poca abundancia aparente de algunos marcadores que se observó en la fracción total, comparada con SN para NeuN o Tubα1, se debió probablemente a la diferencia de volúmenes en los que se diluyó cada muestra, aún cuando se cargaron cantidades de proteína iguales en cada gel para WB. Esta disminución fue proporcional al volumen utilizado para cada fracción. Mientras que el homogeneizado total se resuspendió en 10 mL de sacarosa, la fracción SN terminó con 0.5 mL de volumen final en PBS. Es por ello que la comparación entre la fracción P1 y SN fue la más adecuada para establecer las diferencias con marcadores de soma que para los demás, pues es en P1 donde se concentran los cuerpos neuronales con núcleos y otros grandes fragmentos celulares. Para marcadores uniformemente distribuidos en la neurona como Tubβ3 este cambio fue imperceptible, aunque implica que está altamente concentrada en el soma.

Por su parte, el hallazgo más sorprendente de estos datos fue encontrar un enriquecimiento de las proteínas Argonauta (eIF2C1-4) y FMRP en SN, lo que posiblemente refleje su importancia en dendritas. Este descubrimiento no fue tan sorprendente si uno toma en cuenta la abundancia encontrada mediante inmunohistoquímica en procesos dendríticos de neuronas hipocámpales y corticales reportada por Lugli et al.<sup>8</sup> y Antar et al.<sup>196</sup>.

Si dicho enriquecimiento refleja su actividad localizada, entonces sería interesante evaluar si ocurren cambios de abundancia relativa entre soma y sinapsis bajo diferentes condiciones celulares, evaluando su tasa de translocación a dendritas, la unión de otras proteínas como Dicer/TRBP, modificaciones postraduccionales y su degradación local, en función su actividad catalítica, en particular de Argonauta. Tales observaciones no habían sido reportadas en SN puros con anterioridad.

Dado que el anticuerpo policlonal 4F9 reconoce a todos los miembros de la familia de Ago, la diferencia entre la señal detectada para Ago2 con el anticuerpo monoclonal y 4F9 deja un camino para explorar la abundancia local de cada miembro, en especial de Ago4 cuyas mutaciones en el sitio catalítico de coordinación de Mg<sup>2+</sup> (Ago2-GXDR y DV -> GXVR y GV-Ago4) impiden que tenga actividad endonucleasa con los mRNAs blanco<sup>80, 125</sup>.

#### Separación de RNA por Peso Molecular y RT-PCR de Punto Final

El método de precipitación parcial con etanol para separar los fragmentos > 200 nt fue esencial para concentrar a los miRNAs en una sola muestra y separar a los mensajeros en otra. Éste se usa rutinariamente para eliminar el ruido de amplificación inespecífica cuando se realiza la síntesis de cDNA dado por mRNAs; eliminando también el efecto inhibitorio por exceso de sustrato de la transcriptasa reversa (MMLV-RT). Esto también ayuda a maximizar la masa de RNA de bajo peso molecular para detectar miRNAs de muy baja expresión, lo cual es especialmente útil cuando se realizan experimentos de Northern blot (NB).

El principal control de calidad rutinario que se usó inicialmente fue el de la amplificación del mRNA marcador de soma Tubα1, que nunca fue detectado mediante RT-PCR convencional (35 ciclos) a partir de SNs puros. Ello fue decisivo para continuar con la caracterización de la muestra.

Esta metodología, más bien cualitativa porque en esencia depende de la eficiencia de tinte con EtBr, no fue suficientemente sensible para concluir si la fracción SN estaba libre de otros contaminantes, por lo que fue necesario realizar un perfil cuantitativo más amplio con otros marcadores mediante qRT-PCR, como se hizo posteriormente.

## Integridad del RNA

La evaluación de integridad del RNA siempre se realizó mediante PAGE o bien con chip de Bioanalyzer antes de correr cualquier experimento. En todos los casos se encontró una conservación adecuada de las bandas de RNAs ribosomales y de bajo peso molecular, derivado del uso de agua libre de nucleasas en todas las soluciones así como de una alta concentración de inhibidores (15 U/mL), además de un manejo constante en frío para todas las muestras así como de volúmenes grandes de sacarosa para disminuir la actividad catalítica y diluir las RNAsas endógenas respectivamente.

Para todas las reacciones enzimáticas se procuró que el cociente 260/230, que mide la contaminación con fenol derivada de la extracción con Trizol, fuera superior a 1.8 para garantizar uniformidad en la eficiencia de procesamiento, especialmente cuando se sintetiza cDNA.

Además, cuando fue posible, siempre midieron estas variables para animales independientes aún cuando algunas muestras fueron mezcladas. Cuidar de estos factores siempre es indispensable en cualquier investigación.

## qRT-PCR

Este fue el método más sensible que pudimos utilizar para hacer un perfil de marcadores de RNA en SN. Con él mostramos que nuestro método separaba perfectamente marcadores de soma como ArhGef11, cuya distribución restringida ya se había reportado previamente<sup>197</sup>; pero el hallazgo fortuito de que ArhGef5 mostró una diferencia de expresión hasta 20 veces menos en SN que en el homogenado total, sugiere que su localización es preferentemente nuclear o perinuclear, de lo cual no existe reporte alguno. Dicha idea estuvo apoyada al comparar las fracciones P1 y SN en donde Gef5 está significativamente más enriquecido en la primera. La relevancia de su distribución tan discreta es un misterio.

Por otro lado, marcadores de sinapsis como  $\beta$ -actina, Psd-95 o NMDAR1 no fueron tan abundantes en SN como sus contrapartes de proteína<sup>190, 197</sup>, lo que indica que posiblemente sean traducidos en 'hot spots', cerca del aparato espinar y de ahí distribuidos al resto de las dendritas en una concentración mayor que sus mRNAs.

## Dot- y Northern blot

El ensayo de DB fue indicativo de que existían miRNAs detectables en SN, incluyendo algunos precursores, y que había diferencias de expresión entre tres diferentes tejidos. Nos ayudó a seleccionar las sondas para evaluar cada caso de forma individual mediante NB.

Sin embargo el DB tiene un problema fundamental: el de la normalización de la señal. Aunque la masa de RNA cargada siempre fue la misma, no se utilizó un RNA artificial pre-mezclado con el RNA problema que pudiera servir como control de cargado para la hibridación. Por otro lado, aún cuando se utilizó el tRNA<sub>Phe</sub>, como normalizador interno pues no mostró cambios de abundancia entre SN y la fracción total, no logró una buena estadística porque no logramos compensar el decaimiento de la señal radioactiva entre diferentes experimentos, limitados por la dificultad en reunir suficiente masa, que requirió hasta de 10 animales por experimento, aspecto que resultaba impráctico.

Aunado a ello, este ensayo no era capaz de discriminar la señal proveniente de los pre-miRNAs y de las secuencias maduras, presentes en el RNA de bajo peso molecular, lo cual podía sesgar los resultados. En particular porque queríamos evaluar miR-



NAs maduros. Con el tiempo vimos que algunos resultados mostraron ser compatibles con los observados mediante microarreglo, donde el diseño de las sondas estaba mejor balanceado para maximizar la señal de los miRNAs maduros, mismos que luego fueron confirmados por NB.

En otros estudios se ha observado que miR-124 está más concentrado en el soma que en dendritas o axones<sup>14, 15, 176</sup>, aunque en DB se observó una abundancia similar en ambas fracciones, tanto en Ce como en Cx, pero no en Hp. Se sabe que miR-124 está implicado en la adquisición<sup>198</sup> y el mantenimiento del fenotipo neuronal *in vivo*<sup>199</sup> y su expresión se mantiene en el adulto<sup>200</sup>. Curiosamente también se requiere para el crecimiento de neuritas durante el desarrollo<sup>201</sup>; sin embargo casi no existen mRNAs somato-dendríticas que contengan un sitio de unión para este miRNA, lo cual sugiere que muchos de sus blancos también despliegan una alta abundancia en el soma. Es posible también que una vez la neurona ha madurado, la tasa de translocación a las dendritas disminuya en un mecanismo que aún no se ha establecido, especialmente en el hipocampo.

El NB, de mayor sensibilidad, demostró que las sondas usadas en el DB detectaban positivamente miRNAs maduros, aunque también encontramos bandas entre 60-80 nt para let-7b y miR-24-1. Esto suele ser infrecuente para muchos miRNAs, ya que la vida media de estas especies suele ser corta, pero estos dos casos fueron los primeros que indicaban la presencia de pre-miRNAs en sinapsis.

Uno de los resultados más intrigantes fue la detección mediante NB del snRNA U6 en SN, que es componente esencial del espliceosoma en el núcleo. Aunque estuvo disminuido más de 5 veces en SN de todos los tejidos, siempre fue visible como una banda ~100 nt. En otros estudios no es detectable en SN purificados mediante filtración secuencial de sinaptosomas<sup>197</sup>, que fragmentan con más rigor las membranas y diluye más sus componentes solubles. Aunque en otro reporte, los mismos autores muestran su presencia bajo las mismas condiciones<sup>15</sup>.

Anteriormente se ha reportado la presencia de otros snRNAs como U2 así como la actividad de *splicing* en dendritas disecadas con micropipeta de registro electrofisiológico<sup>202</sup>. Estamos seguros de que no hay contaminación nuclear ya que otro marcador nuclear, snoRNA U43, que participa en la modificación química de algunos tRNAs, no fue detectable en SN mediante qRT-PCR.

Dado que muchos miRNAs son derivados de intrones<sup>73</sup> y U6 se requiere para la formación del *lariat* y esto lo hace hibridándose al molde, por lo que sería factible que los precursores intrónicos viajen unidos a dicho snRNA. Algunos de los miRNAs intrónicos que en rata están presentes en SN son miR-16. Sin embargo, de los miRNAs más restringidos en soma que provienen de intrones son miR-7-1, miR-122a, miR-126, miR-153 y miR-378 (datos consultados del servidor <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/miRGen/v3/Genomics><sup>203</sup>). Tal vez U6 sea útil para evitar que estos miRNAs arriben a las dendritas, si es que este mecanismo es posible.

#### qRT-PCR de miRNAs

Con el método de Taqman, que solamente se detecta miRNAs maduros, varios miRNAs mostraron una abundancia en SN comparable con la de los mRNAs dendríticos, sin diferencias estadísticas significativas, con una representatividad que osciló entre el 50-80% del valor observado en la fracción total. Ello fue comparable con datos previos obtenidos con dendritas de neuronas hipocampales microdisectadas con láser para los mismos miRNAs con la misma metodología.

Por otro lado la ausencia del marcador nucleolar snoRNA U43 dejó claro que no hay contaminación nuclear en SN dada por este tipo de RNAs pequeños. Mas adelante se realizó un perfil más global con una metodología distinta, menos discriminatoria,

pero con resultados comparables. En suma, estos datos validaron la confiabilidad de la fracción SN para los siguientes experimentos.

# CAPÍTULO V

## RESULTADOS II:

### ANÁLISIS GLOBAL DE EXPRESIÓN POR MICROARREGLO

#### 5.1 Análisis de Expresión en Cerebro Completo.

Mientras que los estudios de DB y NB proporcionaron información importante acerca de la posibilidad de que los miRNAs también son entidades sinápticas, apoyados por el método de qRT-PCR, entonces nos preguntamos si este patrón podía ser observado para otros miRNAs. Para la versión 8.0 del miRBase, ya se habían reportado 234 miRNAs en rata y no existía ninguna publicación que abordara de forma más comprehensiva la expresión de todos ellos en las terminales sinápticas.

La expresión global en el cerebro de la rata fue evaluada mediante la técnica de microarreglo, en una plataforma diseñada para explorar la expresión de 248 miRNAs maduros (miRBase v.9.0) y una veintena de precursores en múltiples especies, que incluyen *C. elegans*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *M. musculus*, *R. norvegicus* y *H. sapiens*.

Las sondas que componen cada arreglo fueron optimizadas para la hibridación a una temperatura de 42 °C, con una razonable capacidad de distinción entre isoformas de miRNAs maduros, como los de la familia de let-7, que en algunos casos sólo varían solamente en un nucleótido.

Para iniciar el análisis, decidimos primero caracterizar las diferencias en los patrones de expresión del cerebro de la rata adulta y su fracción SN. En la disección de este tejido se incluyó a las regiones de la corteza, el hipocampo, las regiones límbicas como el tálamo, hipotálamo, estriado, cuerpo caloso el puente, excluyendo al bulbo olfatorio y otros órganos del SNC como el cerebelo, el tallo cerebral y la espina dorsal.

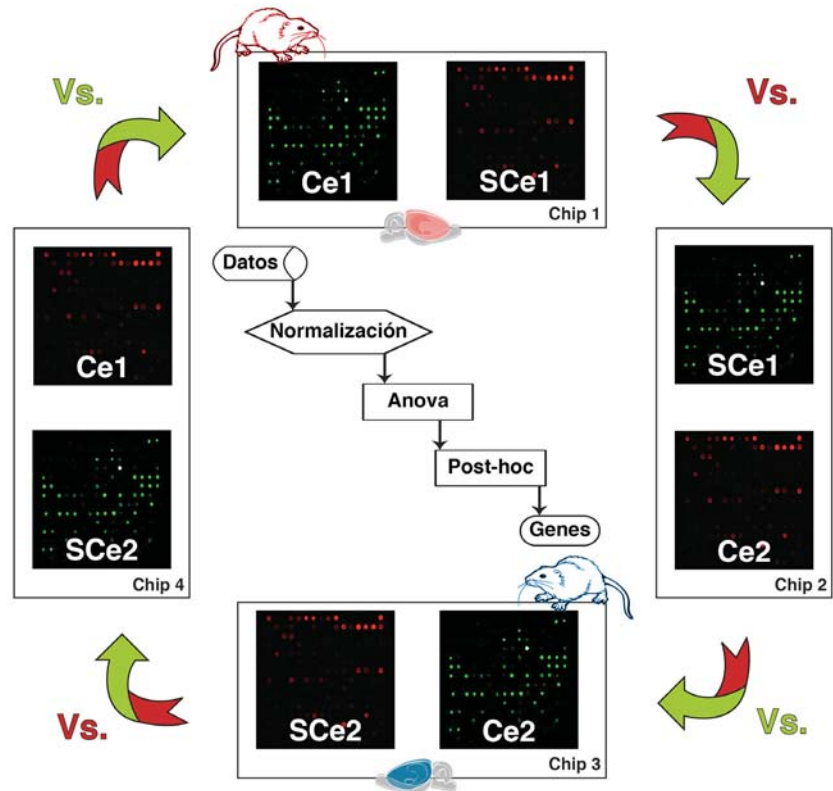
El experimento se diseñó siguiendo los lineamientos del modelo de *loop-design* para calcular al mismo tiempo el efecto de la variabilidad biológica y de la muestra (ver sección 9.8) y determinar las diferencias estadísticamente significativas entre el total y los SN (ver Materiales y Métodos para más detalles). Los resultados se esquematizan en la *Fig. 5.1.1*.

Brevemente, este análisis consiste en la hibridación sobre el mismo microarreglo de dos muestras, una control y la otra experimental, marcadas cada una con un fluoróforo de cianina distinto (Cy5, rojo; Cy3, verde). Normalmente cada muestra se divide en dos y una parte se marca con Cy5 y la otra con Cy3, con la finalidad de hibridarla dos veces en dos microarreglos diferentes para evaluar las diferencias de eficiencia de marcaje (*dye-swap*).

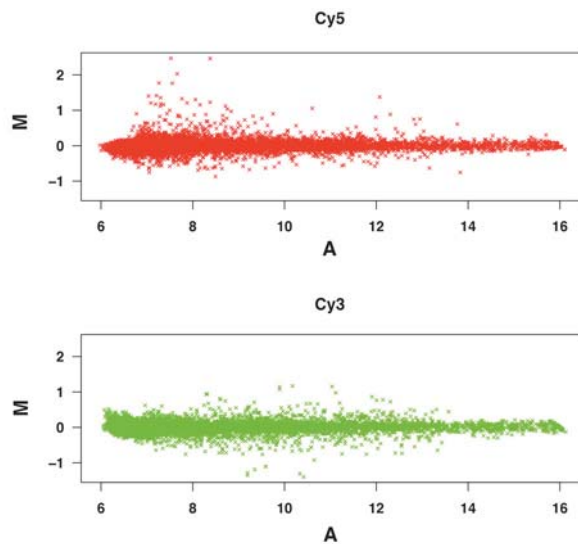
El diseño de asa se construye al alternar las réplicas técnicas (*dye-swapped samples*) con las réplicas biológicas (homogenado total vs. SN) para evaluar al mismo tiempo el efecto de marcaje y de reproducibilidad biológica, mediante un análisis de varianza aplicado a microarreglos (MAANOVA), de acuerdo con el modelo de Church, et al. <sup>204, 205</sup>. Con esto se minimiza el número de microarreglos necesarios para realizar un análisis confiable de los datos. Ver sección 8.9 en Materiales y Métodos.

**Figura 5.1.1. Modelo de Diseño de Asa (loop design) para el Análisis de Microarreglos.**

Diagrama mínimo de análisis de datos para 2 réplicas biológicas (ratas en rojo y azul) con 4 muestras (Ce, cerebro completo; SCe, SN). Note que cada muestra es marcada dos veces, en rojo y verde, e hibridada junto a la muestra de una réplica biológica distinta, formando el asa de comparación. El análisis estadístico requiere la comparación simultánea de todos los datos, normalizados por cuantiles y comparados mediante ANOVA después de aleatorizarlos 10,000 veces, para aplicarles pruebas post-hoc y de agrupamiento (*k-means*) hasta obtener una lista de genes diferencialmente expresados. En nuestro análisis se utilizaron 3 réplicas biológicas en todos los experimentos subsecuentes, por lo que el número de microarreglos fue de 6 como mínimo.



La distribución de intensidad de fluorescencia para cada fluoróforo no mostró un sesgo notable, al graficar los valores M-A de control de calidad, lo que implica que no hubo variabilidad en el marcaje para cada muestra (Fig. 5.1.2).

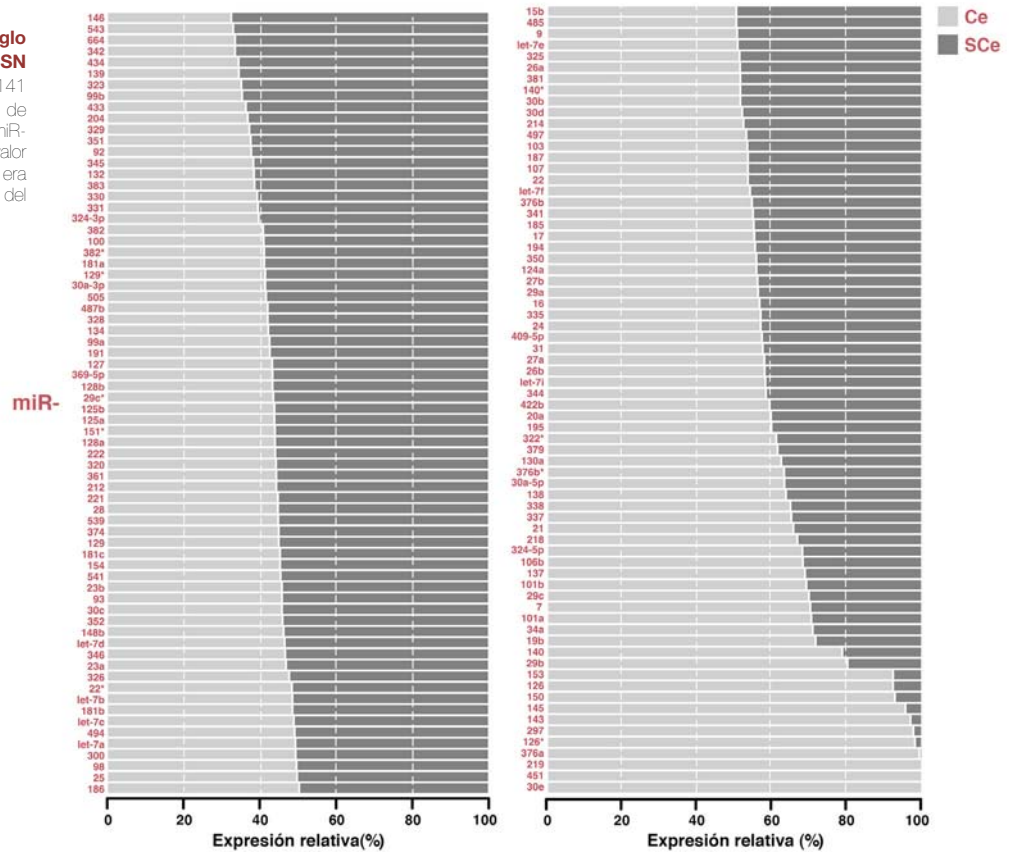


**Figura 5.1.2. Gráfico MA de Control de Calidad de los Datos de Microarreglo.** Los datos de fluorescencia en las gráficas M-A para cada canal mostraron un comportamiento lineal, sin sesgos de marcaje (microarreglos  $n=6$ ). En eje de "Y",  $M=\log_2[R/V]$  y en eje de "X",  $A=\log_2[R/V]$ ; donde R=Cy5, rojo y V=Cy3, verde. Nótese que un incremento por arriba de 1 significa que el canal verde predomina.

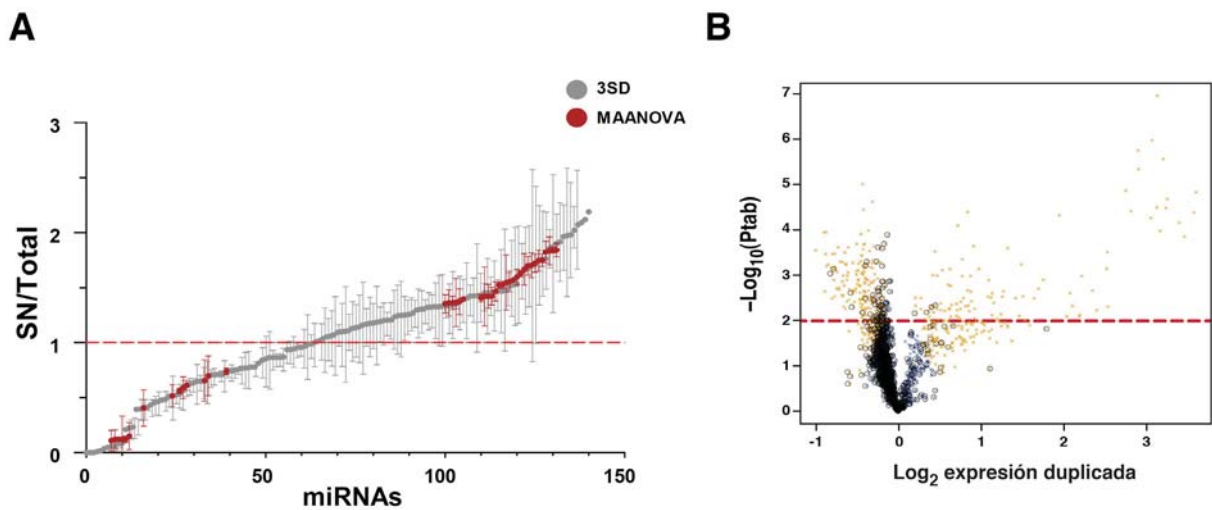
Para determinar cuáles miRNAs estaban expresados en cada muestra primero se decidió realizar un análisis exploratorio limitando la búsqueda a aquéllos miRNAs cuya expresión superara 3 desviaciones estándar (3SD) por encima de la fluorescencia observada en las sondas control con secuencia aleatoria ó *scrambled*.

Los resultados mostraron que de 141 miRNAs detectados, alrededor del 50% estaban presentes en SCe, y de éstos más de la mitad estaban enriquecidos por lo menos con la misma abundancia detectada en la fracción total (Fig. 5.1.3).

**Figura 5.1.3. Análisis por Microarreglo de la Expresión de microRNAs en SN (3SD).** Distribución de la expresión de 141 miRNAs detectados en 12 microarreglos, de acuerdo con el cociente SN/Total. Los miRNAs se ordenaron de mayor a menor valor según su valor PS/T. Aquellos cuya señal era nula en la fracción total fueron eliminados del análisis. Ce, cerebro completo; SCe, SN.



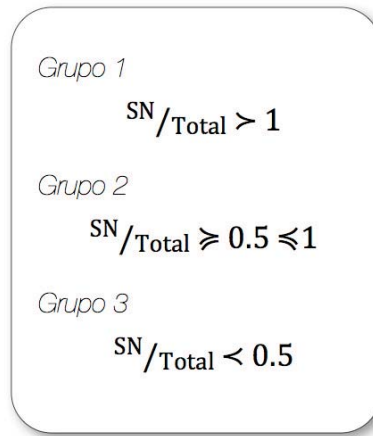
Solamente 48 miRNAs ( $P \leq 0.01$  para el estadístico F1 y  $P \leq 0.05$  para F3) mostraron valores de expresión significativos (los más conservados entre réplicas biológicas), después de aplicar la corrección de ANOVA de Benjamini-Hochberg (FDR). Estos valores de  $P$  se generaron después de realizar 10, 000 iteraciones de permutación aleatoria de los datos de expresión por microarreglo (Fig. 5.1.4).



**Figura 5.1.4. Comparación de Resultados entre los Métodos Estadísticos de MAANOVA y 3SD.** (A) Los miRNAs que superaron tres desviaciones estándar por encima de la señal observada en las sondas control (3SD, puntos grises) se consideraron como detectables ( $n=141$ ). Los miRNAs filtrados por análisis de varianza con valor  $P$  ajustado (puntos rojos,  $P \leq 0.01$ ) fueron seleccionados para su análisis posterior ( $n=48$ ). Nótese que los puntos rojos presentan menor varianza. La línea roja transversal corresponde a la igualdad de abundancia entre ambas fracciones. (B) Gráfica de volcán de expresión diferencial entre SCe y Ce. Los miRNAs fueron ordenados por valor de fluorescencia normalizada. La línea roja representa el punto de corte para  $P=0.01$  y los puntos encerrados con un círculo representan los miRNAs seleccionados por MAANOVA. Ce, cruces amarillas; SCe, círculos azules.

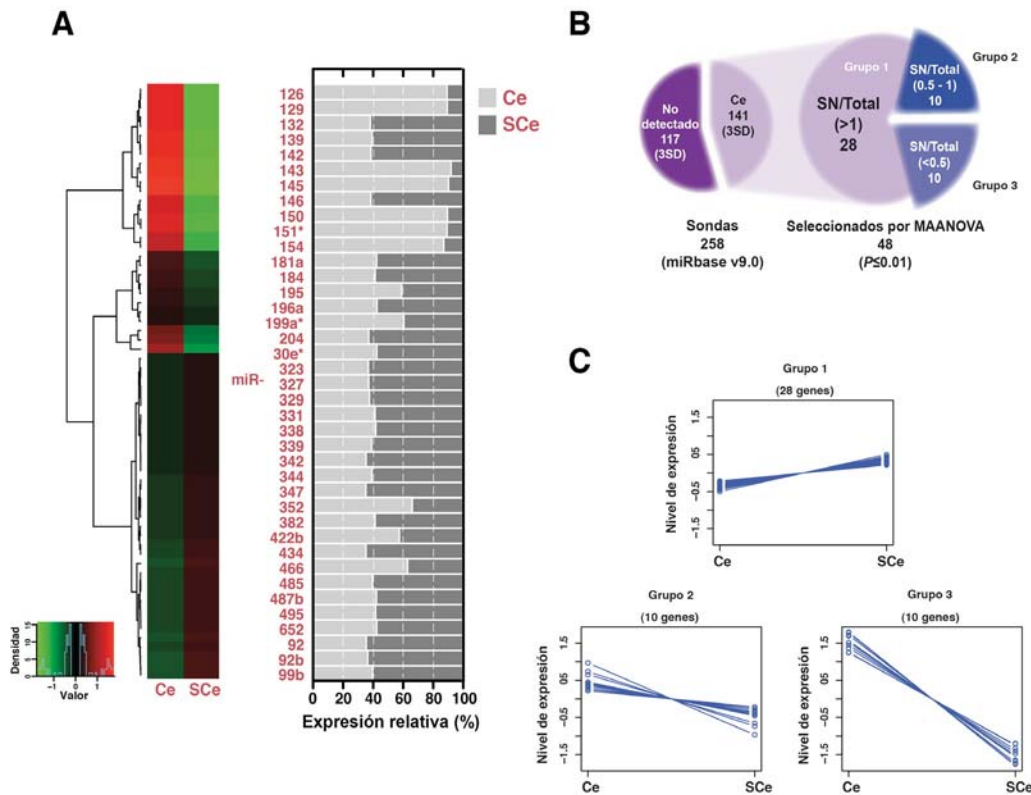


Con ambos métodos se distinguieron tres grupos de expresión:



El primero, con una abundancia remanente en SN superior al 100% encontrado en el homogenado total; el segundo, con una expresión similar en ambas fracciones, donde arbitrariamente se seleccionaron miRNAs con PS/T entre 50 al 100%; y el tercer grupo, con una abundancia disminuida en SCe ó un PS/T menor al 50%.

No obstante, el número de miRNAs que cayeron dentro de esta clasificación disminuyeron notablemente después de aplicar MAANOVA. Así, al Grupo 1, 2 y 3 les correspondió 10, 28 y 10 miRNAs respectivamente (Fig. 5.1.5). Éstos presentaron el menor grado de variabilidad entre las réplicas biológicas.



**Figura 5.1.5. Heatmap de microRNAs Seleccionados por MAANOVA. (A)** Mapa de calor (heatmap, panel izquierdo) que esquematiza la intensidad de expresión de los miRNAs seleccionados por el método de MAANOVA (ver clave al extremo izq. para código de color). Los datos fueron ordenados por agrupamiento jerárquico no supervisado. Note que los miRNAs con mayores diferencias entre fracciones están agrupados en la parte superior. La expresión relativa (panel derecho) de 42 miRNAs (arbitrariamente elegidos por su relevancia en otros estudios) se calculó como la proporción porcentual que cada fracción contribuye a la suma de la señal observada para cada miRNA. Ce, total; SCe, SN. **(B)** Diagrama de pay indicando el número de sondas usadas y el número de miRNAs detectados en cerebro (círculo menor izq.) así como los miRNAs seleccionados por MAANOVA (círculo mayor, derecha) y cada grupo clasificado. **(C)** Agrupamiento jerárquico supervisado ( $k$ -means=3) donde se observa el patrón de expresión de cada grupo de genes identificado.

Entre los miRNAs más abundantes en SCe, y por tanto miembros del Grupo 1, estuvieron miR-347, miR-434, miR-342, miR-92 y -92b, los cuales tuvieron un enriquecimiento promedio en SCe de 34% de acuerdo con su cociente SN/Total. Ver *Tabla 9*.

Por otro lado, miembros del Grupo 3 fueron miR-143, miR-145, miR-126, miR-709 y miR-150, cuya diferencia de expresión fue semejante a la observada para miR-153 en el ensayo de qRT-PCR (*cf. Fig. 4.5.1*).

Podemos decir que los miRNAs que son candidatos de presentar una función en dendritas, cerca de los contactos sinápticos, son aquéllos pertenecientes a los Grupos 1 y 2, cuya abundancia relativa superó por lo menos el 50% del valor observado en el homogenado total. Interesantemente, varios de estos miRNAs ya habían sido reportados con localización dendrítica en neuronas de cultivo primario de hipocampo, al tiempo que este estudio se llevaba a cabo<sup>176</sup>. Ver *fig. 5.1.5A* (panel derecho).

Los valores del cociente SN/Total son:

miRNA	MA (SN/Total)	miRNA	MA (SN/Total)	miRNA	MA (SN/Total)	miRNA	MA (SN/Total)
miR-347	1.36	miR-339	1.25	miR-181a	1.17	miR-467b	0.60
miR-434	1.36	miR-344	1.25	miR-652	1.17	miR-685	0.51
miR-342	1.35	miR-139	1.24	miR-30e*	1.17	miR-690	0.42
miR-92	1.35	miR-485	1.23	miR-196a	1.16	miR-650	0.42
miR-92b	1.32	miR-99b	1.23	miR-422b	0.86	miR-154	0.39
miR-146	1.32	miR-146b	1.21	miR-195	0.84	miR-151*	0.35
miR-323	1.31	miR-331	1.19	miR-199a*	0.81	miR-129	0.35
miR-327	1.31	miR-382	1.19	miR-705	0.78	miR-150	0.35
miR-204	1.30	miR-184	1.19	miR-466	0.77	miR-709	0.34
miR-329	1.29	miR-495	1.18	miR-265	0.75	miR-126	0.33
miR-132	1.28	miR-338	1.18	miR-352	0.72	miR-145	0.33
miR-142-5p	1.26	miR-487b	1.17	miR-467a	0.64	miR-143	0.08

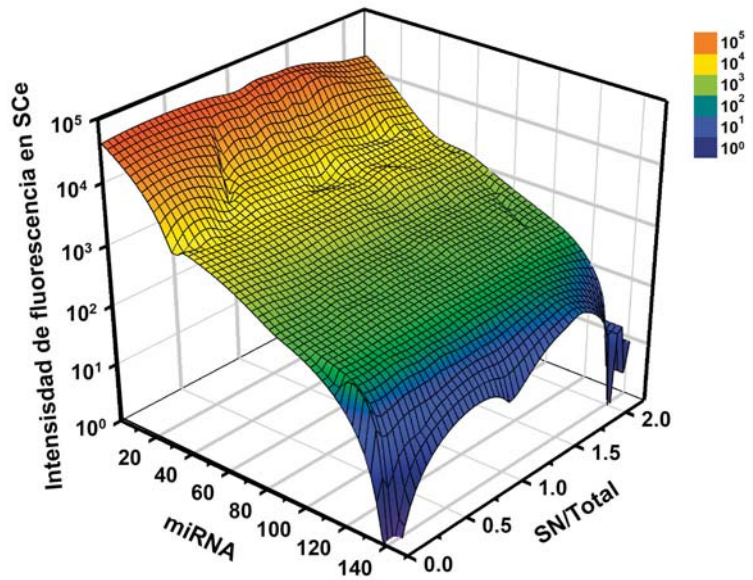
**Tabla 9. Índice de Enriquecimiento Relativo de microRNAs Sinápticos Seleccionados por MAANOVA.** Las sondas utilizadas para detectar a los precursores de miRNAs están dirigidas contra la región del asa. miR-19a(-) corresponde a la sonda antisentido que detecta la secuencia miR\*. miR-124a FL detecta la secuencia completa del precursor. ND, no detectado en el total. La región sombreada en gris oscuro corresponde al Grupo 1, en gris al Grupo 2 y en blanco al Grupo 3.

Fue importante determinar si los valores del cociente SN/Total no estaban distorsionados por bajos niveles de fluorescencia detectados en el microarreglo, especialmente para aquéllos miRNAs cuya expresión fuera baja en SCe. El efecto que provoca dicha expresión es que el cociente SN/Total se incrementa notablemente cuando hay ligeros cambios de fluorescencia en muestras que de por sí presentan baja expresión, cercanos al nivel de ruido, especialmente en la fracción total. Estos cambios se vuelven casi imperceptibles en miRNAs con alta expresión.

Al comparar este cociente con la fluorescencia detectada por cada miRNA observamos que no había un efecto sesgado que fuera significativo, después de normalizar la señal detectada y descartar los miRNAs con expresión por debajo del límite de detección en Ce (*Fig. 5.1.6*).

**Figura 5.1.6. Expresión Relativa (SN/Total) de microRNAs de Ce.**

Los miRNAs fueron ordenados por su nivel de expresión (eje de "X") según sus valores de fluorescencia normalizados (eje de "Y"), y contrastados contra los valores del cociente de abundancia relativa de S<sub>Ce</sub>/Ce (SN/Total). Si hubiera un sesgo notable entre la baja expresión, medida por la intensidad de fluorescencia y la abundancia en SN, entonces se esperarían declives prominentes en la topología de la correlación.

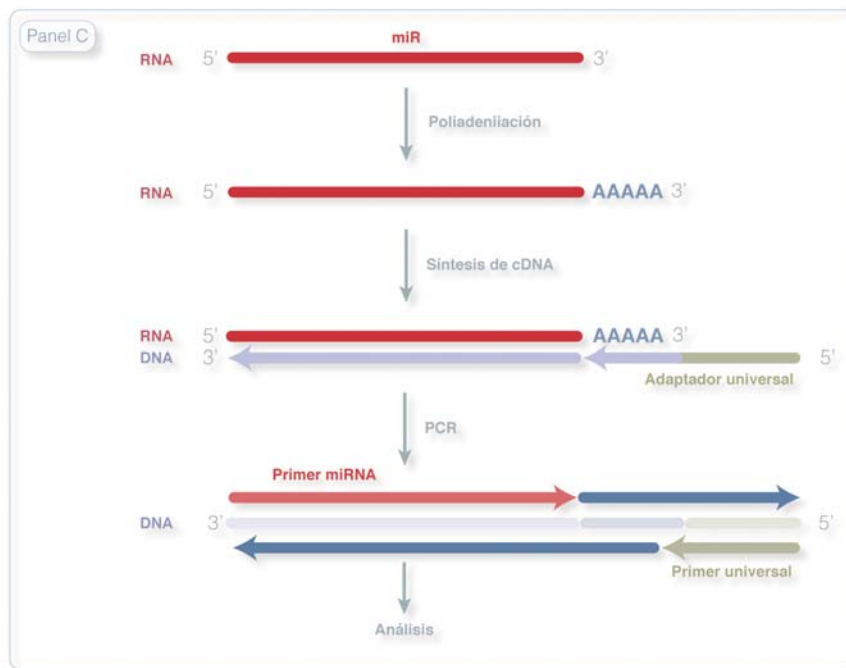


Este último criterio se tomó con el racional de que los miRNAs que son transcritos en el núcleo deben transcurrir el citoplasma perinuclear antes de ser enviados a las dendritas, en la vecindad sináptica. Por tanto, si no eran detectados en la fracción total entonces era probable que la señal observada en S<sub>Ce</sub> más bien obedeció a variaciones del ruido de fondo. Importantemente, ninguno de los miRNAs eliminados del análisis (8 miRNAs) mostraron una señal alta de expresión en SN.

En conclusión, no se halló una correlación positiva entre la abundancia de cada miRNA en la fracción total y la encontrada en S<sub>Ce</sub>. Esto sugiere que su expresión en sinapsis no obedece necesariamente a un transporte pasivo que dependa solamente de su difusión, porque si este fuere el caso, aquéllos miRNAs altamente expresados en Ce como miR-124a o let-7d, deberían mostrar valores altos de expresión en S<sub>Ce</sub>. De hecho los valores PS/T de ambos miRNAs oscilaron entre el 40 al 55% remanente en S<sub>Ce</sub>.

Finalmente, los miRNAs cabeza de lista entre los 20 más expresados en S<sub>Ce</sub> no figuran los de mayor expresión en tejido nervioso, clásicamente reconocidos, como miR-125b ó incluso miR-134, que ya se había reportado con expresión dendrítica en neuronas hipocampales.

Para corroborar estas observaciones, elegimos algunos miRNAs candidatos para ser evaluados mediante qRT-PCR con el método NCode (Invitrogen), que brevemente consiste en amplificar por RT-PCR a los miRNAs previamente poliadenilados in vitro utilizando un oligo sentido idéntico a la secuencia del miRNA maduro y un oligo universal reverso que se hibrida en una porción al poli-A sintético (*Panel C*).

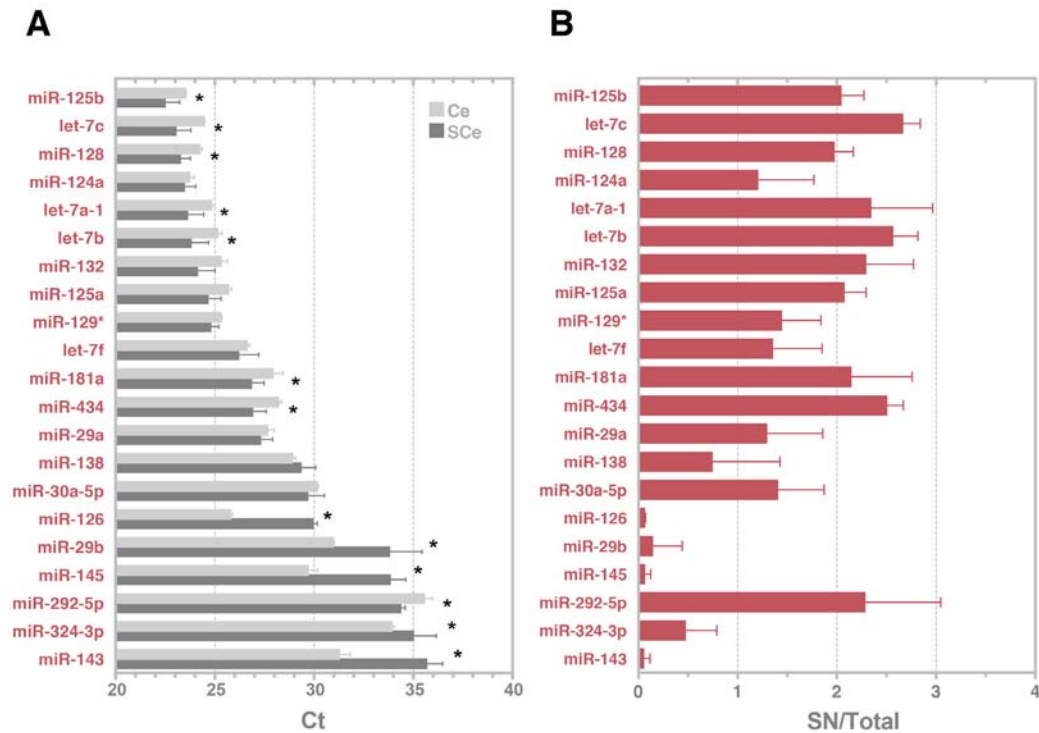


**Panel C. Método NCode® de Amplificación por qRT-PCR de microRNAs.** Este método se basa en la estrategia canónica de amplificación de mRNAs poliadeniladas, en donde comúnmente se utiliza un oligo poli-(dT) que se une a la cola de poli-A de los mRNAs. En este caso, la adenilación se logra mediante catálisis *in vitro* por una Poli-A polimerasa recombinante, que agrega entre 5-15 residuos de Adenina en el extremo 3' del miRNA. La síntesis del cDNA se hace mediante la unión de un primer universal que contiene un región de poli-T que se aparea con la cola recién sintetizada. Una porción del cDNA se utiliza como molde para el PCR y dos oligos canónicos se incorporan a la reacción. El oligo FWD contiene una secuencia idéntica al miRNA que se quiere amplificar y el oligo REV se une a una porción del primer universal que se utilizó durante la RT. La fluorescencia se mide por incorporación de un fluoróforo intercalante en el dsRNA del amplión sintetizado. Usualmente la longitud de los amplimeros oscila entre 40-60 nt cuando se amplifica un miRNA maduro.

Los resultados de qPCR fueron semejantes a los obtenidos en el microarreglo, aunque no con la misma magnitud para todos los candidatos evaluados, pero sí en la misma dirección. A pesar de que se utilizó RNA distinto al usado en los microarreglos, que se purificó a partir de réplicas biológicas diferentes (n=3-5 animales), la reproducibilidad experimental se mantuvo en todos los casos.

Notablemente este ensayo corroboró que la abundancia detectada en Ce no correlaciona con aquella detectada en las sinapsis purificadas como lo mostraron miR-124 y let-7f cuya expresión fue semejante entre ambas fracciones, aún cuando son algunos de los miRNAs con mayor expresión en neuronas (Fig. 5.1.7).

El cociente (SN/Total) mostró el mismo patrón de expresión determinado por microarreglo, en donde cada grupo se vio representado (Tabla 8). Particularmente, los miRNAs miR-434, miR-132 y miR-181a mostraron una tendencia de enriquecimiento en SCe. Contrariamente los miRNAs miR-126, miR-143 y miR-145 nuevamente se mostraron disminuidos en la misma fracción.



**Figura 5.1.7. Amplificación de microRNAs detectados en SCe.** Se utilizaron 200 ng de RNA total de cada fracción como molde para qRT-PCR mediante el método de NCode® (A) Gráfica de los valores de Ct ordenados según la abundancia total detectada y (B) de la expresión relativa según su cociente de enriquecimiento en SN. Los asteriscos indican un valor  $P \leq 0.01$  calculado para una prueba pareada de t de Student de dos colas.

Los miRNAs con mayor correlación de valores de expresión entre el microarreglo y el ensayo de qRT-PCR fueron los siguientes:

miRNA	Microarreglo (SN/Total)	qRT-PCR (SN/Total)	P-val (qRT-PCR)
miR-434	1.36	2.5±0.17	5.00E-4
miR-132	1.28	2.29±0.48	8.30E-2
miR-181a	1.17	2.14±0.17	5.40E-2
miR-126	0.33	0.06±0.01	2.24E-7
miR-145	0.33	0.06±0.06	3.25E-7
miR-143	0.08	0.05±0.01	8.86E-6

**Tabla 10. Concordancia entre Valores de Microarreglo y qRT-PCR.** Los valores de expresión corresponden a los calculados por MAANOVA y qRT-PCR según se indica. Nótese que la magnitud de cambio aumentó en el ensayo de amplificación, pero no la dirección. La cuantificación se calculó por el método RQ (relative quantification,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) obtenido en SCe y Ce (n=3 animales/fracción). El valor P (P-val) se calculó con una prueba pareada de t de Student de dos colas; IC=95%.

Una observación importante fue que el único pre-miRNA detectado en la fracción SN, entre una veintena de otros más, fue pre-miR-128b, cuya señal de expresión estuvo sólo apenas arriba del límite de detección. Esto indica que además de los precursores de let-7b y miR-24 detectados por DB y NB, también el precursor de miR-128b se localiza en las sinapsis purificadas.

En conclusión, los miRNAs maduros y algunos de sus precursores en el cerebro de la rata adulta, se localizan en la fracción sináptica enriquecida en densidades post-sinápticas. Algunos de estos miRNAs muestran una expresión diferencial entre el tejido total (que contiene al soma neuronal) y la fracción SN, lo que sugiere un mecanismo selectivo de translocación hacia las terminales sinápticas. Más aún, que los precursores de miRNAs pueden ser madurados vía Dicer, de forma localizada, apoyando las observaciones realizadas por otros grupos de investigación, en donde reportan la presencia de actividad de Dicer en SN purificados.



## 5.2 Patrones Neuroanatómicos Divergentes de Expresión de microRNAs.

Una vez determinado el patrón de expresión en sinapsis del cerebro completo, nos preguntamos si el diferencial de expresión observado entre las fracciones total y SN también era variable en distintas regiones del cerebro. Para ese momento, algunos estudios habían demostrado que en el ratón, la rata y el humano, los miRNAs mostraban una distribución neuroanatómica específica. Pero no se sabía nada sobre su expresión sináptica.

Para resolver esa pregunta elegimos varias regiones del cerebro para analizar por separado, basados principalmente en su facilidad de disección y en el rendimiento mínimo obtenible de RNA sináptico. Éstas incluyeron el bulbo olfatorio (Ob), la corteza (Cx), el hipocampo (Hp), el cerebelo (Cb) y el tallo cerebral (Bs). Ver *Panel B*. Recuérdese que el Ob no fue incluido en el primer análisis.

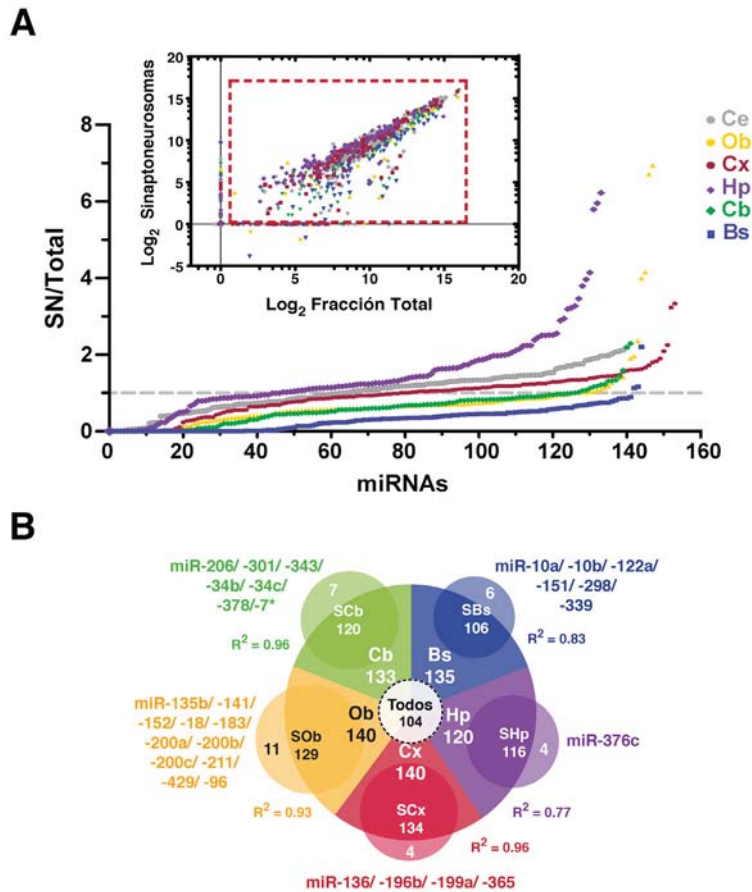
Como se mostró en las *Figs. 4.1.3 y 4.3.2*, la integridad del RNA y de la ultraestructura de los SN mostraron una alta conservación después de la extracción para ambos casos. Algunas diferencias fueron encontradas con respecto a la frecuencia de aparición de mitocondrias, fracciones mielínicas y de PSDs, inherentes a las diferencias del tipo y número de neuronas así como de la glía acompañante, pero en todos los casos los SN mostraron ser los más representativos de cada región.

Para el análisis de expresión, este experimento estuvo diseñado siguiendo los lineamientos de *loop-design*, para contestar específicamente cuáles miRNAs mostraban diferencias estadísticamente significativas (por MAANOVA) entre todas las muestras, incluyendo a la fracción total y SN. Esto permitió definir con mayor claridad aquéllos miRNAs con menor y mayor variabilidad entre muestras. Para dicho estudio se utilizaron tres réplicas biológicas y doce chips.

El análisis grueso, derivado de poner un límite mínimo de detección (3SD) permitió identificar a los miRNAs expresados por región y no sólo aquéllos que mostraran las mayores diferencias significativas después de MAANOVA.

Como se observa en la *Fig. 5.2.1A*, la distribución de los valores SN/Total fueron variables en cada tejido, siendo el Hp la región que mostró mayor abundancia relativa de miRNAs en SN, aunque no con el mayor número. Por su parte, el análisis de la intensidad de fluorescencia de todos los miRNAs detectados, cuyo valor base fue de 3SD del valor medio observado para las sondas control (secuencias que no corresponden a algún miRNA ó scrambled + miR-1), no mostró un sesgo de expresión en alguna de las muestras (ver inserto).

Como en la sección anterior, los miRNAs sin señal detectable en la fracción total fueron descartados, siguiendo el mismo criterio utilizado antes acerca de que los miRNAs deben ser sintetizados en el núcleo antes de ser translocados a las dendritas. El análisis 3SD demostró que cada región expresa miRNAs específicos, aunque aquéllos que se comparten entre regiones tienen niveles de expresión variables (*Fig. 5.2.1B*).



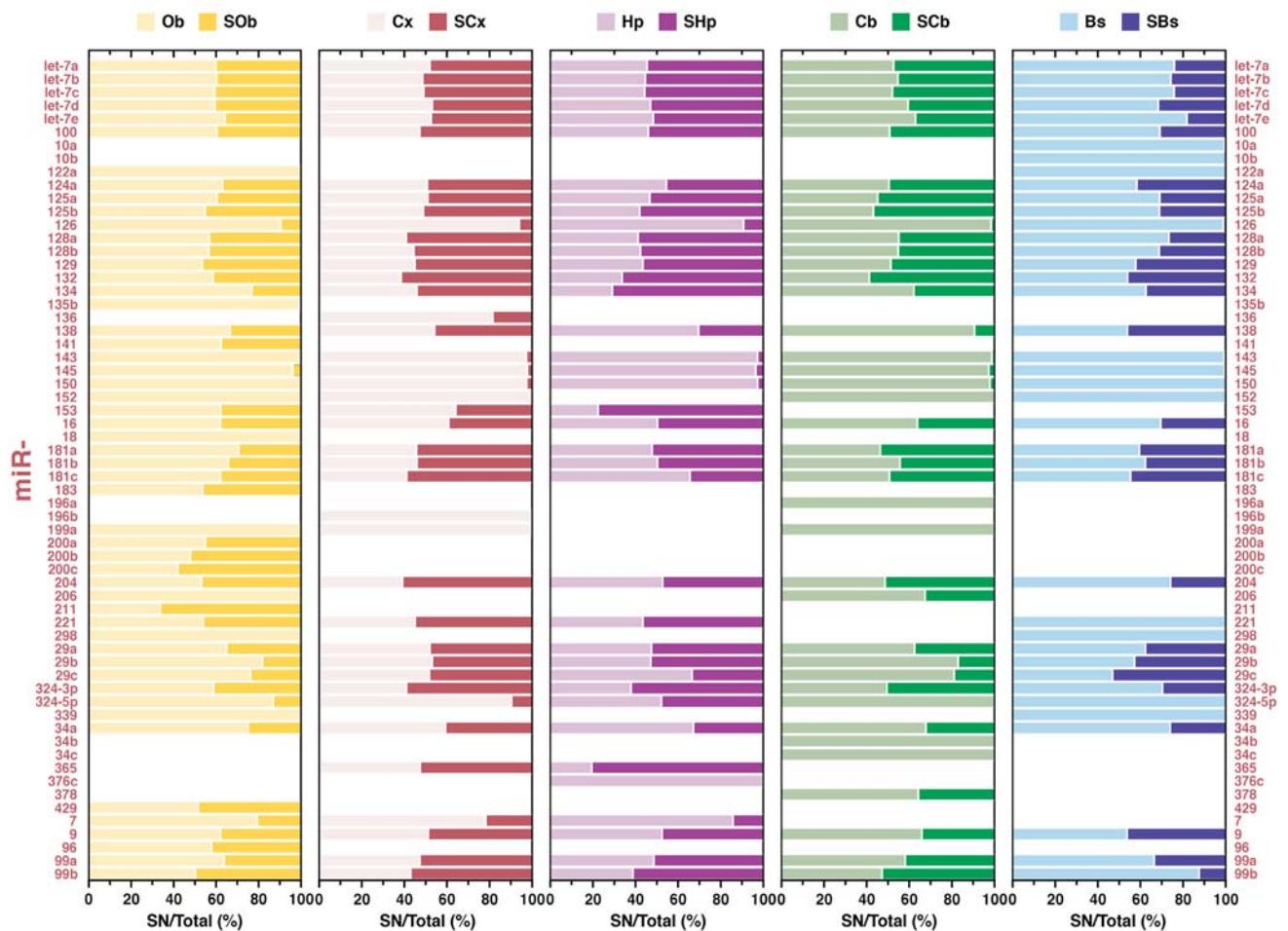
**Figura 5.2.1. Expresión Relativa de microRNAs Sinápticos de Distintas Regiones del Cerebro (3SD).**

(A) La abundancia relativa (SN/Total) se calculó con los valores de fluorescencia normalizados (3SD) para cada tejido. La línea punteada (gris) indica igualdad de expresión en ambas muestras. Inserto, intensidad de fluorescencia observada ( $\text{Log}_2$ ) en SN de distintos tejidos. El recuadro punteado (rojo) indica el área donde se incluyeron a los miRNAs analizados. Los puntos excluidos son los miRNAs que fueron descartados en el estudio porque mostraron nula expresión en la fracción Total después de la normalización. Ver texto para detalles. (B) Diagrama de Venn de miRNAs encontrados en cinco regiones del cerebro de la rata adulta. El círculo blanco central representa los miRNAs compartidos entre todos los tejidos. Cada área coloreada indica el tejido analizado y el número de miRNAs expresados en la fracción total. Los círculos extruidos representan los miRNAs de la fracción sinaptoneurosomal y fuera del área aquellos que se expresan de forma específica por región. Basado en los niveles de expresión, se indica el coeficiente de correlación de Pearson. Ce, cerebro (sin bulbo olfatorio); Ob, bulbo olfatorio; Cx, corteza; Hp, hipocampo; Cb, cerebelo; Bs, tallo cerebral.

En promedio, cerca del 90% de los miRNAs encontrados en la fracción total también se hallaron en la fracción SN, aunque al menos  $\frac{3}{4}$  partes de esa población tuvieron valores PS/T superiores al 50%, lo que implica que muchos de ellos se expresan de manera significativa en dendritas (Ver *Tabla Suplementaria 3* para valores de expresión en Apéndice II). Este hallazgo sugiere los miRNAs que llegan a las sinapsis lo hacen de manera independiente, al menos parcialmente, de su abundancia en el soma neuronal.

Sin embargo, algunos casos en los que se expresan de manera amplia en la fracción total, mostraron también bajos niveles de expresión en SN. Ejemplo de ellos fueron los miRNAs miR-9, miR-138 y un poco más variable el caso de miR-124a. Este cambio de abundancia sináptica dependiente de tejido se observó mejor al graficar los valores del cociente SN-Total de cada fracción (*Fig. 2.5.2*), en donde se observó que el hipocampo es el tejido en los que los miRNAs se expresan de forma más abundante en SN, aunque con número más limitado en comparación con otras muestras.

Interesantemente, el cerebelo que contiene una gran cantidad de sinapsis, especialmente en la compleja arborización dendrítica de las células de Purkinje (aproximadamente  $1 \times 10^5$  sinapsis por célula) mostró un enriquecimiento menor que el hipocampo, sin embargo también tuvo una mayor cantidad de miRNAs cuya expresión era al menos idéntica que en su fracción total. La corteza mostró un patrón similar, aunque un poco más pronunciado que en el cerebelo.

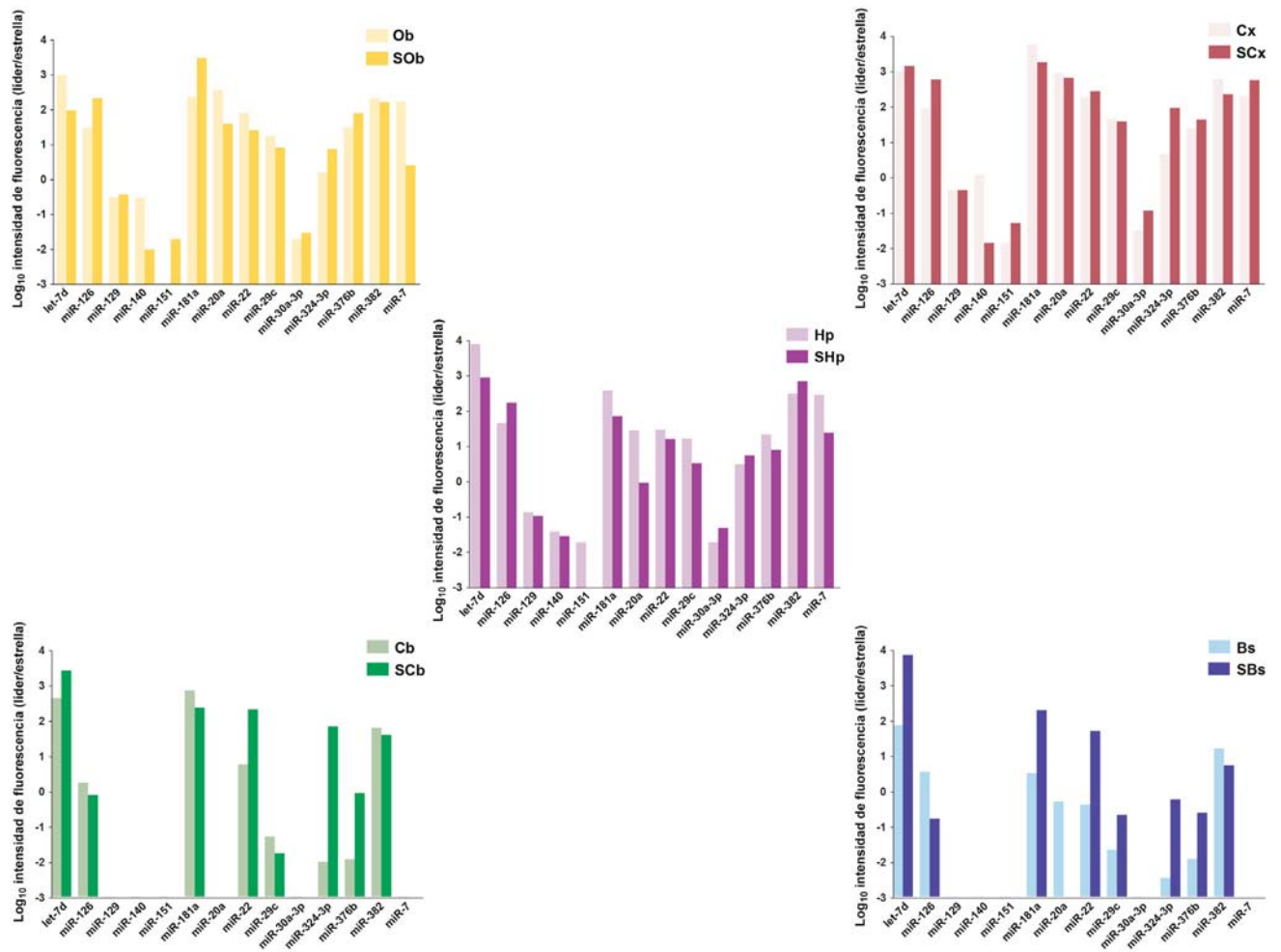


**Figura 5.2.2. Expresión Relativa de microRNAs por Región Analizada (3SD).** Los valores de expresión relativa se calcularon tomando como referencia la suma de intensidad de fluorescencia normalizada de cada fracción como el 100%. Los espacios en blanco indican nula expresión en cada tejido. Ob, bulbo olfatorio; Cx, corteza; Hp, hipocampo; Cb, cerebelo; Bs, tallo cerebral. S(tejido), fracción SN.

El número total de miRNAs detectados en homogenados de cada región fue de 140 en Ob, 140 en Cx, 116 en Hp, 133 en Cb y 135 en Bs. Por su parte en los SN fueron 129 en SOB, 134 en SCx, 115 en SHp, 120 en SCb y 106 en SBs. Este hallazgo demostró que la abundancia de miRNAs en sinapsis es variada, siendo el Hp la región que más porcentaje de miRNAs tuvo en SN (99%) y el Bs la que menos tuvo (76%).

Fue interesante encontrar que los niveles de enriquecimiento relativo en SN difícilmente rebasó el doble de abundancia encontrada en las fracciones totales, a diferencia de otros estudios en donde se reportan niveles de expresión de hasta 4 veces. Algunos casos notables se encontraron en SHp y SOB donde 19 y 2 miRNAs respectivamente tuvieron un enriquecimiento 2 veces, pero en todos los casos los niveles de fluorescencia absoluta fueron muy bajos por lo que es posible que haya habido un efecto de sobrevaloración.

Como se mencionó anteriormente, algunos pre-miRNAs dan origen a dos miRNAs maduros, uno en la cadena líder y otro en la pasajera, sobre todo cuando presentan valores de  $\Delta G$  parecidos en ambos extremos del dúplex, equiparando las probabilidades de cargarse en un RISC maduro. Estos eventos los analizamos mediante microarreglo para aquellos pares de miRNAs con origen simultáneo y encontramos que el procesamiento de cada hebra también resultó variable en cada tejido (Fig. 5.2.3).



**Figura 5.2.1. Expresión Diferencial de microRNAs Originados del Mismo Precursor.** Los valores normalizados de fluorescencia observados para cada miRNA fueron graficados logarítmicamente ( $\text{Log}_{10}$ ) de acuerdo con cada tejido. Los nombres que aparecen en el eje de "X" corresponden al miRNA parental. Así, la secuencia pasajera de let-7d se llama let-7d\* o bien en el caso de miR-324-3p su secuencia hermana es miR-324-5p. Ver tabla 9 para más información. Los espacios en blanco indican nula expresión.

El miRNA miR-129\* mostró una expresión mayor que su contraparte miR-129, lo que nos sugirió que tal vez el procesamiento de pre-miRNAs en diferentes áreas del SNC también pudiera ser distinto. Por ello decidimos inspeccionar la expresión de distintas secuencias líder (miRNAs) y secuencias estrella (pasajeras o complementarias).

Observamos que la abundancia relativa (líder/estrella) fue distinta en cada región analizada, lo que confirmó la hipótesis del procesamiento variable así como reportes previos de la literatura. En diversos casos, la expresión de la secuencia estrella fue mayor que la de su contraparte. Estos miRNAs se procesan a partir del mismo precursor y cada hebra se ha clonado por separado, por lo cual es probable que también tengan una función efectora sobre mRNAs con secuencias complementarias a su región semilla. Aunque varias de estas secuencias fueron detectadas, la expresión de la mayoría estuvo dentro de los límites de detección, por lo que se consideraron como buenas. Ver *Tabla 11*.

Hebra		Fracción									
Líder	Estrella	Ob	SOB	Cx	SCx	Hp	SHp	Cb	SCb	Bs	SBs
let-7d	let-7d*	979.2	96.4	138.0	186.6	8011.6	906.4	1517.6	4227.2	2623.4	66858.6
miR-126	miR-126*	30.3	215.1	17.8	88.8	46.8	177.1	66.8	42.7	309.4	36.0
miR-129	miR-129*	0.3	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2
miR-140	miR-140*	0.3	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.2	ND	0.1	0.1
miR-151	miR-151*	ND	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
miR-181a	miR-181a*	236.7	3082.3	632.4	233.6	392.1	72.3	2019.8	1072.4	292.8	5283.5
miR-20a	miR-20a*	373.2	39.8	127.2	97.8	29.0	1.0	1.0	1.0	79.0	1.0
miR-22	miR-22*	82.0	26.1	33.2	46.1	30.2	16.5	131.5	1004.5	68.1	2045.0
miR-29c	miR-29c*	17.5	8.4	10.0	8.6	17.0	3.4	9.2	4.9	8.6	42.9
miR-30a-3p	miR-30a-5p	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	ND
miR-324-3p	miR-324-5p	1.6	7.6	1.4	18.4	3.2	5.7	3.6	534.7	2.4	87.2
miR-376b	miR-376b*	31.0	81.0	5.9	9.6	21.9	8.2	4.0	45.7	5.7	47.4
miR-382	miR-382*	214.4	168.8	90.6	39.2	318.6	709.8	508.1	390.9	910.0	419.0
miR-7	miR-7*	172.4	2.6	34.5	85.8	294.4	25.0	0.0	0.0	1.0	1.0

**Tabla 11. Expresión de Secuencias Líder y Pasajeras (\*) de microRNAs Medidos por Microarreglo.** Los números expresan el cociente de la intensidad de fluorescencia normalizada líder/estrella para cada tejido. ND, no detectado.

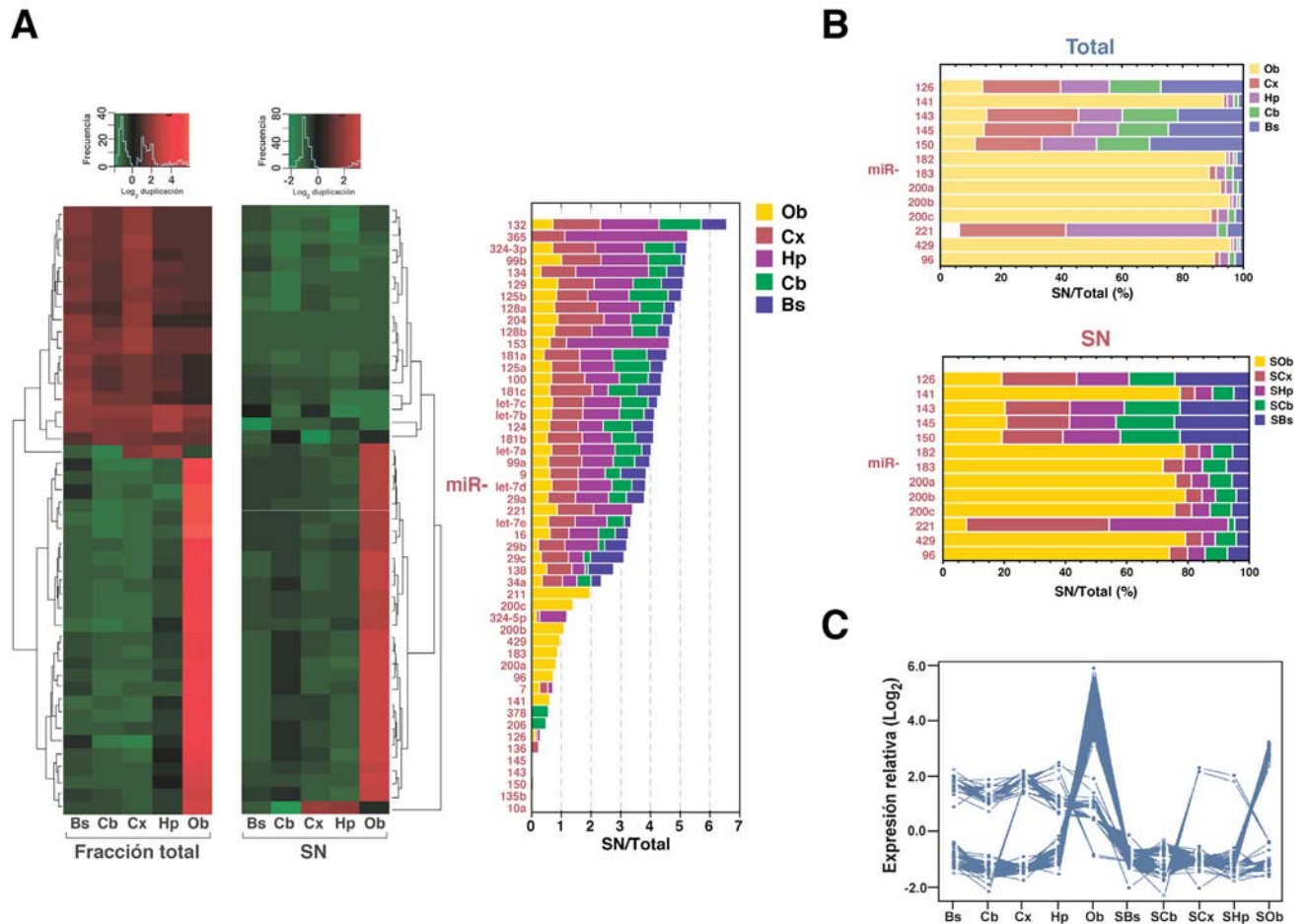
Con este ensayo concluimos que el procesamiento de los pre-miRNAs no sólo variaba entre tejidos sino que también había diferencias importantes entre fracciones subcelulares (Total vs. SN) lo que indica que existe una actividad diferencial de Dicer que es localizada.

Notablemente la abundancia de cada hebra fue también variable en SN lo que sugiere que el procesamiento y/o la tasa de decaimiento también son diferentes en las sinapsis. Esto implica la presencia de un mecanismo de procesamiento independiente que opera localmente.

Las variaciones de expresión de miRNAs entre todas las regiones se visualizaron mejor en el mapa de calor (heatmap) de la Fig. 5.2.4A, en donde las muestras se clasificaron por agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*)

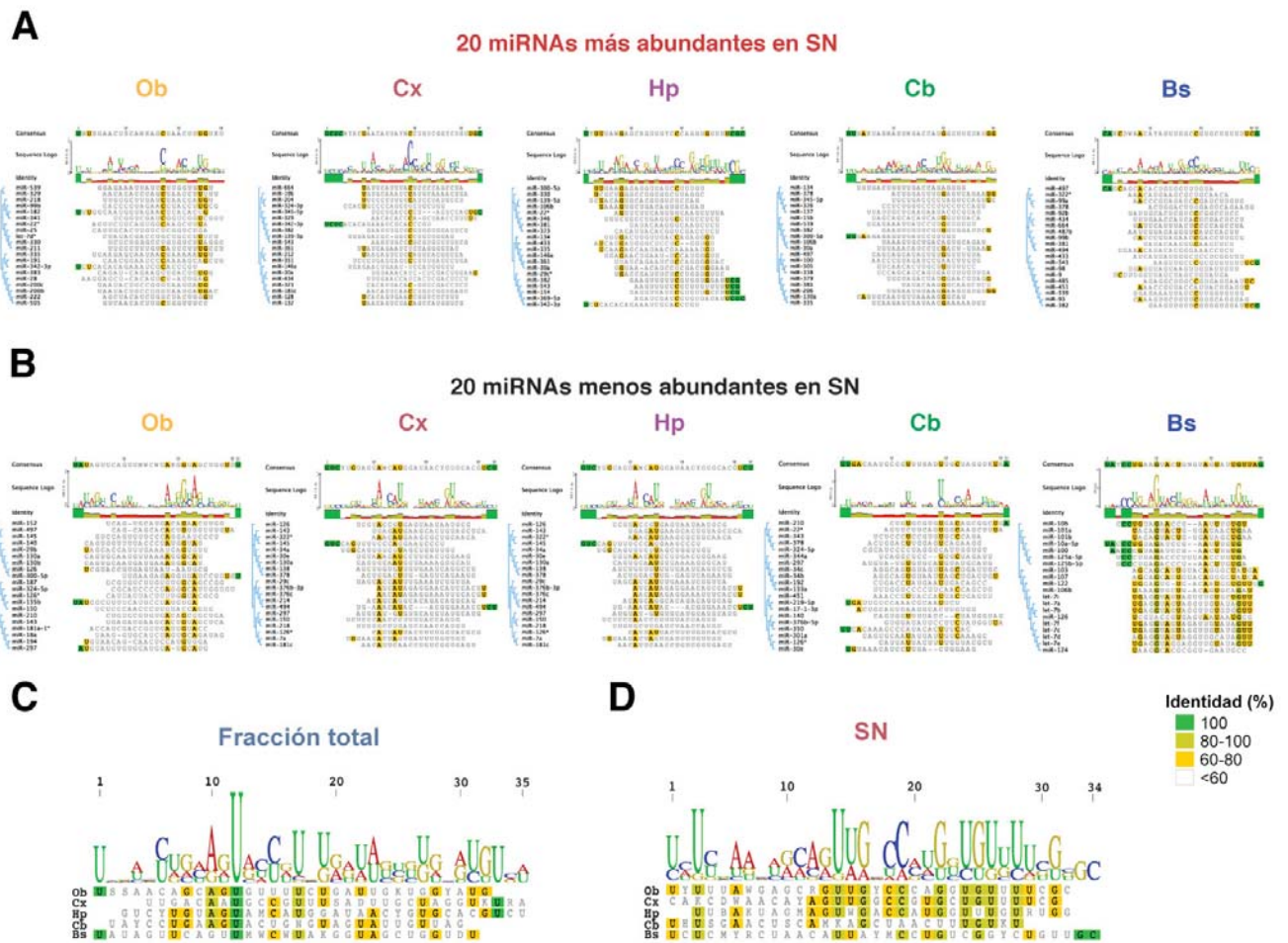
El análisis de MAANOVA registró 13 miRNAs con expresión conservada entre todas las muestras (incluyendo el homogenado total y los SN). Éste incluyó a miR-126, miR-143, miR-145 y miR-150 como aquéllos que mostraron la menor expresión en SN, semejante al estudio anterior. Por otro lado los miRNAs de la familia de miR-200 fueron los que mostraron la expresión más robusta y exclusiva en Ob (Fig. 5.2.4B). A esta familia se le ha asociado previamente con la maduración de precursores neuronales en este órgano. Notablemente estos miRNAs también se encontraron ampliamente expresados en la fracción SN (SOB).





**Figura 5.2.4. Identificación por MAANOVA de microRNAs Diferencialmente Expresados en SN de Cinco Áreas del Cerebro.** (A) Heatmap de miRNAs diferencialmente expresados en las cinco regiones del cerebro analizadas, por fracción total y por SN. Verde indica baja expresión, Negro, igualdad de expresión entre regiones y Rojo refiere sobreexpresión. Los valores SN/Total mostrados en el panel derecho corresponden a 64 miRNAs arbitrariamente seleccionados por sus niveles de expresión en SN. El 100% corresponde a la suma de los valores relativos PS/T de todas las regiones. (B) MiRNAs seleccionados por MAANOVA que mostraron los niveles de expresión más conservados entre regiones analizadas ( $P \leq 0.1$  para estadístico F1 y F3 después de *bootstrapping*). Nótese que este método seleccionó básicamente a los miRNAs del Ob por su expresión robusta y específica. (C) El análisis de residuos mínimos permitió agrupar mediante *k-means* a 7 grupos de expresión, que se muestran condensados en este panel.

Para responder a la pregunta si los miRNAs que se localizaron en SN tenían un patrón distinguible en su secuencia madura, seleccionamos los 20 candidatos con mayor y menos expresión por tejido (Fig. 5.2.5 y Tabla Suplementaria 4). Cada juego de miRNAs fue alineado mediante ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y la secuencia consenso resultante fue transformada a un logoplot (Geneious v5.3.4<sup>206, 207</sup>). De esta forma no fue posible identificar un motivo de localización sináptica o uno de retención en soma que fuese único en cada una de las regiones del cerebro. Ello sugiere que el proceso de selección hacia dendritas es más bien heterogéneo y no depende de la secuencia del miRNA *per se*.



**Figura 5.2.5. Secuencia Consenso Basada en 20 microRNAs con la MAYOR y MENOR Expresión en SN por Región Neuroanatómica. (A)** miRNAs con mayor expresión en SN por región **(B)** miRNAs con menor expresión en SN. **(C)** y **(D)** Alineamiento de las secuencias consenso calculadas para cada región por fracción. Ver texto para detalles.

Interesantemente, 19 de los 68 miRNAs más expresados en SN de todas las regiones (*Top-20*), demostraron estar involucrados en 10 de 17 enfermedades neurológicas asociadas a algún miRNA. Algunos de ellos han sido hallados como agentes etiológicos, (e.g. enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, Desorden Agudo de Ansiedad, Esquizofrenia, Síndrome de Down, etc.). Ver *Tabla 12*.

miRNA	Enfermedad	SN	Expresión	mRNA Blanco	Referencia	Id (%)
miR-106b-5p	AD / Au / Schiz	Hp / Cb	↓ / ↓ / †	Amyloid Precursor Protein (APP) / ?? / ??	Hébert et al. / Abu-Eineel et al. / PERKins et al.	100
miR-128-1-5p	Anx / HD/ Prion	Cx / Cx / Cx	Normal; SNP / ↓ / †	NTRK3? / p250GAP / ??	Muinos-Gimeno et al. / Lee et al. & Johnson et al. / Saba et al.	100
miR-132-3p	HD / Au	Cx	↓ / ↓	p250GAP / p250GAP	Johnson et al. / Abu-Eineel et al.	100
miR-139-5p	Prion	Hp	↑	??	Saba et al.	100
miR-182-5p	Dep	Ob	†; pre-miR-182 SNP	ADCY6, CLOCK, DSIP	Saus et al.	95.8
miR-146a-5p	AD / Prion	Cx / Hp	↑ / †	Complement Factor H (inflammation)	Lukiw et al. / Pogue et al.	100
miR-15b-5p	Au / Schiz	Cb	↑ / †	?? / ??	Abu-Eineel et al. / Beveridge et al.	100
miR-206	Schiz	Cb	Normal; SNPs Nordic	Fstl1, GJA1, Utrn	Hansen T et al.	100
miR-212-3p	Au / Schiz / Coca / Anx	Cx	↑ / ↓ / ↓ / ↓	?? / ?? / ?? / CREB en Coca?	Abu-Eineel et al. / PERKins et al. / Hollander et al. & Im et al. / Uchida et al.	100

miRNA	Enfermedad	SN	Expresión	mRNA Blanco	Referencia	Id (%)
miR-30a-5p	Schiz	Cx / Hp / Cb	↓	??	PERKins et al.	100
miR-342-3p	Prion	Ob / Cx / Hp	↑ / ↑ / ↑	??	Montag et al.	100
miR-346	Schiz	Hp	↓	??	Zhu et al.	87
miR-381-3p	Au	Hp / Cb / Bs	↓	??	Abu-Eineel et al.	100
miR-433	PD	Hp / Bs	Normal; SNP	FGF20	Wang et al.	100
miR-485	Anx	Bs	Normal; SNP	NTRK3?	Muinos-Gimeno et al.	100
miR-539-3p	Au	Ob / Cb / Bs	↓	??	Abu-Eineel et al.	90
miR-9	HD / Schiz / Anx	Bs	↓ / ↓ / ↑	REST-CoREST Dependiente / ?? / ??	Packer et al. / PERKins et al. / Rinaldi et al.	100
miR-93-5p	Au	Bs	↓	??	Abu-Eineel et al.	100
miR-99a-5p	DS	Bs	↑	??	Kuhn et al.	100

**Tabla 12. microRNAs Sinápticos (Top-20) Asociados a Patologías Neurológicas.** Cada cuadro clínico indicado tuvo al menos un microRNA causal o correlacionado con su etiología, la mayoría derivada de estudios epidemiológicos en humanos o bien en algunos modelos animales. En la columna "SN" se indican los tejidos en donde se identificó enriquecimiento sináptico. En la columna de "Expresión" se indica cuál es la alteración de expresión observada en cada cuadro clínico (↑ aumento de expresión; ↓ expresión disminuida vs. casos control). Cuando el microRNA alterado tiene un correlato etiológico, se indican los genes afectados demostrados. Id, porcentaje de identidad entre la secuencia de humano y rata. Cada enfermedad, tejido, gen y referencia mostrados se separaron con diagonales (/) y el orden correspondiente es el mismo de izquierda a derecha. Anx, Desorden Agudo de Ansiedad; Au, Desorden del Espectro Autístico; Coca, Adicción a la Cocaína; Dep, Desorden Mayor de Depresión; DS, Síndrome de Down; HD, Enfermedad de Huntington; PD, Enfermedad de Parkinson; Prion, Síndrome de Creutzfeldt-Jakob; Schiz, Esquizofrenia; ??, desconocido. Datos obtenidos del sitio <http://www.mir2disease.org/> y de O'Connor RM et al. <sup>259</sup>

Basado en lo anterior, es posible que si la localización sináptica de estos miRNAs resulta fundamental para su función, entonces las alteraciones en los niveles de expresión observados en cada condición clínica pueden ser críticas para que éstas aparezcan o se consoliden. Interesantemente, el común denominador de varias de estas enfermedades es la hipersensibilidad sináptica presente en algunas de las terminales como en el autismo o la esquizofrenia, tal vez debida a la falta de modulación de la dosis proteica causada por alteraciones en la función de los miRNAs.

Sin embargo, ¿es posible que todos los miRNAs presentes en SN tengan blancos sinápticos aún cuando no estén relacionados con algún desorden neurológico? Para contestar esta pregunta decidimos realizar dos análisis de minería de datos. Por una parte extrajimos un lista de los mensajeros blanco predichos por el algoritmo microCosm<sup>208-210</sup>, que se busca secuencias complementarias a la región semilla de los miRNAs en SN (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>). Este procedimiento arrojó una lista de más de 1, 300 candidatos para todas las regiones del cerebro.

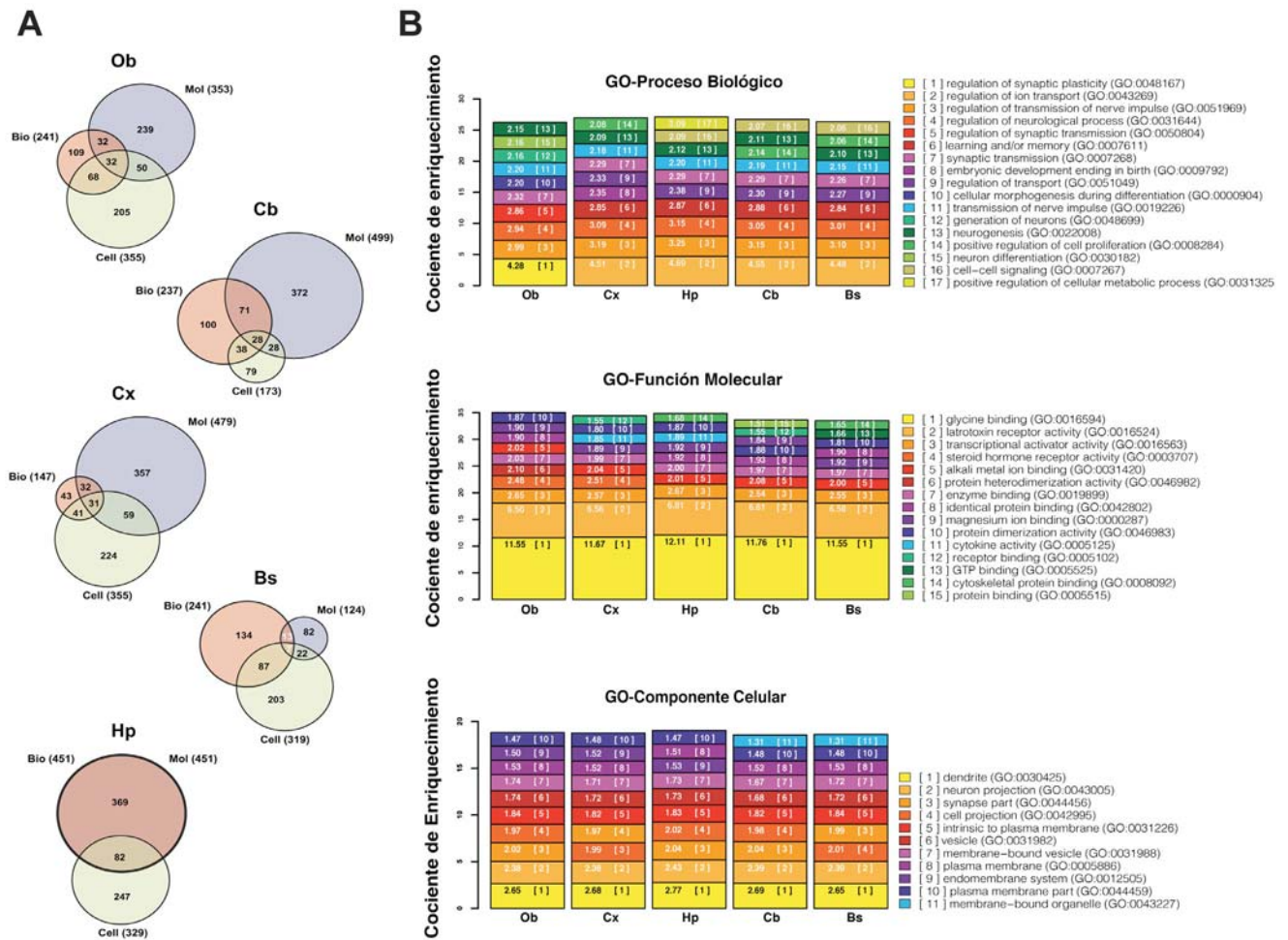
Posteriormente seleccionamos aquéllos mensajeros cuya función biológica ya está catalogada en términos de GO (Gene Ontology). Este identificador permite clasificar a todos los genes de acuerdo con tres categorías: Proceso Biológico (BP), Componente Celular (CC) y Función Molecular (MF). Cada una de éstas tiene subniveles de clasificación y su profundidad implica mayor especificidad.

De esta forma, filtrando el número de genes blanco identificados previamente, la lista disminuyó a cerca de 1, 000, cuyos números GO ya estaban "curados" para la versión del genoma de rata que se usó (RGSC v3.4 68.34).

Posteriormente utilizamos el algoritmo FatIGO+<sup>211</sup> (<http://bioinfo.cipf.es/babelomicswiki/tool:fatigo>), cuya función es comparar la representatividad de genes de la lista en cuestión, en términos de GO para cada categoría, contra la lista del genoma completo. Así, si en la nuestra hay genes que frecuentemente se asocian con una categoría, entonces se calcula la probabilidad de que esto no se deba al azar mediante una prueba exacta de Fisher, con valores *P* corregidos por el método de FDR (*false discovery rate*). Así, mientras más profundo y específico sea el "enriquecimiento" hallado en una categoría de GO, más validez se obtiene.

De esta forma se seleccionaron cerca de 700 genes con una profundidad de 3 a 8 niveles de GO para cada área del cerebro analizada, cuyo valor  $P$  ajustado  $\leq 0.005$  en cada categoría (Fig. 5.2.6A).

En su gran mayoría estos genes blanco se encontraron enriquecidos en categorías asociadas clásicamente a procesos neuronales y de función sináptica (Fig. 5.2.6B), con lo que se infiere que los miRNAs hallados en las fracciones SN muy probablemente estén regulando blancos localizados *in situ* que además codifican para realizar funciones o construir componentes críticos para la sinapsis.

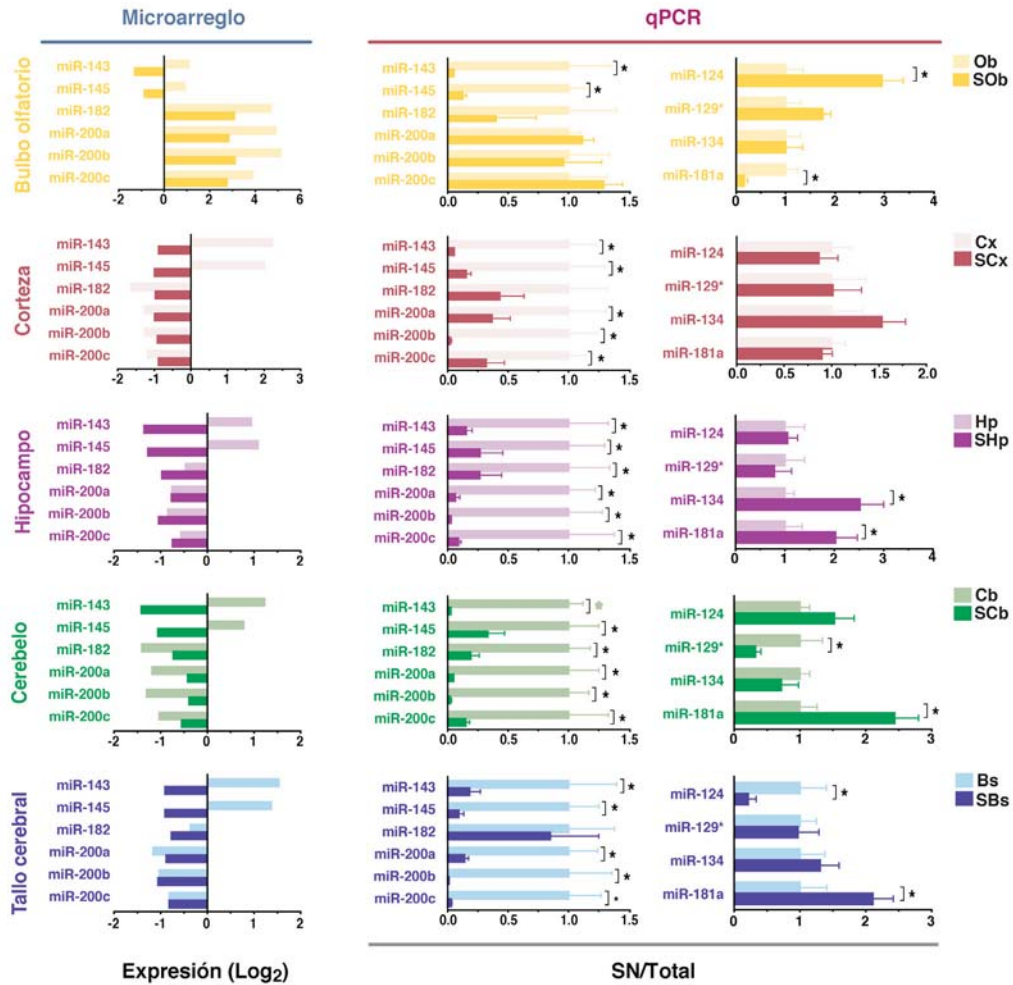


**Figura 5.2.6. Análisis de Representatividad de Categorías de Gene Ontology (GO) para mRNAs Blanco Predichos para microRNAs Sinápticos.** (A) Los genes agrupados por categoría GO en diagramas de Venn (Proceso Biológico, naranja; Componente Celular, verde; Función Molecular, azul) de acuerdo con el algoritmo FatiGO. Las intersecciones representan genes compartidos entre las distintas categorías. (B) Los valores individuales para cada nivel por categoría GO representan el enriquecimiento de encontrar dicha asignación con respecto al resto del genoma. Éstos se calcularon como el porcentaje acumulado de los mRNAs blancos predichos para los miRNAs sinápticos dividido por el porcentaje correspondiente al que se encuentra en el resto del genoma de rata. Nótese que las funciones y estructuras asociadas a estos genes son asociadas a la función neuronal y sináptica.



### 5.3 Validación por qRT-PCR.

Para corroborar estos hallazgos utilizamos dos aproximaciones, la de qRT-PCR y después la de NB. El método de ampliación fue el de NCode. Así, el primer análisis mostró una alta correlación entre las dos metodologías para varios candidatos, entre los que se escogieron aquéllos derivados del análisis de MAANOVA, especialmente los de la familia de miR-200 (Fig. 5.3.1).



**Figura 5.3.1. Validación de Datos de Microarreglo por qRT-PCR de microRNAs Expresados por Región del Cerebro.** Valores de expresión normalizados de acuerdo con MAANOVA, graficados en escala logarítmica ( $\text{Log}_2$ ). Los miRNAs con alta expresión en Ob y SOb fueron consistentemente disminuidos en los otros tejidos. (panel izquierdo). Valores de cociente SN/Total que fueron determinados qRT-PCR con el método de NCode de miRNAs seleccionados por MAANOVA (panel central) y de aquéllos excluidos de dicho análisis (panel derecho). Las barras representan los valores Ct promedio de 3 a 6 animales medidos por duplicado  $\pm$  SD. La significancia fue calculada mediante una prueba de t de Student de dos colas para pruebas pareadas (asteriscos;  $P \leq 0.05$ ). Note que las barras no representan expresión absoluta.

Adicionalmente, medimos la expresión de miRNAs que no estaban incluidos en la lista de miRNAs significativos, seleccionados por MAANOVA, entre ellos a miR-124a, miR-129\*, miR-134 y miR-181a. El primero corresponde al miRNA de cerebro que posee la mayor expresión en todos los tejidos analizados (Ver *Tabla Suplementaria 4* en el Apéndice II), el segundo se investigó porque corresponde a una secuencia estrella, complementaria a un miRNA conocido en otras líneas celulares; miR-134 corresponde al primer miRNA de localización dendrítica reportado en la literatura y miR-181a también resultó ampliamente expresado en la fracción SN.

Estos experimentos demostraron una correlación positiva entre los resultados de microarreglo y los de qRT-PCR, aún cuando se utilizaron RNAs de diferentes animales

Por su parte la medición de varios miRNAs, seleccionados por MAANOVA o no, fueron concomitantes con los observados en el ensayo de microarreglo, lo que confirma las observaciones previas (*Fig. 6.2.4*).

Con este ensayo se observó que miR-134 y miR-181a están enriquecidos en SN en el hipocampo. miR-181a también estuvo enriquecido en los SN de cerebelo y de tallo cerebral. Contrariamente, miR-129\* y miR-124a mostraron una expresión reducida en la misma fracción en el cerebelo y en el tallo cerebral. En todos los demás casos los niveles de expresión fueron indistinguibles, de tal forma que es muy probable que tales miRNAs estén presentes en la cercanía de las sinapsis normalmente.

El miRNA miR-134 tuvo una expresión apenas detectable, ya sea por microarreglo o qRT-PCR, a pesar de que ya ha sido reportado como de localización dendrítica, localizado en SN de rata (Sprague-Dawley y la línea celular de neuroblastoma P19) y también en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata (E18). Aunque no se descarta la variabilidad que pueda existir entre las cepas utilizadas (LE vs. SD) y la edad de los animales, no fuimos capaces de detectarlo en alta abundancia en nuestra preparación SN como se esperaba. Sin embargo, solamente el ensayo de qRT-PCR permitió determinar que este miRNA tuvo una mayor expresión en la fracción SN del hipocampo, aunque solamente apenas por encima del nivel de ruido.

Estos datos demuestran que los miRNAs son componentes sinápticos pero que su distribución somato-dendrítica no es homogénea a través de distintas áreas del SNC. El número y abundancia relativa en SN de los miRNAs es dependiente del tejido en donde éstos se originen, lo cual sugiere que participan en la diferenciación funcional de cada área. Además, el procesamiento de los pre-miRNAs que dan origen a dos secuencias maduras a partir de un mismo precursor, tampoco son homogéneas, mucho menos entre la fracción total y SN, lo que sugiere la operación de dos posibles mecanismos de localización de los miRNAs maduros en la sinapsis.

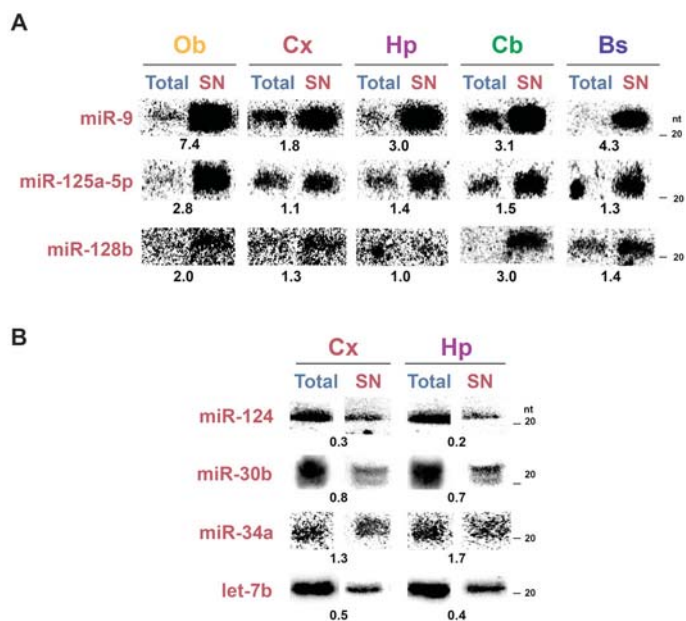
## 5.4 Validación por Northern blot II.

Como se hizo notar por uno de los revisores del artículo asociado a esta tesis, es posible que los cambios de expresión de los miRNAs hallados en cada tejido, en parte se debieran a las diferencias de procesamiento intrínsecas a la actividad de Dicer sobre sus precursores. Por ello decidimos evaluar la abundancia de algunos miRNAs mediante NB para de distinguirlos.

Medimos la expresión de 7 miRNAs que clasificamos dentro de una de las tres poblaciones basadas en el enriquecimiento relativo mostradas en el primer estudio, de los cuales 3 miRNAs fueron analizados en 5 regiones del cerebro y otros 4 fueron evaluados únicamente en Cx y Hp.

Aunque en la mayor parte de los casos hubo una correlación positiva con los datos obtenidos con los otros métodos, sólo miR-9 mostró un sobre-enriquecimiento de 7.4 y 4.3 veces en SOB y SBs, respectivamente, mismo que no habíamos observado antes (*Fig. 5.4.1*).

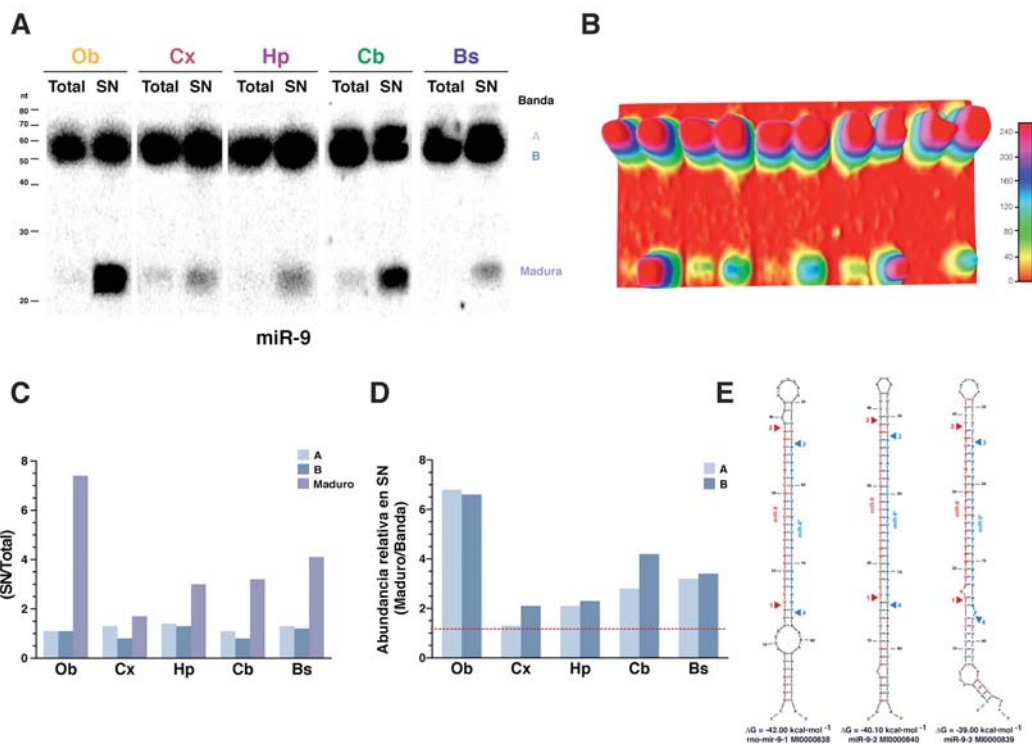




**Figura 5.4.1. NB de miRNAs en Fracciones Total y de SN de Cinco Regiones Neuroanatómicas.**

Se cargaron 0.5-1 µg de RNA total (< 200 nt), de muestras mezcladas de 3 animales, con una masa idéntica para cada muestra por gel. Las membranas fueron hibridadas (37-40 °C) con 50 nmol de (A) LNAs como sondas marcadas con <sup>32</sup>P (miR-9, miR-125a-5p y miR-150) o de (B) DNA (let-7b, miR-30, miR-34b, miR-124 y miR-128b), que hibridan con la secuencia madura de cada miRNA. El cociente (SN/Total) mostró una correlación positiva con los métodos mostrados anteriormente, excepto para miR-9 (ver texto para detalles).

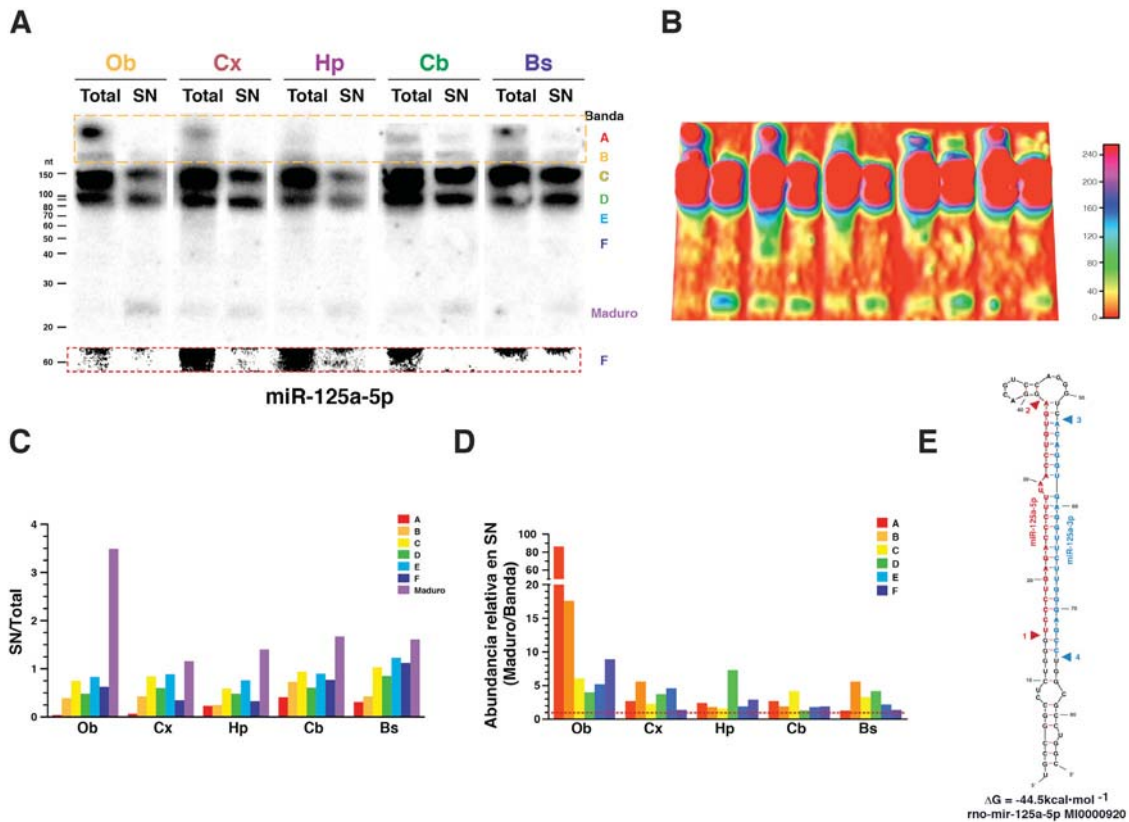
Lo más notorio fue la abundancia de dos bandas ~50-70 nt, que presumiblemente corresponden a los precursores (Fig. 5.4.2), también sobrepasaba los niveles del miRNA maduro tanto en la fracción total como en SN en todos los tejidos.



**Figura 5.4.2. NB de miR-9 en las fracciones total y SN de 5 regiones neuroanatómicas.** (A) Autorradiografía de membrana completa del NB de miR-9. (B) Densitometría del mismo NB analizado mediante ImageJ. La intensidad en rojo asociada al volumen representan son relaciones directas de la densidad de píxeles medida en el autorradiograma. (C) Expresión relativa (SN/Total) para cada banda, incluida la secuencia de 23 nt. (D) Relación de procesamiento calculada como la intensidad de píxeles medida para el miRNA maduro entre la correspondiente a cada banda del precursor. (E) Estructura secundaria del precursor de miR-9 para 3 parálogos existentes en rata, (de izquierda a derecha, mir-9-1, mir-9-2 y mir-9-3. Se indica en rojo la secuencia del miRNA maduro y en azul la pasajera. Los triángulos indican los probable sitios de corte por Dicer.

Esto demuestra que los precursores de este miRNA están siendo activamente transportados hacia las terminales post-sinápticas.

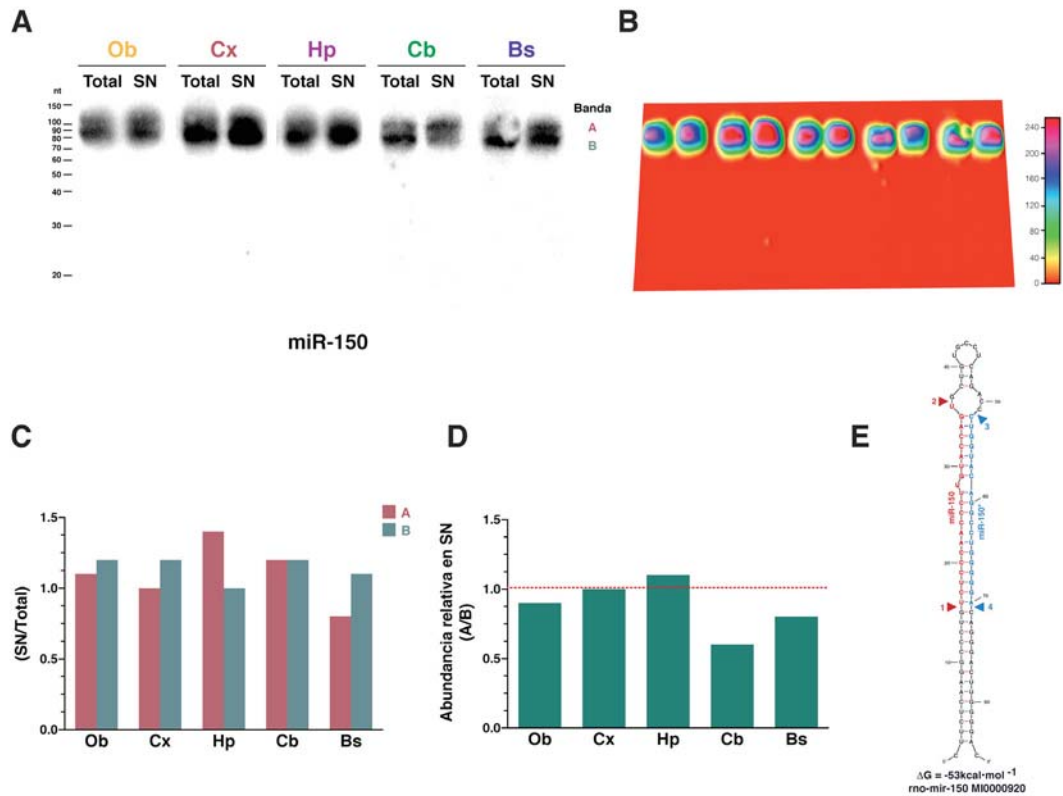
Un caso similar fue observado para miR-125a, en donde se identificaron 6 bandas con un tamaño entre 23-200 nt aproximadamente (Fig. 5.4.3).



**Figura 5.4.3. NB de miR-125a en las Fracciones Total y SN de 5 Regiones Neuroanatómicas.** (A) Autorradiografía de membrana completa del NB de miR-125a. En el recuadro punteado en rojo se muestra una porción del autorradiograma donde se aumentó el contraste y brillo de la banda F para mejor apreciación. (B) Densito-volumetría del mismo NB analizado mediante ImageJ (NIH) donde se identifican mejor cada una de las bandas. (C) Expresión relativa (SN/Total) para cada banda, incluida la secuencia madura. (D) Relación de procesamiento calculada como la intensidad de píxeles medida para el miRNA maduro entre la correspondiente a cada banda del precursor. (E) Estructura secundaria del precursor de miR-125a-5p de rata, predicha por Mfold. Se indica en rojo la secuencia del miRNA maduro y en azul la de miR-125a-3p. Los triángulos indican los probables sitios de corte por Dicer

En el caso de miR-150 no pudimos observar la banda del miRNA maduro con esta metodología. Se observaron dos bandas entre 80-100 nt cuya abundancia fue similar en todos los tejidos analizados. La tasa de procesamiento medida por la división de los valores de densitometría entre ambas bandas fue similar en todas las muestras con excepción del Cb, en donde se halló un 40% menor abundancia para la banda A (Fig. 5.4.3).

En conclusión, las diferencias de expresión halladas con los métodos anteriores entre las diferentes regiones del cerebro analizadas fueron correspondientes, con algunas excepciones, cuando se compara la expresión de los miRNAs maduros, como fue el caso de miR-9.



**Figura 5.4.4. NB de miR-150 en las Fracciones Total y SN de 5 Regiones Neuroanatómicas.** (A) Autorradiografía de membrana completa del NB de miR-150. (B) Densito-volumetría del mismo NB analizado mediante ImageJ (NIH). (C) Expresión relativa (SN/Total) para cada banda, incluida la secuencia madura. (D) Relación de procesamiento calculada como la intensidad de píxeles medida para el miRNA maduro entre la correspondiente a cada precursor. (E) Estructura secundaria del precursor de miR-150 de rata, predicha por Mfold. Se indica en rojo la secuencia del miRNA maduro y en azul la de miR-150\*. Los triángulos indican los probables sitios de corte por Dicer.

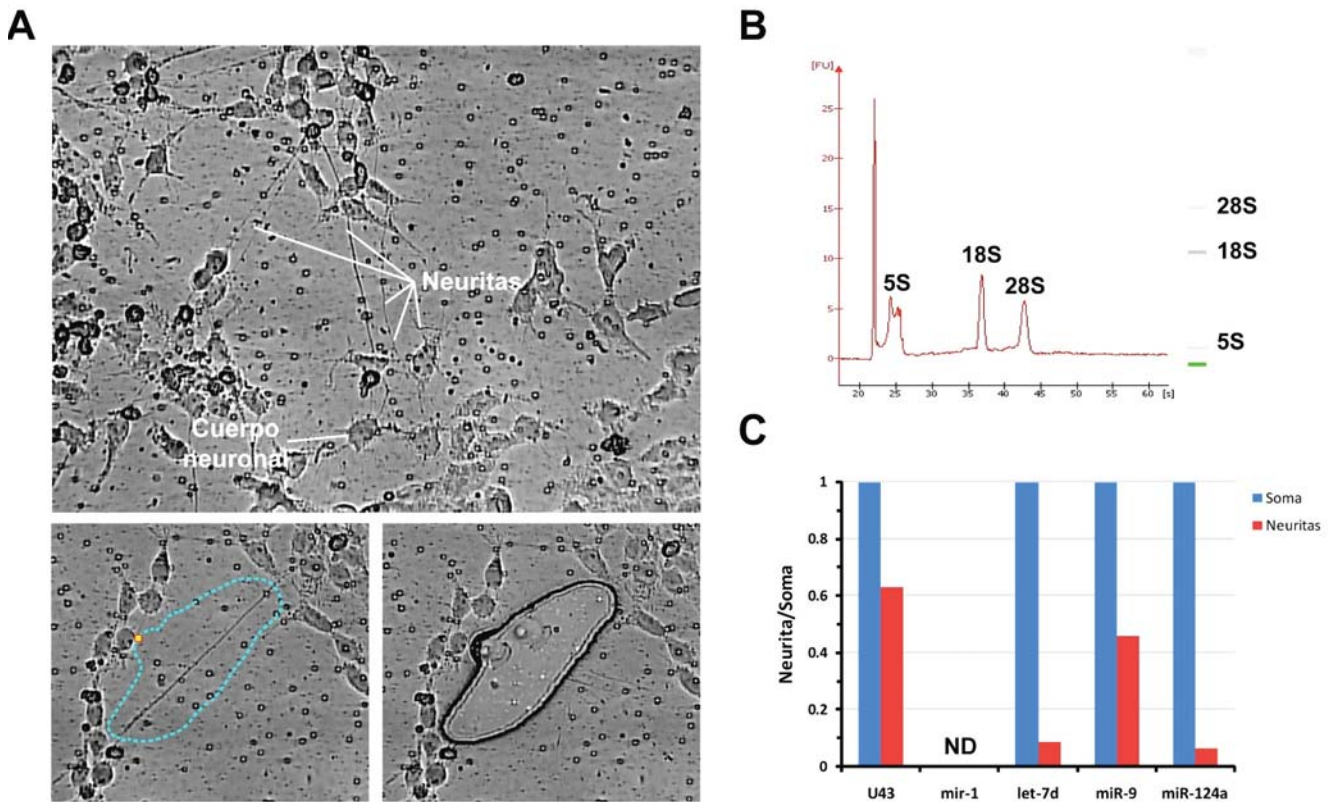
El análisis de NB permitió identificar no solamente que para algunos miRNAs enriquecidos o no en SN, a fragmentos de RNA que probablemente correspondan a los pre-miRNAs, un hallazgo que confirma estudios anteriores sobre la actividad de Dicer en este tipo de fracciones. Adicionalmente, la observación de un número alto de bandas para miR-125a sugiere que el procesamiento sináptico debe ser alto y tal vez involucre un mayor número de pasos que los ya conocidos.

Finalmente, las diferencias observables entre los métodos, en parte se deban a las diferencias intrínsecas de detección, especialmente en el tema de sensibilidad, que en el NB es hasta 10, 000 veces menor que para qRT-PCR.

## 5.5 Análisis de Expresión de microRNA Sinápticos en Dendritas Microdisecadas por Láser (LCMD).

Durante la etapa en la que se realizaban los experimentos de microarreglo, había sido publicado un reporte acerca de la detección de miRNAs en dendritas de neuronas hipocampales de rata<sup>176</sup> (18 DIV –días *in vitro*-), por lo que decidimos probar si algunos de los miRNAs detectados en fracciones SN podían expresarse en un sistema de neuronas diferenciadas en ausencia del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), a partir de células madre immortalizadas, derivadas de la región subcortical de embrión E14.5 de rata<sup>212</sup>, que mostraron una morfología poligonal estrellada (Fig. 5.5.1A).

En este experimento se disecaron 30 neuritas (procesos membranales radiativos que se extruyen desde el cuerpo celular) de neuronas diferenciadas (cultivadas en medio privado de FGF por 5 DIV) que se emplazaron sobre una matriz de plástica bañada con laminina. Previo a la microdissección, las células fueron fijadas mediante baños secuenciales de metanol:etanol y congeladas a -70 °C por una noche. Importantemente, éstas fueron mantenidas secas todo el tiempo para evitar la activación de RNAsas endógenas por hidratación con agua de condensación.



**Figura 5.5.1. Expresión de miRNAs Determinada por qRT-PCR en 30 Dendritas Microdisseccionadas por Láser (LCMD).** (A) Morfología de precursores neuronales de 6DIV (L2.2 derivadas de la corteza de rata E14.5), diferenciados en ausencia de FGF. Nótese que las extensiones membranales (neuritas) se dirigen hacia blancos en otras neuronas, probablemente estableciendo sinapsis. El cuerpo neuronal mantiene una forma estrellada poligonal característica (arriba). Fotografía de un cultivo de L2.2 diferenciadas en donde se ha seleccionado un área alrededor de una neurita aislada (línea punteada) antes de ser disecada por el láser (abajo izquierda) y después de catapultar la muestra (abajo derecha). (B) Análisis de la integridad del RNA obtenido de estas células mediante electroforesis microcapilar en chip (RNA picochips, Agilent) usando una masa  $\leq 5$  ng de RNA total. (C) qRT-PCR con el método de Taqman® de miRNAs detectados en el soma celular (barras azules) y en 30 dendritas (barras rojas). El cDNA se sometió a una ronda de pre-amplificación por 15 ciclos. Se graficó el dCt ( $2^{-\Delta Ct(Neurita)-Ct(Soma)}$ ). En estas células se halló una elevada concentración de snRNA U43 en las neuritas seccionadas. Note que el miRNA más abundante en las neuritas fue miR-9. ND, no detectado.

La disección consistió en la proyección de pulsos de láser infrarrojo (2 W) dirigido con un micromanipulador, capaz de seccionar fragmentos celulares ad libitum. Una vez cortados, los procesos celulares son expulsados hacia una resina adhesiva libre de RNasas, mediante un pulso potenciado pero momentáneo (1 ns) del mismo láser. Una vez capturada la muestra, se le añade Trizol para extraer el RNA y amplificarlo mediante qRT-PCR. El RNA obtenido, previamente se analizó por electroforesis en chip (Agilent), se usó como molde para una ronda de pre-amplificación (14 ciclos con el kit PreAmp, ABI) y otra de amplificación (40 ciclos) utilizando el método de Taqman (ABI).

De este modo observamos que la abundancia de los rRNAs en estos procesos celulares es ciertamente más baja, basado en la densidad de los picos de los rRNAs 28S y 18S. Por otro lado se determinó que miR-9 también se expresa con relativa abundancia en las dendritas aisladas, al menos en un 45% de abundancia como la medida en los cuerpos neuronales por separado (Fig. 5.5.1C). Curiosamente let-7d, previamente observado enriquecido en sinapsis, aquí mostró niveles de expresión muy bajos.

Con estos datos, se confirmó que no sólo las neuronas en la rata adulta localizan a los miRNAs lejos del soma celular, en dirección de los contactos sinápticos, sino también en células cultivadas derivadas de la corteza de un embrión de rata E14.5. Sin embargo, es interesante que el snRNA U43 también fuera detectado con un nivel de expresión en neuritas por arriba del 60% del observado en el soma, lo que abre la discusión acerca de su papel en el nucléolo solamente.

## 5.6 Discusión.

### Expresión de microRNAs en Cerebro Completo

La finalidad de explorar el cerebro completo era para establecer una referencia general de miRNAs sinápticos, desde la cual se comparara la expresión de otras estructuras. Uno de los hallazgos más notables fue encontrar miRNAs abundantes en SN (e. g., let-7c, miR-128, miR-125b) y otros claramente ausentes (e. g., miR-143, miR-145, miR-150). Además se mostró que su expresión local no depende de difusión simple dado que algunos miRNAs muy abundantes en soma (contenida en la fracción total) no fueron los más enriquecidos en SN.

La lista de los miRNAs dendríticos identificados aquí es similar a la que han publicado Lugli et al.<sup>14</sup>, Kye et al.<sup>176</sup>, y parcialmente semejante a la de Siegel et al.<sup>15</sup> Existen algunos casos divergentes como miR-135, miR-183, miR-211, miR-292-5p y miR-296 que no pudimos detectar en nuestras muestras, incluyendo la fracción total, pero que sí se han encontrado en dendritas de neuronas de cultivo primario. Es factible que estos y otros miRNAs que se expresan en muy baja concentración en el cerebro adulto hallan sido eliminados de nuestra lista, dada la alta astringencia con la que seleccionamos estos miRNAs, o bien, que dichas diferencias se derivan de las variaciones propias de cada modelo biológico usado, por ejemplo la edad de los animales, la cepa, el tejido disecado, etc. Mientras que estos autores usaron corteza frontal nosotros usamos el cerebro completo (sin Ob ni Cb).

No creemos que esto suponga una purificación subóptima de los SN, tomando en cuenta los experimentos reportados en el cap. 2 y su discusión, pero es probable que los factores mencionados arriba, aunados al método de extracción que usamos, cuenten para tales diferencias. Para apoyar este punto, analizamos la expresión de miRNAs abundantes en mitocondrias<sup>213</sup> (miR-130a/b, miR-140\*, miR-320 y miR-494) y en astrocitos<sup>214</sup> (miR-29a) y encontramos que su concentración en SN era muy baja o francamente nula, lo que corrobora la correcta segregación de fracciones con nuestra estrategia de purificación. Ver *Tabla Suplementaria 3*.



Por otro lado nosotros también detectamos diferencias de expresión importantes entre cepas de ratas (Wistar vs. Sprague-Dawley) e incluso en el lote de una misma cepa (IFC vs Keck Center, NJ; datos no mostrados), lo que no es sorprendente. Este tipo de variaciones ya se ha documentado en otras cepas de rata<sup>215</sup>. También, es posible que la dieta y el nivel de estrés mediado por glucocorticoides también jueguen un papel importante en estas diferencias<sup>216</sup>. Sin embargo, existen efectos metodológicos adicionales que pueden influenciar los resultados.

El mayor contraste entre éste y otros reportes no ocurrió sustancialmente en el número y tipo de miRNAs detectados, sino en la abundancia relativa SN/Total. Los estudios de Lugli & Siegel encontraron un enriquecimiento de algunos miRNAs >4-6 veces superior en SN que en la fracción total. En cambio, difícilmente hallamos valores mayores a 2X, ni siquiera en los marcadores dendríticos de mRNA evaluados por qRT-PCR.

En los estudios citados se utilizaron “pools” de muestras de varios animales para alcanzar suficiente masa de RNA para su análisis. En cambio, nosotros analizamos animales individuales e identificamos a los miRNAs con la menor varianza, usando un modelo estadístico con menor número de sesgos (*Loop-design-MAANOVA-k-means-FDR*). En esos trabajos se usaron triplicados simples de microarreglos sin compensar por el efecto del marcaje diferencial observado con diferentes fluoróforos (*dye-swap*), lo que suele ser un sesgo común. Estas variables también pueden afectar la estimación de los valores SN/Total, en especial de los que se expresan pobremente en cada tejido.

Nuestro nivel de astringencia fue muy alto, razón por la cual generamos dos listas, una donde se reportan los miRNAs detectados (3SD) y la otra de aquéllos con la menor varianza. La primera fue más compatible con con los reportes anteriores, en los que se usaron métodos estadísticos diferentes. En suma, creemos que nuestro análisis resultó ser más completo y minucioso, aunque éste sólo fue el punto de partida para los experimentos posteriores.

De forma interesante, la distribución de los miRNAs en función de su enriquecimiento relativo SN/Total fue diferente a la que se encontró para cada una de las regiones del cerebro analizadas. Esto posiblemente se deba a que lo que consideramos como cerebro completo incluyó estructuras que no fueron analizadas por separado, como el cuerpo estriado, el tálamo, la hipófisis, el globo pálido, la amígdala, el cuerpo caloso, entre muchas más. Cada una de ellas, de hecho tiene patrones de expresión diferentes que seguramente cooperaron con un resultado distinto.

Finalmente se debe considerar que varios de los miRNAs hallados enriquecidos en SN en este estudio en diferentes áreas del cerebro de hecho correlacionan con una variedad de patologías neurológicas con gran importancia epidemiológica<sup>12</sup>, lo que le confiere a nuestros resultados un mayor potencial de investigación.

#### Expresión de miRNAs en Cinco Regiones Neuroanatómicas

La mayoría de los miRNAs encontrados en la fracción total de cada tejido también fueron reportados por Bak et al.<sup>24</sup> & Landgraf et al.<sup>18</sup>, incluyendo los que son específicos de tejido. Las diferencias que se observaron con ambos estudios fueron para miRNAs de muy baja expresión que no superaron el punto de corte que establecimos.

Uno de los aspectos fundamentales que se encontró en este estudio, y que no ha sido reportado con anterioridad, fue que la abundancia relativa de los miRNAs en SN es dependiente de cada tejido (*Fig. 5.2.1*), siendo el hipocampo el que mostró un mayor número de miRNAs con alto enriquecimiento en esta fracción. Esto no correlaciona necesariamente con la arquitectura neuronal de cada área, ya que si fuera el caso, neuronas con una arborización muy grande, que contiene mayor volumen dendro-

plásmico, deberían mostrar un mayor enriquecimiento, tal y como se debería esperar para neuronas de Purkinje, localizadas en la corteza cerebelar. Esto indica que el transporte de los miRNAs debe ser más activo en las neuronas del hipocampo que en otras regiones.

Por otra parte, la detección de miRNAs de expresión específica refleja la variabilidad funcional esperada de cada área del cerebro. Es muy probable que estos miRNAs ayuden a definir las diferencias de expresión de mensajeros que cada área despliega de forma específica. Aún falta determinar cuáles mRNAs son regulados y en qué ventana de tiempo ello está ocurriendo. Estos resultados son compatibles con las observaciones realizadas por Bak y colaboradores<sup>24</sup>, aún cuando fueron realizadas en ratón.

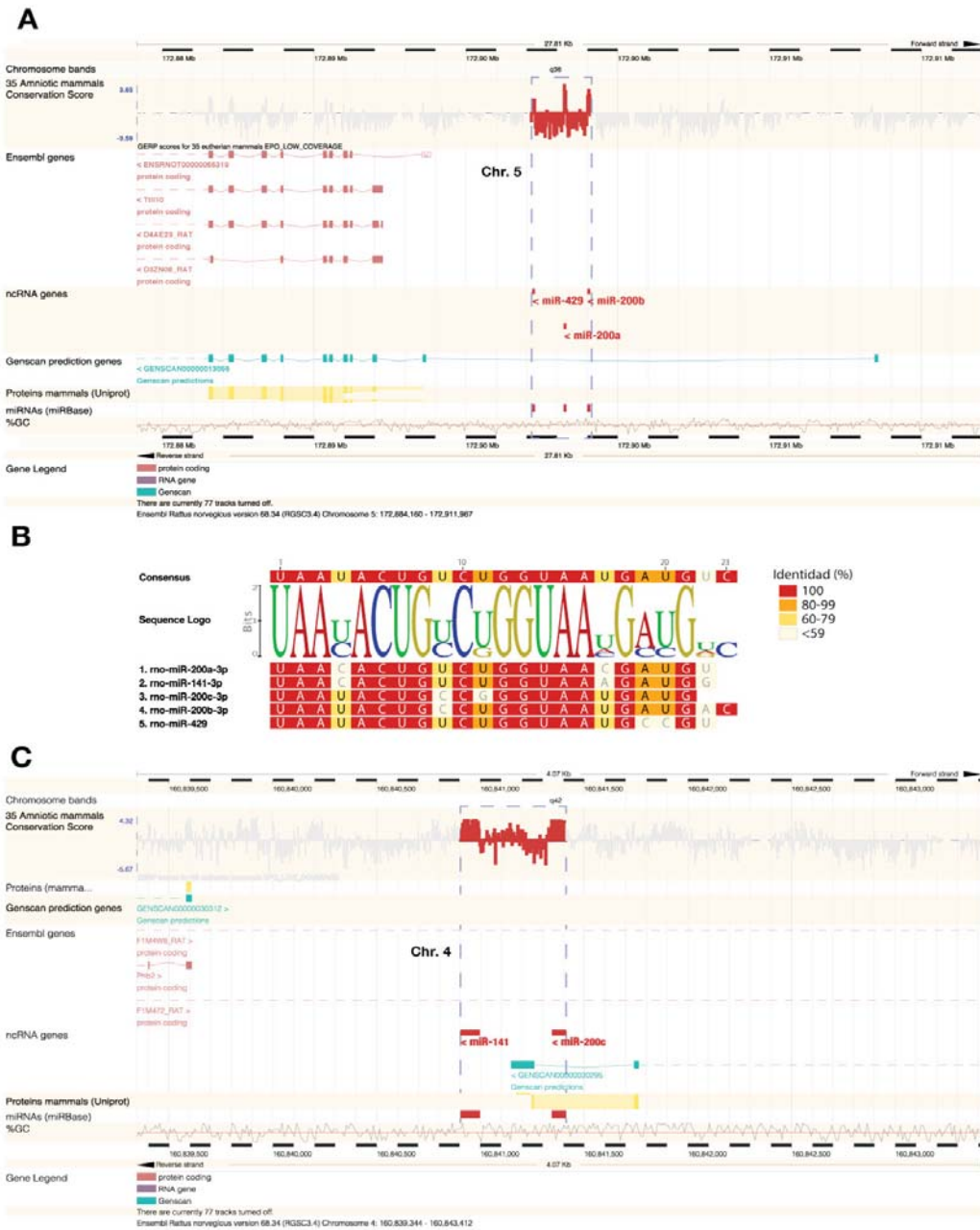
La validación de estas observaciones fue mas clara después de aplicar el método de MAANOVA, especialmente para aquéllos miRNAs con una expresión robusta y casi exclusiva, como lo fueron los miembros de la familia de miR-200 en Ob. La alta expresión de varios miembros esta familia se puede explicar porque se transcriben a partir de dos promotores independientes. Dado que su loci está dividido en dos clústeres localizados en los cromosomas 4 y 5, que contienen a miR-141 y miR-200c en uno, y a miR-429, miR-200a y miR-200b en el otro, respectivamente.

Entre todos comparten 80% de identidad en su secuencia madura, por lo que deben haber sido objeto de dos duplicaciones durante la evolución, dado que cada unidad policistrónica está conservada ampliamente en mamíferos amnióticos (*metatheria*). Esto explicaría la semejanza en sus niveles de expresión, que probablemente están operados bajo promotores similares, aunque estos se localicen en *loci* diferentes (*Fig. 6.2.5*). De manera interesante, no se encontró una expresión coordinada de los miembros de la familia con el miRNA miR-141, a pesar de su alto grado de identidad y que se encuentra en cercanía con miR-200c. La razón parece recaer en que éste último se localiza en una región intrónica de un gen predicho *in silico*, en la cual no se incluye a miR-141, por lo que es probable que dicho miRNA no sea co-procesado simultáneamente.

Entre las funciones asociadas esta familia de miRNAs destacan la represión del represor transcripcional Zfx1b en los precursores neuronales que viajan en la ruta migratoria rostral (RMP), que finalmente se diferencian en neuronas glomerulares y periglomerulares en este órgano olfativo. Este factor que está involucrado en la transición epitelio-mesenquimal y en la regulación de la vía de señalización mediada por TGF- $\beta$ <sup>217</sup> así como en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión como Cadherina E que ayudan en la diferenciación neuronal<sup>218, 219</sup>. Acerca de cuál es la razón por la que estos miRNAs sean muy abundantes en SN es un misterio. Es posible que se requieran para regular de forma precisa la expresión de estas proteínas en función de los contactos que establecen.

Con respecto a los miRNAs miR-143 y miR-145, su baja expresión concertada puede ser explicada también porque pertenecen a una misma unidad transcripcional del cromosoma 18q12.1 de rata, aunque presentan un grado de identidad de tan solo 31.8% entre ambos.

El mismo caso puede aplicar para los miRNAs miR-96 y miR-183 que mapean en el mismo *locus* en el cromosoma 4q22. Por su parte los miRNAs miR-126, -150 y -221, que también mostraron una expresión similar, es posible que presenten un procesamiento similar ya que son miRNAs intrónicos (miRtrons), mapeando en un intrón predicho los cromosomas 3p13, 1q22 y Xq12, respectivamente. Finalmente, miR-150 está localizado en una vecindad que contiene diversos snoRNAs, abriendo la pregunta acerca de su procesamiento y también sobre su evolución.



**Figura 5.6.1. Coordenadas Cromosómicas del Clúster de miR-200.** (A) Los miRNAs miR-429, -200a y -200b están agrupados en un solo locus en el brazo largo del cromosoma 5q34, como parte de un intrón predicho *in silico* (14.7 kb de longitud). En rojo se muestra el alto grado de conservación entre 31 mamíferos amnióticos. (B) Alineamiento mediante ClustalW2 de todos los miembros de la familia de miR-200 que comparten 82.3% de identidad en su secuencia madura. (C) Locus del clúster de miR-141 y miR-200c en el cromosoma 4q42 de rata tiene 0.5 kb de longitud entre ambos. Los mapas fueron creados mediante *custom tracks* en el servidor Ensembl (*release 68*) en <http://www.ensembl.org>.

## Modelos de Localización de miRNAs en Dendritas

Los mecanismos de localización de estos miRNAs en la vecindad sináptica aún se desconocen. Actualmente se proponen dos que no son mutuamente excluyentes.

Uno de ellos es que los miRNAs viajan unidos a sus blancos dentro de los gránulos neuronales (NGs), en un mecanismo denominado “*piggy backing*”. Esta hipótesis es tiene sentido a la luz de que los mRNAs contenidos en los NGs no muestran actividad

traduccional y contienen a la proteína FMRP, que ya es conocida por asociarse a miRISC. Sin embargo, el análisis de componentes de los NGs no muestra que contengan a cualquiera de los miembros de la familia Ago ni a GW182, aunque tampoco se ha mostrado si directamente contienen miRNAs.

Recientemente se ha demostrado que Staufen, una RNP que previamente se ha relacionado con la distribución localizada de mRNAs que codifican para morfógenos como *Oskar* y *Pumilio2* en *Drosophila* y en ovocitos de *X. laevis*, puede unirse a FMRP para localizarlas cerca de las terminales sinápticas en neuronas de cultivo primario<sup>158, 220, 221</sup>. Además, los patrones de localización de miRIS en dendritas nunca aparecen completamente difusos, sino que presentan un patrón punteado. La posibilidad de que la movilización de mensajeros a través de estos sistemas que son muy dinámicos es razonable, pues sus componentes se intercambian continuamente con entre ellos y los P-bodies tal vez sean un puente molecular que tal vez permita que coexistan bajo ciertas condiciones celulares. Esto tiene una base en el hecho de que la asociación de Ago2 con Hsp90 permite que se reclute hacia los gránulos de estrés (SGs) y P-bodies<sup>222</sup>.

El segundo mecanismo incluye el transporte de precursores de miRNAs en una forma autónoma a los miRNAs maduros, posiblemente a través de la movilización de FMRP ó de FXR1<sup>223, 224</sup>, que se sabe que puede a diferentes pre-miRNAs, mediante su asociación a RLC (Dicer:TRBP), misma que se inhibe cuando es fosforilada<sup>225</sup>. Dada la inusitada abundancia de algunos precursores como miR-128, miR-125a y miR-150 (cuyo miRNA maduro no fue detectable por NB) es posible que haya una translocación independiente a los mRNAs pues solamente las formas maduras pueden interactuar con ellos, de acuerdo con el modelo canónico de regulación postranscripcional. Este tema constituye un campo de investigación muy atractivo.

Los dos mecanismos anteriores claramente son activos (dependen del consumo de ATP) y selectivos. Nuestros datos y de otros autores demuestran que no hay realmente una selectividad de transporte que se base únicamente en la difusión simple de estas moléculas. Por un lado se sabe que si no se encuentran unidos a RISC, los miRNAs se degradan rápidamente en el citoplasma. Por otro, miRISC en neuronas muestra un patrón punteado y no difuso lo que indica una localización controlada. En tercer lugar, no todos los miRNAs que encontramos altamente expresados en la fracción total tienen el mismo nivel de expresión en SN, como por ejemplo miR-124a, miR-143 o miR-150, ni siquiera para miR-200, que aunque fueron muy abundantes en SOb, el cociente SN/Total fue de los más bajos. En este sentido, sin descartar que pueda existir una cooperación de este tipo de transporte, especialmente en la región perinuclear en el soma, se antoja más que un transporte activo sea necesario, especialmente cuando los contactos sinápticos están muy lejos de esta zona y siempre requieren un control fino de sus componentes.

#### Variabilidad Neuroanatómica en el Procesamiento miR:miR\*

Los resultados de microarreglo que mostraron que el procesamiento de precursores con miRNAs dobles claramente indican que el contexto celular es muy importante. Desconocemos las implicaciones funcionales que esto tiene, pero sugiere que la selectividad de la hebra no sólo requiere el censado termodinámico del extremo 5' de cada hebra sino que existen otros componentes adicionales que ayudan a determinar la sobrevivencia de cada hebra.

Por un lado, cuando se comparan las abundancias relativas miR/miR\* en la fracción total y SN, se concluye que la procesividad de Dicer, quien es el probable responsable de dicho procesamiento, es diferente en la vecindad sináptica, lo que es de suponer dado el antecedente reportado por Lugli et al.<sup>8</sup>, acerca de los cambios de procesamiento en función de la proteólisis de Dicer por la calpaína.

Por el otro lado, se deben tomar en cuenta algunos factores que pueden explicar esta variación. a) que la vida media de cada hebra puede estar en función de su interacción con los mensajeros blanco, ya que dentro de RISC están protegidos de la acción de RNasas<sup>226</sup>, b) lo cual a su vez también depende de las modificaciones que puedan existir tanto en el RLC como en el mi-RISC<sup>97</sup>, y c) que tales modificaciones están en función del estado celular<sup>227, 228</sup>.

#### Diversidad de Mensajeros Blanco Predichos *In Silico*

El hallazgo de que la mayor parte de los blancos predichos por el algoritmo microCosm, basado en miRanda, mostraran un enriquecimiento de términos GO asociados a funciones neuronales, y más específicamente a nivel de sinapsis, denota que aún cuando este tipo de algoritmos puede mostrar un sesgo de selección (usualmente con un potencial de predicción de blancos más reservado), claramente los miRNAs identificados en SN favorecen un perfil de expresión de mensajeros que va de acuerdo con su localización. Esto ayuda a validar nuestros resultados.

#### Northern Blot II

Los resultados más inesperados que observamos fueron los referentes al NB. En primer término encontramos que no todos los miRNAs evaluados tenían una buena correlación con los resultados de los métodos de microarreglo y qRT-PCR, especialmente para las formas maduras. Los casos más llamativos fueron para miR-9, miR-125a y miR-150.

miR-9 presentó valores de abundancia en SN muy superiores a los hallados con los otros métodos. Además, la presencia de dos bandas entre 50-70 nt (presumiblemente los precursores) resultaba más alta que la forma madura. Este miRNA tiene 3 parálogos en el genoma de rata, localizados en los *loci* 2q34, 2q11 y 1q31, en donde se transcriben las isoformas miR-9-1, -2 y -3, respectivamente. Cada uno de los precursores contiene dos miRNAs, miR-9-5p y -3p, lo que significa que hay al menos 6 posibles miRNAs que pueden procesarse y que han sido clonados en otros estudios.

Es posible que los fragmentos observados sean intermediarios de corte por Dicer o bien productos de modificación por Tut4, o una mezcla de ambas) ya que, al menos en miR-9-1, la secuencia que se encuentra en el asa de corresponde a un sitio canónico de unión de la proteína Lin-28 (GGAG), misma que recluta a la terminal uridil transferasa en mamífero.

Este miRNA se ha asociado con la adquisición del fenotipo neuronal durante el desarrollo embrional, responsable en parte de especificación regional de la placa neural, mediante la regulación de la expresión de factores de transcripción y del splicing pro-neuronal. No obstante, aún queda pendiente resolver su papel funcional en las terminales sinápticas, especialmente en el adulto.

Por otra parte miR-125a fue el resultado más difícil de empatar con los datos anteriores. El NB mostró al menos 6 bandas adicionales al miRNA maduro, mismas que sólo algunas corresponden a los precursores esperados. No es posible determinar si todos estos productos corresponden a varias fases de procesamiento de su precursor o bien si algunos contienen modificaciones a la secuencia que no haya sido reportadas antes. Adicionalmente, la presencia de fragmentos entre 100 y 150 nt también fue sorprendente ya que desconocemos si pertenecen a subproductos del precursor primario. Curiosamente estos mismos fragmentos fueron encontrados en SN de cerebelo (Cb) y tallo cerebral (Bs).

Finalmente miR-150 sólo mostró un par de bandas que migraron entre 80 y 100 nt, pero sin detectar al miRNA maduro. Este último hallazgo es comprensible tomando en cuenta la menor sensibilidad de este método con respecto al qRT-PCR. Creemos que una alternativa para conocer la naturaleza de estos fragmentos sería a través de clonación y secuenciación.



Las diferencias expresadas entre los métodos se pueden deber a las condiciones de hibridación y amplificación de cada método. Por ejemplo, tanto el microarreglo como el NB son incapaces de resolver la hibridación solamente para los miRNAs maduros y la señal final observada puede ser resultado de la contribución de cada uno de los fragmentos hibridados. En el qRT-PCR la procesividad de la Taq polimerasa es de aproximadamente 1, 000 pb/min. En nuestras condiciones, la etapa de extensión/elongación fue de 15 s, recomendada por el fabricante, lo que indica que durante este periodo pueden amplificarse hasta 250 nt por corrida. Esto da tiempo suficiente para que cada uno de los fragmentos detectados en el NB se amplifique simultáneamente. De esta forma el cociente SN/Total también se vio afectado. La única forma de resolver las diferencias de expresión de los miRNAs maduros sería usando sondas Taqman, mismas a las que no se tuvo acceso en su momento.

#### Expresión de miRNAs en Dendritas Microdisecadas con Láser

Este experimento tuvo la intención de comparar los resultados obtenidos en el trabajo de Kye et al.<sup>176</sup>, con un sistema de neuronas inmortalizadas y diferenciadas *in vitro*, y los resultados podían ayudar a dirigir la búsqueda de algunos miRNAs que encontramos en los estudios anteriores. Fue por ello que evaluamos la expresión de let-7b, miR-9 como miRNAs abundantes en SN y miR-124a como un marcador neuronal.

Los resultados también fueron sorprendentes porque no correlacionaron con las abundancias encontradas en el adulto en el cerebro completo o en alguna de las 5 regiones analizadas. En general observamos que su abundancia relativa era mucho más baja de la esperada y, contrariamente, el snoRNA U43 sí estaba presente en las neuritas disecadas. Desconocemos el significado de estas observaciones, pero sugieren que durante el desarrollo de las neuritas los miRNAs neuronales parecen tener una localización predominantemente somática y no dendrítica, lo cual puede tener sentido desde el punto de vista de la supervivencia neuronal.

El establecimiento de conexiones múltiples y duraderas es lo que permite que las neuronas sobrevivan durante el desarrollo embrional por lo que se antoja que un mecanismo permisivo de conectividad múltiple sería evitar que algunos miRNAs somato-dendríticos inhiban la expresión de proteínas necesarias para establecer sinapsis potenciales. No es sino hasta que la neurona ha madurado que los envía a las zonas de contacto para establecer una regulación fina de la síntesis de proteínas.

Estos resultados son un poco más compatibles, al menos en el caso de miR-124a con los obtenidos por Kye et al., para neuronas de cultivo primario, que se extraen de embriones de ratón de 19 días (E19) y que se mantienen en cultivo por 18 días (18DIV) hasta que las neuronas adquieren un fenotipo maduro. No obstante es posible que estas condiciones aún reflejen eventos que solamente ocurren durante el desarrollo neuronal.

# CAPÍTULO VI

## RESULTADOS III:

### CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE MICRORNAs SINÁPTICOS EN FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD NEURONAL

#### 6.1 El Modelo de Epileptogénesis Inducida por Ácido Kaínico (KA).

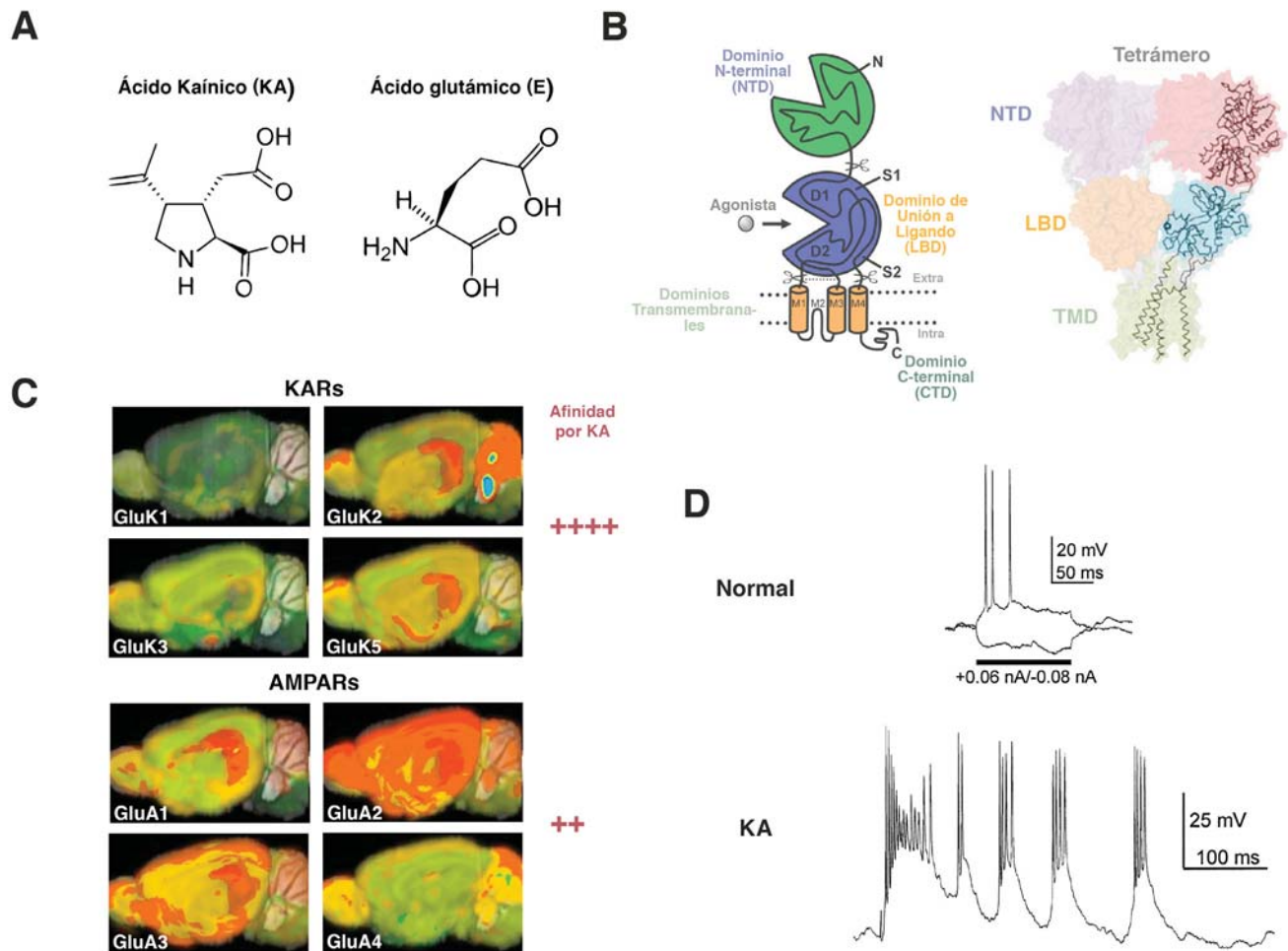
Después de identificar los patrones de expresión regionales en el cerebro en condiciones normales, a continuación decidimos explorar si el incremento de la actividad eléctrica neuronal, mediante la aplicación sistémica de **ácido kaínico [KA** ó ácido (2S, 3S, 4S)-3-(Carboxymetil)-4-prop-1-en-2-ilpirrolidin-2-carboxílico], podría modificar la abundancia de miRNAs en las sinapsis.

Este experimento obedeció al racional de que ya se conocía que este tipo de estimulación favorece un aumento de la síntesis de proteínas acompañado de otros cambios plásticos. Dado que los miRNAs son reguladores negativos en dicho proceso, entonces el escenario esperado era el de la disminución de la abundancia de estas moléculas en la fracción SN una vez activada una despolarización prolongada.

Decidimos explorar el efecto de este compuesto solamente en dos regiones del cerebro, la corteza y el hipocampo, que son áreas en donde se presenta una gran cantidad de cambios morfológicos, cuya ocurrencia se presenta a partir de las 24h post-estimulación. En éstas áreas la actividad excitatoria es especialmente alta en la corteza temporo-medial y el hipocampo, que expresan con gran abundancia receptores glutamatérgicos de alta y baja afinidad llamados GluR5-7 y KAR1-2, respectivamente. Su activación da origen a ráfagas de despolarización constantes que se extienden también a otras áreas como la corteza entorrinal y la amígdala<sup>229</sup> (Fig. 6.1.1).

Entre los cambios que se han documentado se incluyen la formación de autosinapsis en el Hp (área CA3), el rearreglo de los contactos previos así como de las arborizaciones dendríticas y del axón, la presencia de espinas dendríticas edematizadas, y más tarde la inducción de apoptosis en un número importante de células. Sin embargo, poco se sabe acerca de los cambios moleculares tempranos que suceden en este modelo, y mucho menos a nivel de expresión de miRNAs en la sinapsis.

Consideramos que este modelo es reminiscente del proceso que normalmente se lleva a cabo durante la activación sináptica en sus etapas tempranas. Razonamos que en condiciones normales cuando una sinapsis aumenta su actividad eléctrica localmente por la recurrencia de estimulación de la neurona presináptica, un efecto similar podría alcanzarse con dicho método, tal y como ocurriría en otros fenómenos como en LTP o LTD en procesos de memoria y aprendizaje.



**Figura 6.1.1. Expresión de Receptores Ionotrópicos de Kainato en el Cerebro de Roedor y su Efecto Epileptogénico.** (A) El ácido káinic se un compuesto sintetizado por el alga roja *Digenea simplex*. Nótese que la estereoquímica de esta molécula es semejante al ligando natural de los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR). (B) Estructura común de los iGluRs sensibles a KA y AMPA. Se componen de tres dominios principales y todos ellos presentan un arreglo tetramérico de forma natural en mamífero. Son receptores canal que son permeables a Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y en menor medida a Ca<sup>2+</sup> para los de tipo GluK. Modificado de Traynelis et al.<sup>258</sup> (C) Expresión del mRNA codificante para cada tipo de receptor en ratón. Nótese que los receptores de alta afinidad a KA, tipo GluK, son muy abundantes en Hp, Cx y Cb y Ob. Los receptores de AMPA, de baja afinidad por KA, están enriquecidos en los mismos tejidos. Datos tomados de la base de datos de expresión por ISH del Allen Mouse Brain Atlas (<http://mouse.brain-map.org>). Estos datos son compatibles con observaciones realizadas en rata para los mismos marcadores. (D) Efecto del KA sobre el potencial de campo (cambio de voltaje en una población de 100-150 neuronas granulares) registradas en el giro dentado del hipocampo de una rata tratada con vehículo (panel superior) o con KA (panel inferior). Se grafica la en respuesta a una pequeña inyección de corriente (barra inferior negra) en animales estimulados con un electrodo implantado en la vía perforante, que es una zona rica en axones que ascienden desde la corteza entorrinal y que inervan a las neuronas granulares. Cada pico representa un cambio de voltaje (potencial de acción) en un conjunto de neuronas que disparan simultáneamente. Nótese la alta recurrencia en los trenes de despolarización en las ratas tratadas con KA, que son característicos en la epilepsia y que reflejan hiperexcitabilidad. Modificado de Buckmaster et al.<sup>260</sup>.

Utilizamos un protocolo agudo (120 min) de inducción de epilepsia inducida por KA, que normalmente se utiliza para manifestar el modelo epileptogénico semejante a lo que ocurre en pacientes con **epilepsia del lóbulo temporal (LTE)** (Fig. 6.1.2). Una de las ventajas de usar este modelo de manera aguda es que no se observan los efectos complejos que se suceden al inicio de la epileptogénesis, como es la apoptosis incrementada en el hipocampo y la formación de autosinapsis.



**Figura 6.1.2. Protocolo Epileptogénico Inducido por KA.** La inyección de KA está precedida por la de metil-escopolamina (1 mg/kg de peso), que es un inhibidor lipofílico de los receptores muscarínicos M1 colinérgicos. Esta maniobra fue usada para disminuir el efecto cataleptico (rigidez muscular) característico del modelo. Posterior a inyección de KA (10 mg/kg de peso) sobrevienen signos como mirada fija y sostenida, movimiento cefálico dorso-ventral repetitivo esporádico, espasmos recurrentes (1-2 c/15 min), erección pilosa del dorso, alzada esporádica sobre miembros posteriores con subsecuente caída, taquicardia y salivación profusa. Después de 2 h de tratamiento se inyecta diazepam (10 mg/kg de peso), una benzodiazepina agonista de los receptores tipo GABA permeables al ion cloruro que hiperpolariza las neuronas y aumenta el umbral de disparo del potencial de acción. Adicionalmente se usa el anti-convulsivo fenitoína que, entre otros blancos, inhibe la conductancia de sodio en células excitables bloqueando al canal de sodio SCNA5. En conjunción ambas drogas disminuyen la frecuencia y amplitud de los potenciales de acción favorecidos con el KA. Finalmente, los animales tratados son sacrificados por decapitación, seguida de la extracción de los SN. El grupo control consiste de animales inyectados con solución salina (NaCl 0.9%) en lugar de KA. Todos los fármacos fueron administrados vía intraperitoneal (i.p.).

## 6.2 Análisis por qRT-PCR.

Con el protocolo anterior medimos la expresión de miRNAs en las fracciones SN de la corteza y el hipocampo mediante qRT-PCR y más tarde con NB.

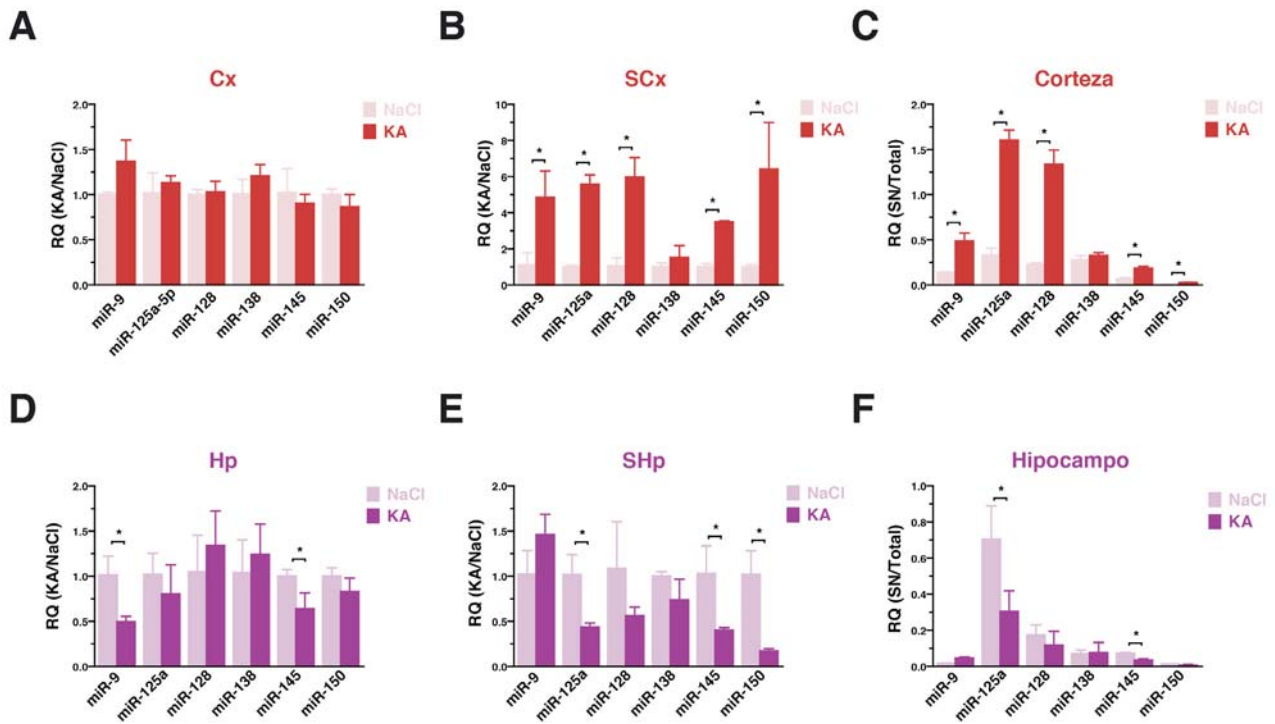
Determinamos los valores de expresión utilizando el valor RQ (*Relative Quantification*) que se refiere a la expresión  $2^{(ddCt_{Exp} - ddCt_{Ctrl})}$ , lo que permite analizar en espacio lineal las diferencias relativas de abundancia. La condición experimental se refiere a las ratas tratadas con KA y la control a las tratadas con vehículo (solución salina). Como primer normalizador (dCt) utilizamos un RNA exógeno (*spike-in*) en una concentración conocida (5 nmol) añadido durante la extracción del RNA (en el Trizol). La segunda diferencia indica la variación entre ambas condiciones.

De esta forma, medimos la expresión de 6 miRNAs, 4 de los cuales habíamos observado con alta abundancia en SN (miR-9, miR-125a, miR-128 y miR-138) y dos con muy baja representatividad (miR-145 y miR-150).

El hallazgo más notable fue que la expresión de miRNAs en la fracción total se mantuvo constante en Cx y Hp (excepto por miR-9 y miR-145 en ésta última, donde disminuyeron entre el 40-50% su abundancia con respecto al total), pero en la fracción SN fue donde se observó mayor cambio (Fig. 6.2.1).

En SCx 5 de 6 miRNAs aumentaron su abundancia entre 0.5 a 6 veces solamente en SCx, y sólo miR-138 no presentó cambios estadísticamente significativos (P0.05). Así, el análisis de su cociente SN/Total mostró un incremento entre 50-150% de expresión relativa con respecto a la condición control (NaCl). Esto sugiere dos escenarios: 1) en donde los miRNAs maduros aumentan su biodisponibilidad por aumento de su procesamiento local y/o 2) donde hay más arribo de sus precursores en la sinapsis.

Contrariamente, la expresión de 3 de 6 de los miRNAs hipocampales medidos (miR-125a, miR-45 y miR-150) mostraron una disminución significativa de su expresión entre el 50-80% solamente en SHp. El cociente SN/Total mostró que solamente miR-125a y miR-145 disminuyeron su abundancia relativa en SN entre el 20 al 30% con respecto a la condición control.



**Figura 6.2.1. qRT-PCR de microRNAs Sinápticos de Cx y Hp en Animales Tratados con KA o NaCl.** Se utilizó usaron 100 ng de RNA total como molde para la reacción de RT en todas las muestras. (A-C) miRNAs corticales de la fracción total (A) o de su fracción SN (B) y su cociente SN/Total (C) (D-F) miRNAs hipocámpicas de la fracción total (D), SN y su abundancia relativa (F). Como normalizador se utilizó un miRNA artificial para calibrar el cargado (no mostrado), cuya amplificación fue idéntica en todas las muestras. El método RQ se calculó como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde la primera delta es el valor Ct de cada miRNA por individuo menos el valor promedio de Ct del miRNA artificial. La segunda delta se calculó como el valor Ct observado en las ratas tratadas con KA menos el valor promedio de Ct de la condición control (NaCl 0,9%). Las barras representan el valor de la media de RQ±SD calculada para tres animales por grupo. La significancia estadística fue calculada por una prueba pareada de t de Student de dos colas,  $P \leq 0.05$ .

De este experimento se desprenden varias conclusiones. La primera es que el KA es capaz de ejercer cambio en la expresión de miRNAs especialmente a nivel sináptico, tanto en la corteza como en el hipocampo.

Es posible suponer que los cambios de expresión de miRNAs en este modelo, ocurren antes en la sinapsis que en el resto de la neurona (fracción total), pues la estimulación prolongada actúa principalmente en estos sitios.

Adicionalmente podemos concluir que este mecanismo es altamente selectivo, pues no todos los miRNAs cambian su expresión o bien no lo hacen en la misma magnitud. Esto sugiere que pudiera existir un mecanismo de selección que sólo reconozca a una subpoblación de local de miRNAs.

El efecto que provoca la inducción de epilepsia por KA claramente tiene un componente de especificidad de tejido, que se comporta de forma antagónica en la corteza y en el hipocampo. Finalmente, los cambios en expresión sináptica se suscitaron para miRNAs cuya abundancia es muy alta en ambas fracciones, como miR-9, miR-125 y miR-138, como para aquéllos de abundancia reducida en SN como miR-145 y miR-150, lo cual fortalece la hipótesis de la especificidad.

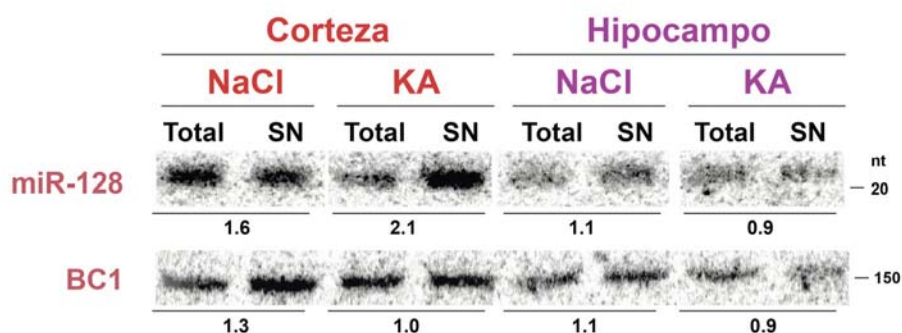
### 6.3 Validación por Northern blot III.

Para revisar la expresión de los miRNAs maduros, así como de sus precursores (si fuera el caso) se eligió realizar el análisis por NB de algunos miRNAs.

Quisimos preguntar con este método no solamente si podían ser corroborados los datos de qRT-PCR sino también si los cambios observados se debían a modificaciones en la abundancia de sus precursores, como se había observado antes.

Por supuesto, la magnitud de las diferencias de abundancia de este miRNA entre animales estimulados con KA y los que no (NaCl) no fueron exactamente las mismas que las observadas en qRT-PCR, posiblemente por la sensibilidad de los métodos, pero sí mostraron una correlación en cuanto a la dirección de cambio.

En primer término, volvimos a encontrar una multiplicidad de bandas que ya habían sido observadas previamente, pero cuya particularidad es que aquéllas que presentaron un tamaño 150 nt (A-C) mostraron una abundancia mayor en las ratas con o sin tratamiento, que fue superior a la observada previamente para los mismos tejidos en animales normales (Fig. 6.3.1 cfr. Fig. 5.3.4). Sin embargo, la ausencia de la banda D en las fracciones SN de ambas condiciones fue consistente.



**Figura 6.3.1. NB de miR-128 en Cx y Hp de Ratas Tratados con KA ó NaCl.** (A) Se usaron 500 ng de RNA <200 nt como sustrato (extraído de 3 animales y mezclado en una sola alícuota), mismo que se resolvió por PAGE en condiciones desnaturalizantes (Urea 8 M, desnaturalizado a 95 °C por 5 min). Éste se transfirió a una membrana nitrada de nylon e hibridada con 25 pmol de una sonda de LNA marcada con <sup>32</sup>P (aprox. 10<sup>6</sup> cps) y expuesta por 8h en una placa de Phosphorimager revelada con láser en un equipo *Typhoon* (Molecular Dynamics). En el recuadro punteado rojo se visualiza con mayor contraste y brillo a la banda F apenas perceptible sin saturar las otras bandas. (B) Imagen del mismo blot visualizada en 3D y pseudocolor para indicar la intensidad y migración relativa con mayor claridad. Procesada mediante ImageJ. (C-D) Cocientes de los valores de densitometría detectados para cada banda en la corteza (C) o en el hipocampo (D). La línea roja punteada indica un cociente de 1 en donde no hubo cambios entre las condiciones experimentales.

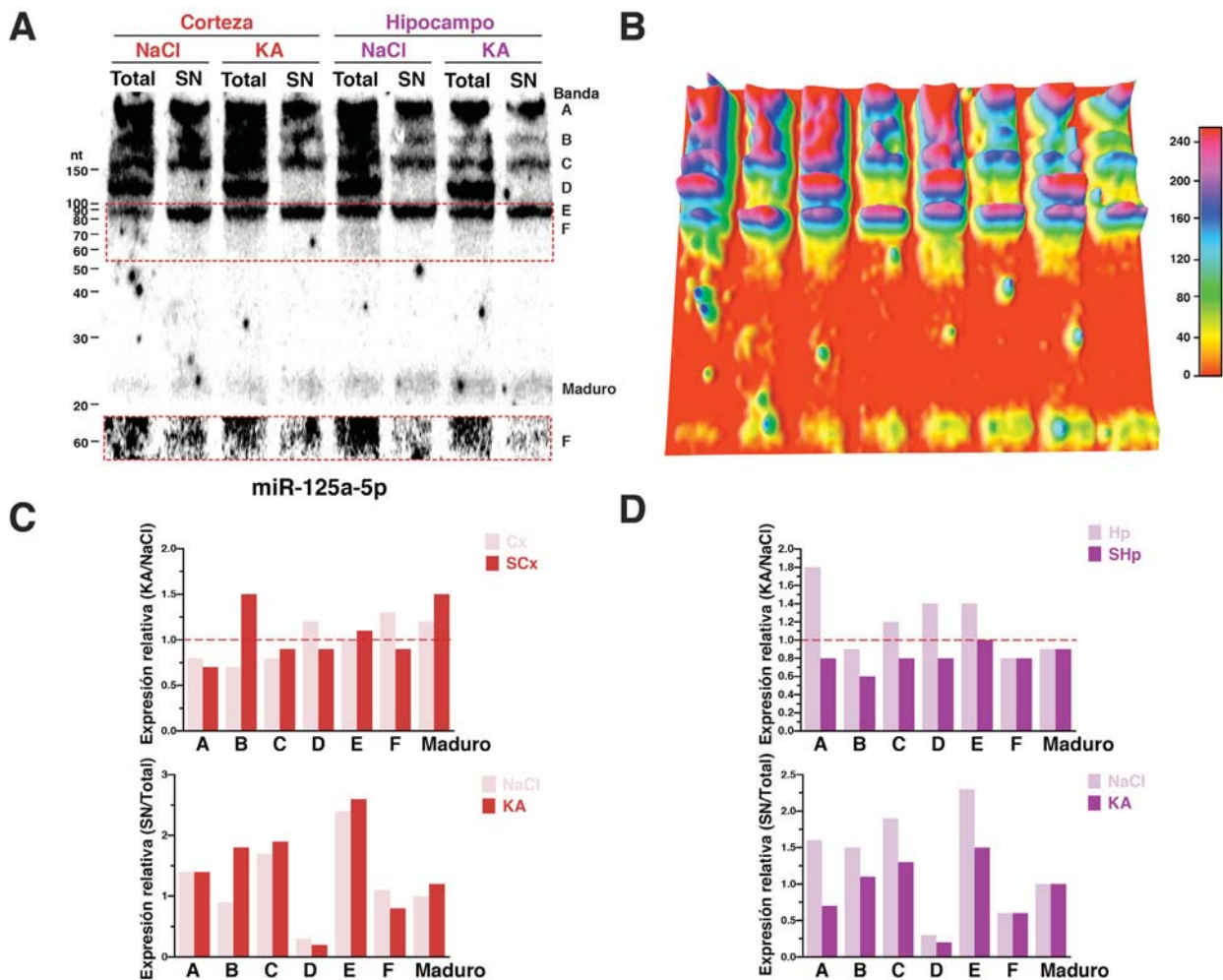
Un caso especial fue el de la banda B que mostró un aumento cercano al 50% solamente en animales tratados con KA.

Aún con estos datos no pudimos conciliar el resultado obtenido mediante qRT-PCR en cuanto a la magnitud, especialmente en la que se refiere a la expresión de miR-125a maduro, que al final, es la molécula efectora. Tampoco ocurrió aún cuando se midió la contribución de cada una de las bandas en conjunto.

Estos resultados sugieren que si bien no hubo una correlación exacta con el experimento anterior, sí permitieron inferir que el tratamiento con KA produce un efecto diferencial sobre fragmentos de RNA que pueden corresponder no solamente al pre-miR-125a sino también a su precursor primario, de acuerdo con el tamaño y la abundancia observadas. Ello implica que puede estar afectando algún proceso de maduración o procesamiento que ocurre con mayor rapidez en las sinapsis, antes que en el resto de las células.



Contrariamente, la abundancia de las bandas previamente observadas como los precursores de miR-150 (80-150 nt) no se vio afectada significativamente por el tratamiento con KA (Fig. 6.3.2), lo que correlaciona con los resultados obtenidos, aún cuando con este método no se pudo observar al miRNA maduro, probablemente por su limitada sensibilidad.



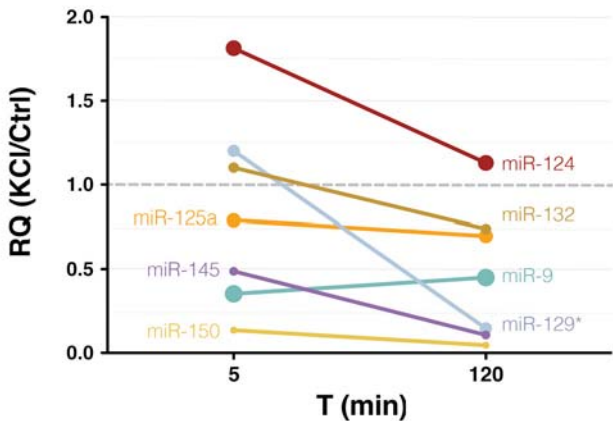
**Figura 6.3.2. NB de miR-150 en Cx y Hp de Ratas Tratadas con KA ó NaCl.** La misma membrana mostrada en la Fig. 6.3.1 fue desnudada e hibridada con una sonda de LNA marcada con  $^{32}P$ . (A) Autorradiografía (exposición >8 h) en placa de Phosphorimager del NB de miR-150. En el recuadro punteado rojo se visualiza con mayor contraste y brillo a la banda F apenas perceptible sin saturar las otras bandas. (B) Imagen del mismo blot visualizada en 3D y pseudocolor (ImageJ, NIH) para indicar la intensidad y migración relativa de cada banda con mayor claridad. (C-D) Cocientes de los valores de densitometría detectados para cada banda en la corteza (C) o en el hipocampo (D). La línea roja punteada indica un cociente de 1 en donde no hubo cambios entre las condiciones experimentales.

## 6.4 Efecto Despolarizante en SN por Alto Potasio *in vitro*.

Con el fin de evaluar si el efecto observado *in vivo*, obedecía primordialmente al efecto despolarizante del KA, decidimos evaluar este efecto *in vitro*. Así, como primera aproximación (la cual ya no se pudo continuar), incubamos SN de cerebro completo en un buffer isotónico con alta concentración de potasio (50 mM) durante 5 ó 120 min, en presencia de TTX (1  $\mu$ M), que es un potente inhibidor de los canales de sodio sensibles a voltaje. La inhibición de la corriente de sodio por este compuesto garantiza que la despolarización sea mantenida por la activación de canales de calcio sensibles a voltaje.

La alta concentración de potasio extracelular disminuye el voltaje intracelular (dentro de los SN) a -20 mV, muy por encima del umbral de disparo de un potencial de acción neuronal de -45 mV. El potencial de membrana normal en estas membranas es aproximadamente de -75 mV.

Así, hallamos que la expresión de 4 de 7 miRNAs evaluados por qRT-PCR rápidamente decreció a valores inferiores al 50% en los primeros 5 minutos y se mantuvo constante durante las 2 h seguidas a la incubación en alto potasio (Fig. 6.4.1).



**Figura 6.4.1. Expresión de microRNAs en SN Estimados con Alto Potasio *in vitro*.** Análisis por qRT-PCR de la abundancia relativa de miRNAs en SN de cerebro completo incubados en presencia de 50 mM de KCl extracelular. Los SN fueron extraídos de 3 animales y cada ensayo se hizo por duplicado. Se compararon 3 grupos de SN a tres tiempos (0, 5 y 120 min). El valor RQ representa el cambio de expresión normalizado contra el tiempo "cero" para el primer dCt y la condición sin alto potasio extracelular (5 mM) como control para el ddCt. El valor de la unidad representa invariabilidad de cambio de expresión. Los SN se mantuvieron en agitación a 25 °C y la estimulación se detuvo por adición de Trizol según cada tiempo indicado. 200 ng de RNA total fueron usados como molde para la reacción de qRT-PCR usando el método de NCode.

La despolarización prolongada causó un decremento significativo desde los 5 minutos para los miRNAs miR-129\*, miR-145 y miR-150, y en menor medida para miR-125a. Al mismo tiempo, miR-124a cursó por un incremento momentáneo cercano al 80% en el mismo lapso de tiempo.

En casi todos los casos se observó un decremento sustancial de la abundancia en SN pasadas las 2h de estimulación, excepto en los casos de miR-9 y miR-125a. Notablemente, miR-129\* mostró una degradación con el mayor delta observado (cercano al 100%).

Esto confirma que dentro de los SN existe un mecanismo selectivo de degradación que opera, nuevamente, dependiente del tipo del miRNA que se trate. La disminución de la expresión no es un evento dependiente de la degradación intrínseca que se observaría en una muestra que contenga actividad de RNasa, pues si así fuera entonces la disminución debería ser uniforme en todos los casos.

La despolarización *in vitro* sobre los SN no mostró un aumento de la abundancia de miR-125a como se observó *in vivo*. Por otro lado, miR-150 mostró un comportamiento semejante en ambos experimentos.

*Status Epilepticus*

El status epilepticus (SE) se caracteriza por la presencia de descargas sincrónicas en el cerebro que pueden ser generalizadas o localizadas dependiendo de la zona del cerebro en donde se originen. La epilepsia se divide en dos categorías: convulsiva (antes conocida como *grand mal*) y no convulsiva o de ausencias (*petite mal*)<sup>229, 230</sup>.

La epilepsia convulsiva o *epilepsia partialis continua* (EPC) se acompaña de movimientos musculares descontrolados (*mioclonus*) acompañados de estados tensionales (*tonus*) que pueden durar hasta 30 minutos antes de que sobrevenga la muerte, lo que ocurre en alrededor del 20% de los pacientes que la padecen. Se puede inducir a partir de infecciones virales, accidentes vasculares cerebrales, tumores o por resistencia a drogas antiepilépticas. Usualmente se origina en el lóbulo temporal de la corteza y suele ser una de las áreas más dañadas después de un ataque convulsivo<sup>231</sup>. La epilepsia no convulsiva o *status epilepticus parcial complejo* (CPSE) carece de mioclonus y se observa falta de respuesta de un paciente, la cual puede durar desde horas a varios días y por ello es de difícil diagnóstico.

El ácido kaínico induce EPC aún en dosis bajas a través de la hiperestimulación de receptores-canal excitatorios de glutamato tipo Grik (KAR) y en menor medida a los de tipo Gria (AMPA)<sup>232</sup>. Cuando se administra de forma sistémica produce muerte neuronal en las zonas afectadas e incrementa notablemente después de varios días de la estimulación. Entre las regiones que más se afectan por esta enfermedad están el hipocampo y la corteza temporal<sup>233</sup>.

Diversos estudios han relacionado esta condición con cambios en la expresión de miRNAs en hipocampo<sup>234-236</sup> en modelos de epilepsia de lóbulo temporal (TLE). Estos han encontrado al menos una veintena que aumentan significativamente su expresión después de 8 h de tratamiento con KA o con pilocarpina (un agonista muscarínico de la transmisión colinérgica central que induce epilepsia en dosis altas)<sup>237</sup>.

La inducción de CPSE en animales produce daños celulares importantes acompañados de muerte neuronal extensa en neuronas de la región CA1 del hipocampo y provoca la formación de autosinapsis en las neuronas de CA3, que procesan información de entrada proveniente de la corteza entorrinal<sup>229</sup>.

Por lo menos miR-34a, miR-132 y miR-184 han sido asociados fuertemente con la inducción CPES<sup>234, 236, 238</sup> y miR-134a protege contra la aparición de daños morfológicos en las dendritas<sup>239</sup>. Se sabe que la transcripción de miR-132 depende de CREB en respuesta al aumento de actividad sináptica<sup>240</sup> y miR-184 se regula negativamente por Mecp2<sup>241</sup>, una proteína de unión a islas CpG metiladas que es central en el síndrome de Rett.

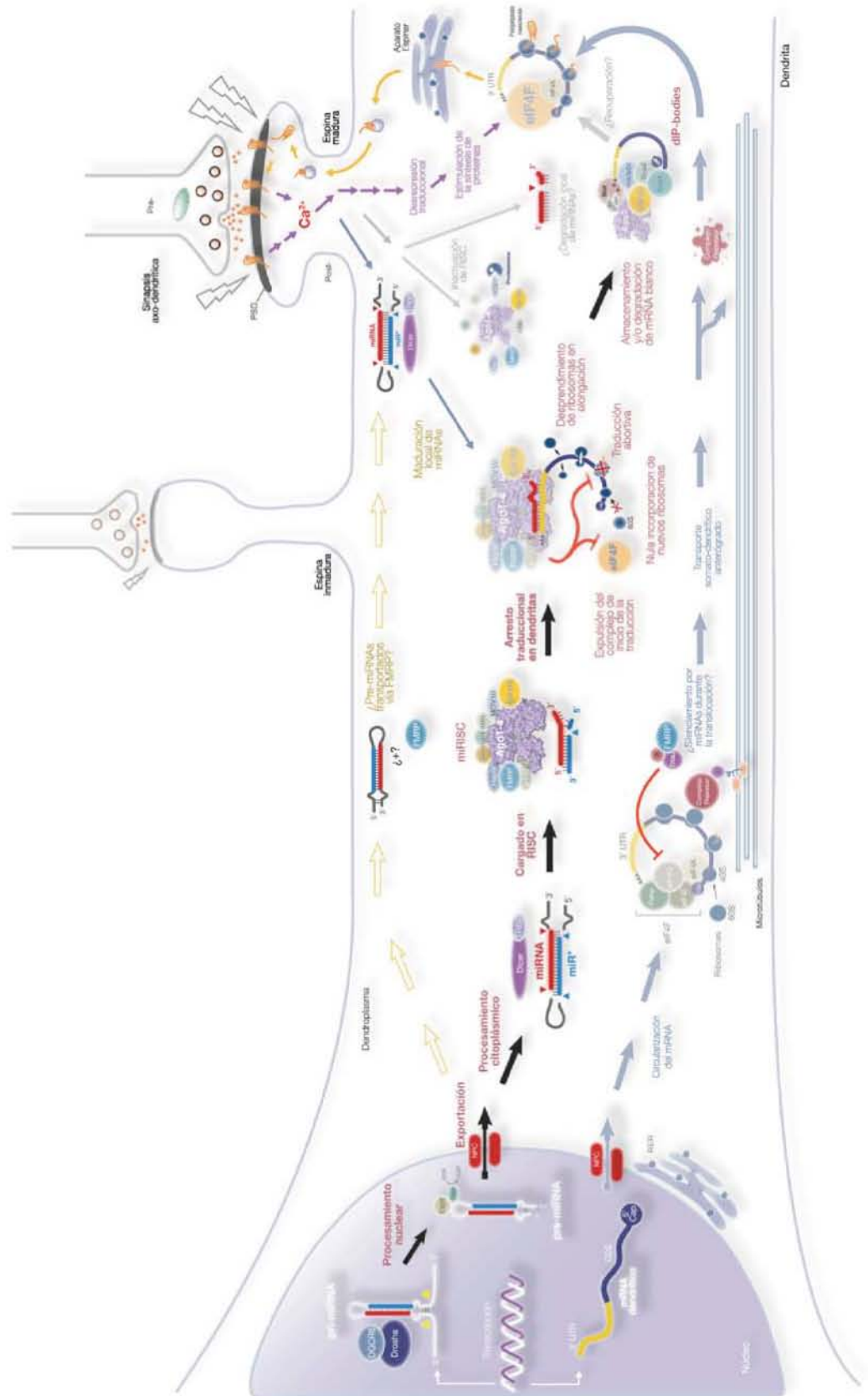
Todos estos miRNAs son abundantes en sinapsis tanto de Hp como de Cx lo que sugiere que los cambios globales de expresión posiblemente afecten primero las funciones sinápticas de estas moléculas, lo que merece mayor escrutinio.

*Efecto Antagónico del KA sobre miRNAs Sinápticos de Cx e Hp*

Los cambios de expresión de miRNAs en Cx y Hp después de 2 h de tratamiento con KA fueron más evidentes en SN, lo que sugiere que las sinapsis son afectadas antes que en el soma, aunque en Hp miR-9 y miR-145 fueron reducidos rápidamente en la fracción total. Esto es de esperarse basado en el modelo de activación sináptica-desrepresión traduccional en el que

postulamos que es más trascendente en la ventana de tiempo de minutos a unas pocas horas, entre las etapas tempranas y tardías de la LTP. Ver Fig. 6.4.2.

## Síntesis de Proteínas y miRNAs en Dendritas



**Figura 6.4.2. (página anterior). Modelo General de Regulación de la Síntesis de Proteínas en Dendritas.** Los miRNAs pueden ser madurados en el citoplasma perinuclear o bien en las dendritas, cerca de las sinapsis. Es posible que puedan ser transportados mediante gránulos neuronales (NGs), complejo represor. Los pre-miRNAs también pueden ser acarreados vía FMRP o directamente con Dicer, pero se desconoce cuál es este mecanismo en dendritas. Cuando ocurre una despolarización prolongada o estimulación de alta frecuencia en una sinapsis, el incremento de calcio local activará a la calpaína (no mostrada) y producirá un corte proteolítico en Dicer que aumentará su actividad catalítica *in situ*, generando nuevos miRNAs maduros listos para ser cargados en RISC. Dado que este estímulo desencadena la activación de cascadas de señalización (flechas discontinuas) es factible que esto provoque modificaciones post-traduccionales en RISC, incluyendo la degradación de MOV10 mediante el proteasoma, inactivando al complejo temporalmente. Los mensajeros pueden ser traducidos en el soma y por ello se circularizan con los factores de inicio de la traducción, pero cuando son transportados en NGs (complejo represor) los pierden y permanecen latentes hasta que llegan a la sinapsis, esperando a ser activados por la despolarización local intensa. Tal vez los mensajeros viajen acompañados de los miRNAs durante el tránsito en un mecanismo denominado "piggy backing", pero aún no se ha demostrado que así sea. Cuando la despolarización es suficientemente alta y frecuente los NGs se disgregan y permiten que los miRNAs sean traducidos, ya sea por la inactivación local de RISC, la disociación de los cuerpos de procesamiento dendrítico (dIP-bodies) y/o por la asociación con nuevos factores de inicio de la traducción que hayan sido activados (i. e., S6). En este momento se sintetizan proteínas que promueven la LTP e incrementan la señalización sináptica. Es probable que haya una recuperación post-estimuladora de la actividad represora de RISC para evitar una sobreactivación y para modular la síntesis local de proteína, sin embargo la selección apropiada de mensajeros dendríticos que serán inhibidos por miRNAs queda como un misterio.

Lo más llamativo de este efecto es que en SCx y SHp sea inverso, probablemente debido a las diferencias funcionales, citoarquitectónicas y de composición de receptores de AMPA y KA de cada tejido. El hipocampo tiene una densidad alta de receptores de KA de alta afinidad (GluK3/5) y la corteza es rica en receptores de baja afinidad al KA (GluA2/3), por lo que es posible que el nivel de despolarización es mucho mayor o más prolongado en Hp que en otras áreas.

Un escenario posible que explique estos resultados es que si el nivel de estimulación es moderado (como en SCx) esto estimula un mayor procesamiento de los pre-miRNAs (e. g., miR-125a) aumentando la disponibilidad del miRNA maduro en la post-sinapsis.

En cambio, si el nivel de despolarización es extremo, como podría ocurrir en el SHp, entonces también se favorece la degradación del miRNA maduro y de sus precursores, disminuyendo su expresión local. Es posible que los genes que regulen localmente estén asociados a sobrevivencia neuronal o pro-apoptosis según sea el área del hipocampo que esté afectada. También es posible que otros genes pro-sinápticos se incrementen favoreciendo la formación de autosinapsis en neuronas de CA3 de forma desordenada. Este efecto faculta al área afectada a repetir los eventos convulsivos cada vez con más frecuencia, mucho tiempo después de que se dio la epileptogénesis.

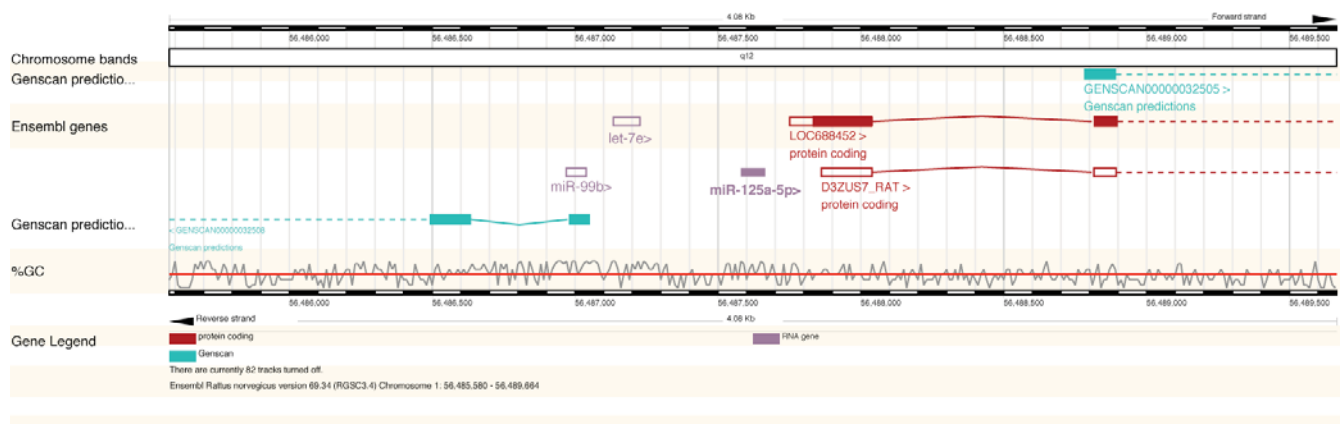
Otro mecanismo, que no es mutuamente excluyente, es que el transporte anterógrado de precursores y miRNAs maduros hacia las dendritas también se incremente como lo demostraron Cougot y colaboradores<sup>182</sup> cuando la neurona sido estimulada con NMDA o KA.

#### Northern Blot

La mayor divergencia entre los datos se dio entre los resultados de qRT-PCR y NB. No pudimos observar la misma magnitud de cambio en la expresión de los miRNAs sinápticos, aún cuando se replicó el modelo epileptogénico de manera idéntica. Creemos que la única forma de explicarlo es que tal vez esté en juego un efecto de lote de cepa. Las ratas usadas para el qRT-PCR fueron originaria de NJ y tuvieron un periodo de adaptación de 2 h antes de iniciar el protocolo estimulador. Los animales que se usaron para el NB se criaron en el bioterio del IFC y tuvieron el mismo tiempo pre-adaptativo para replicar las mismas condiciones.

Sin embargo la observación más importante de este experimento fue hallar bandas que corresponden no sólo a los precursores de miR-125a-5p sino también de mayor tamaño (>100 nt). Más interesante aún es que hubo un número menor de precursores en SN de cada región del cerebro. Esto deja más preguntas ¿a qué corresponden estas bandas? ¿corresponden a pri-miRNAs parcialmente procesados? ¿por qué se localizan en SN también? ¿qué significa cada una y a qué proceso obedece?

Al menos el contexto genómico de miR-125a-5p en rata deja más dudas que respuestas pues está en una vecindad donde coexisten dos miRNAs, let-7e y miR-99b en un área menor a 1 kb, no hay una región donde pueda inferirse un procesamiento vía splicing, ni tampoco si éste sea parte de un pri-miRNA policistrónico (Fig. 6.4.3).



**Figura 6.4.3 Contexto Genómico de rno-miR-125a.** Un clúster de miRNAs que posiblemente se procesen juntos que acompañan a miR-125a que se basa en que al menos uno de ellos se localiza en una porción de un gen predicho (verde) que tal vez tenga más de un intrón extendiéndose más allá del extremo 3' predicho.

Desconocemos otros ejemplos en donde esto se haya visto de forma similar por lo que puede constituir una avenida de investigación muy interesante.

#### Despolarización de SN

Este sistema fue muy atractivo para evaluar el efecto de la despolarización prolongada con alto potasio (50 mM) en la dinámica de expresión de miRNAs en SN. Esto se evaluó únicamente por qRT-PCR.

Lo más notable fue que al replicar la despolarización de los SN durante 5 min ó 2 h de exposición al alto potasio, 3 de 7 miRNAs aumentaron su expresión entre 15 a 60% en los primeros 5 minutos; y 6 de 7 miRNAs disminuyeron su expresión al final del tratamiento. miR-124 y miR-29\* mostraron la delta negativa más grande que los demás miRNAs y esto sugería más bien un proceso de reducción de miRNAs generalizado posiblemente por acción de RNasas. Pero al observar que miR-9 de hecho aumenta ligeramente su expresión (aún cuando es muy abundante en dendritas) sugiere más bien que hay un mecanismo selectivo en juego.

Este claramente es independiente del transporte anterógrado de miRNAs a través de la dendrita pues las sinapsis ya están fraccionadas, lo que implica posiblemente un aumento de la actividad de Dicer localmente<sup>8</sup> así como de otras nucleasas que participan en la degradación de los miRNAs maduros también

#### ¿Transporte Paracelular de miRNAs?

Desde 2007 se han publicado reportes acerca de que los miRNAs pueden ejercer un efecto regulatorio de forma paracelular, a través de la excreción mediada por exocitosis de complejos vesiculares denominados **exosomas** o **cuerpos multivesiculares (MVBs)**<sup>242-247</sup>. Además estos miRNAs se han detectado en una variedad de líquidos corporales como la saliva, la orina,



el plasma sanguíneo, e incluso la leche materna, y hoy en día se utilizan como biomarcadores plasmáticos de enfermedades como cáncer, Parkinson, etc. Para una revisión amplia del tema se recomiendan los artículos de Chen et al.<sup>248, 249</sup>.

En ese mismo año Smalheiser NR. especuló que los miRNAs pueden presentar transferencia horizontal de neurona a neurona y posiblemente afectar los procesos regulatorios de síntesis local de proteína<sup>250</sup>. Si esta hipótesis es cierta, es posible que los complejos de silenciamiento puedan viajar de un componente a otro de la sinapsis vía exocitosis. Las neuronas son células cuya comunicación se basa en este proceso (recuérdese que la base de la transmisión sináptica química se da a través de la liberación de neurotransmisores a través de las vesículas sinápticas localizadas en el axón).

Aunque la mayor parte de la fracción SN consiste de elementos post-sinápticos, cabe la posibilidad de que durante la estimulación ocasionada por la presencia de KA, haya transferencia de miRNAs hacia el axón o viceversa. Se ha observado que en neuronas hipocampales estimuladas vía LTP, pueden proyectar pequeñas espínulas al interior del axón y liberar su contenido al interior<sup>251</sup>. Por otro lado, la observación de algunas proteínas de RISC como Ago2 en terminales axonales apoya la posibilidad de que miRNAs puedan ser trasladados hacia las dendritas<sup>7, 181, 252-255</sup>. Estas hipótesis, por supuesto, esperan ser demostradas.

# CAPÍTULO VII

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 7.1 El Modelo de SN es Eficaz para el Análisis de Expresión de microRNAs Sinápticos.

Las modificaciones realizadas a métodos previos para alcanzar el mejor nivel de pureza resultaron en una metodología que provee de SN altamente ricos en dendritas (elementos post-sinápticos) cuya preparación es adecuada para el análisis de pequeños RNA no codificantes (sncRNAs).

Gracias a ello, este estudio es el primero que revela la variabilidad de expresión regionalizada miRNAs, en lo que se refiere al nivel subcelular. Más aún, es la primera vez que se encuentra que tales miRNAs son selectivamente regulados a nivel de sinapsis en mamífero, mediante la inducción química de la actividad eléctrica neuronal, en particular de la corteza y del hipocampo.

Aunque el modelo no es absoluto y es limitado en cuanto a las predicciones que se podrían hacer sobre la actividad sináptica in vivo, ciertamente brinda mucha información exploratoria de una población de miRNAs finita, encapsulada en un espacio muy restringido. Por tanto puede ser una herramienta poderosa que ayudará a distinguir con mayor precisión la interacción entre cada uno de los jugadores en la regulación de y por miRNAs en la sinapsis.

#### Perspectivas

- 4) Explorar las diferencias de expresión de miRNAs en sinaptosomas (ricas en elementos pre-sinápticos) y de SN, para establecer si existen diferencias y esto ayude a identificar miRNAs presinápticos.
- 5) Analizar la expresión de miRNAs en PSDs inmunoprecipitadas para establecer si hay una microrregionalización de miRNAs, de acuerdo con las condiciones celulares.
- 6) Identificar la correlación de miRNAs:mRNAs mediante microarreglo para identificar redes de regulación
- 7) Estudiar la correlación miRNAs:proteínas para establecer medidas más directas acerca del efecto local de estas moléculas. Esto puede ser medido por técnicas muy novedosas como MIMS (REF) (*Multi-isotope imaging mass spectrometry*) que mide la incorporación de  $^{15}\text{N}$  in vivo y determina su localización subcelular mediante espectrometría de masas digitalizada, qRT-PCR multiplexado para dar mejor precisión a la expresión de miRNAs y mRNAs, así como qPCR para medir proteínas mediante la técnica de PLA (REF) (*Proximity Ligation Amplification*) donde dos anticuerpos con epítopos cercanos que acarrean fragmentos complementarios de Oligos, pueden ser amplificados y cuantificados como normalmente se hace para medir expresión de genes.
- 8) Medir la interacción de miRNAs:mRNAs a través de miR-TRAP (REF) (*miRNA target RNA affinity purification*) ó PAR-CLIP (REF) (*Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*) que permiten atrapar la interacción entre mRNAs:miRNAs y RNA:Proteína, respectivamente, mediante fotoactivación con luz UV de nucleótidos químicamente modificados con los que "alimentan" las células de interés. Así, mediante inmunoprecipitación se pueden aislar las proteínas de interés (e. g.,

Argonauta) y después analizar el contenido de RNA mediante Deep-Seq (Secuenciación Masiva Multiparalela ó MMPS) por una variedad de plataformas (e. g., Ion Torrent de Life Technologies, MySeq de Qiagen ó minION de Oxford NanoTechnologies).

9) Identificar redes biológicas que muestren las interacciones entre los miRNAs y sus genes blanco en las sinapsis.

## 7.2 La Expresión de microRNAs en Cerebro es Regionalizada.

Cada región analizada mostró una expresión diferencial con respecto a cada una que otorga una firma de expresión adicional a la que ya se ha observado a nivel de exoma. Es probable que este patrón afecte significativamente la función de cada región en cuanto a la expresión de genes intrínsecos a cada área estudiada, y también de que existan patrones crípticos que sólo pueden identificarse mediante una disección más fina a nivel neuroanatómico.

Esta información permitirá dirigir con mayor precisión la selección de miRNAs candidatos para un estudio más profundo en donde se pueda hacer una correlación (directa o inversa) con los mRNAs cuya expresión ya sea conocida para un área en particular. Esto mismo puede hacerse extensivo a nivel de biología del desarrollo para determinar cómo se va adquiriendo progresivamente el patrón de expresión observado en el adulto.

### Perspectivas

- 1) Realizar un estudio multiplexado de expresión de miRNAs maduros y de precursores por separados mediante qRT-PCR (e. g., con sondas Taqman en placas) para cada región del cerebro.
- 2) Identificar la naturaleza de los precursores 100 nt observados mediante NB (e. g., clonación y secuenciación).
- 3) Realizar estudios de correlación cruzada midiendo la expresión de mRNAs localizados en SN para cada área del cerebro. Esto ayudará a determinar cuáles mRNAs pueden ser regulados por miRNAs *in situ*.
- 4) Determinar los patrones de expresión de poblaciones específicas de neuronas en cada una de las subestructuras, mediante técnicas como LCDM (*Laser Capture Microdissection*) y qRT-PCR de célula única.
- 5) Identificar los cambios temporales que suceden en diferentes condiciones fisiológicas como sueño-vigilia, regulación hormonal, aprendizaje y memoria y durante el desarrollo.
- 6) Así mismo identificar estos cambios en el tiempo para modelos patológicos como Parkinson, Alzheimer, Depresión, Autismo, etc.

## 7.3 La Expresión de microRNAs Sinápticos es Regionalizada y Semi-independiente del Soma Neuronal.

La identificación de un patrón de expresión en sinapsis que es independiente al del resto de la neurona le otorga una importancia mayúscula porque ayuda a explicar cómo un sistema de regulación negativa de la expresión génica, puede ayudar a establecer cambios fisiológicos que se suceden bajo condiciones muy precisas (i.e durante la consolidación de la memoria), solamente variando los niveles locales de expresión de genes críticos para tal tarea.

Más aún, este estudio puede ayudar a identificar nodos críticos de regulación por esta vía que estén involucrados en neuropatologías particulares, cuya regionalización subcelular a nivel de sinapsis, aún no se haya tomado en cuenta y que tal vez pudiera ser crítica para una estrategia terapéutica.

Sería muy valioso determinar cómo se suceden los cambios de expresión locales de estas moléculas y su correlación con los mRNAs blanco así como el de los niveles de proteína asociados. El conocimiento preciso de estos procesos proporcionará muchas respuestas que conectan con mayor relevancia los cambios moleculares con los cambios fisiológicos que ocurren en distintas áreas del cerebro y que, finalmente, impactan incluso al comportamiento.

### Perspectivas

- 1) Realizar un estudio global de la distribución subcelular de pri-, pre- y miRNAs maduros mediante ISH en rebanadas de cerebro bajo condiciones normales y alteradas, e. g., durante la inducción de epilepsia por KA.
- 2) Establecer una colocalización con componentes de RISC.
- 3) Identificar las miRNPs y las proteínas que regulan la actividad de los miRNAs en la vecindad sináptica mediante PAR-CLIP, miR-TRAP, etc.
- 4) Identificar los puntos de *crosstalk* que existen entre vías de silenciamiento génico ya caracterizadas en estos sitios.
- 5) Hacer un análisis inteligente a partir de los datos globales de expresión en donde se establezcan fuertes relaciones de correlación, para estudiar con precisión el papel de miRNAs específicos sobre sus blancos. Esto mediante análisis de interacción en geles de retardo, mutagénesis de miRNAs y de MREs en los mRNAs, estudios de distribución intracelular en neuronas en cultivo, determinar el efecto sobre la morfología y función neuronal, etc.
- 6) Dilucidar los mecanismos de translocación de miRNAs (y sus precursores a las sinapsis), identificando la dependencia de movilización mediante microtúbulos y cinecinas (e. g., usando fármacos despolimerizantes), el papel del mRNA blanco (e. g., transfectando miRNAs y blancos artificiales que puedan ser rastreados por microscopía confocal, en estudios de mutagénesis dirigida sobre los MREs, con experimentos de transducción de lentivirus in vivo con que expresen estos marcadores exógenos e identificar su localización mediante nuestro sistema de SN, etc.).
- 7) Estudiar si otros modelos de activación neuronal, bajo condiciones fisiológicas normales (como en el aprendizaje y memoria), provocan similares de expresión de miRNAs sinápticos *in vivo*.

## 7.4 La Actividad Epileptogénica Inducida por KA Altera la Expresión de microRNAs Sinápticos Autónomamente.

El hallazgo de que la sobreestimulación sincrónica repetitiva en el cerebro provocada por el KA sobre la expresión de miRNAs sinápticos es de especial relevancia porque hasta la fecha no existe un análisis similar en mamífero y mucho menos in vivo.

Los cambios observados expresión de miRNAs en las sinapsis ante este tipo de estimulación permiten suponer una relación activa entre el estado neuronal y el procesamiento y/o la actividad efectora de estas moléculas, por lo cual este modelo resulta muy relevante.

### Perspectivas

- 1) Evaluar los cambios globales de expresión de miRNAs y mRNAs simultáneamente en este modelo para establecer con precisión cuáles son los cambios en las redes de regulación basados en los niveles de expresión.
- 2) Determinar con precisión la secuencia de las bandas presentes en las fracciones totales pero ausentes en las de SN, así como de aquéllas que no corresponden con los precursores canónicos.
- 3) Medir con mayor precisión los cambios generados en los miRNAs maduros y sus precursores mediante qRT-PCR usando sondas Taqman.
- 4) Con datos más precisos determinar si las diferencias encontradas entre los datos NB y qRT-PCR son conciliables dentro de un modelo de procesamiento diferencial.
- 5) Utilizar fármacos in vivo (agonistas o antagonistas de receptores como AMPA, KA, NMDA, así como de las vías de señalización involucradas) para diseccionar con precisión cómo participan los diferentes tipos de receptores en los cambios de expresión de miRNAs *in situ*.
- 6) Estudiar las alteraciones de correlación de expresión entre miRNAs y mRNAs en las diferentes modalidades de epilepsia en pacientes de primer ingreso, tratados farmacológicamente, refractarios y tratados quirúrgicamente para establecer modelos y tipos claros de expresión y posibles tratamientos.

## 7.5 La Despolarización Prolongada con Alto Potasio Modifica la Abundancia de microRNAs Sinápticos *in vitro*.

Los cambios de expresión de miRNAs observados *in vitro* fueron, desde mi punto de vista, seminales para mostrar que contenido dentro de esta fracción existe un mecanismo de control que es dependiente de la despolarización prolongada, factor elemental cuando aumenta la eficacia sináptica.

El uso de esta estrategia ventaja metodológica que tendrá que ser aprovechada para identificar los cambios de expresión locales de los miRNAs sinápticos, con el fin de diseccionar las condiciones celulares que alteran la función de estas moléculas *in situ*. Esto se logrará mediante la experimentación con agonistas y antagonistas de diferentes receptores o proteínas de señalización cuya función sináptica ya está demostrada.

#### Perspectivas

- 1) Identificar con precisión a los miRNAs maduros y sus precursores con sondas Taqman en una panel de miRNAs más amplio.
- 2) Medir su expresión en función del tiempo para determinar la tasa de degradación basal vs. la tasa de cambio en condiciones despolarizantes.
- 3) Hacer el experimento en presencia de KA y de otros agonistas de los receptores de KA, AMPA y NMDA, así como de sus antagonistas (disección farmacológica de las vías).
- 4) Medir la dependencia de calcio en este fenómeno así como la dependencia de la actividad de calpaína (que favorece la proteólisis local de Dicer).



# CAPÍTULO VIII

## MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen con todo detalle los protocolos usados en este proyecto, con los cambios a metodologías publicadas en artículos científicos y/o en los *dossier* que incluyen algunos kits disponibles comercialmente, mismos que el lector podrá consultar si así lo desea. La finalidad es denotar las adaptaciones a dichos protocolos que surgen en cualquier proyecto experimental.

### 8.1 Protocolo de Purificación de SN Enriquecidos con PSDs.

Este es un método confiable para la extracción de sinaptoneurosomas de alta pureza, medido por qRT-PCR de marcadores de mRNA de soma y dendríticos así como por WB. Se basa en la centrifugación a través de gradientes isopícnicos (densidad variable) de sacarosa. Con este método también se pueden recuperar otras fracciones como la microsomal, mielínica o la mitocondrial. Éste método resultó ser ideal para conservar la estructura y la pureza sinaptoneurosomal en comparación con otras técnicas de ultracentrifugación. Tomado y modificado de *Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P. J Cell Biol. 1980. Sep; 86(3): 831-45.*

#### **Materiales**

- Tijeras de disección finas y bien afiladas.
- Pinzas de disección de punta aguda.
- Espátula chica y grande de metal.
- Vasos de precipitados de 100mL.
- Pipetas Pasteur de 6" previamente horneadas.
- Bulbos.
- Cajas de Petri de 3" preferentemente de vidrio.
- Filtros Whatman recortados al tamaño de la caja de Petri.
- Homogeneizador de vidrio con pistilo de Teflón (distancia de separación de 0.025mm)
- Taladro con reostato, (velocidad media).
- Rotor tipo JA-17 y SW-40 Ti rotor (Beckman) con tubos apropiados de policarbonato (50 mL) y polipropileno (15 mL), respectivamente, enfriados en todo momento a 4°C.

#### **Reactivos**

Para trabajar con RNA, todos los materiales deberán ser lavados con RNaseZap (Ambion) y enjuagados con agua libre de RNasas (i. e., tratada con DEPC). Se recomienda usar todas las soluciones tan frescas como sea posible, para evitar la contaminación por hongos. Mantenerlas a 4 °C máximo por una semana.

#### **Soluciones (ver Apéndice IA)**

Sacarosa

- 1.2 M
- 1 M
- 0.85 M
- Solución "A"
- Solución "B"
- PBS (100 mL dividido en dos vasos de precipitados. Enfriar en hielo por al menos 10 min).

## Diseción

Para el presente estudio, a menos que se indique lo contrario, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano gaseoso (2% vol/vol) durante 2-5 min por vía aérea. Diversas instituciones requieren anestesiarse a los animales antes de ser sacrificados como parte de los protocolos de cuidado animal.

Disecione el cerebro de una rata macho de 200-250 g de peso después de decapitar. Retire la piel y corte el cráneo con las tijeras de disección, justo entre los ojos y uno desde el orificio auricular hasta la articulación maxilar. Esto permitirá abrir el cráneo desde el centro superior. Enseguida corte con las tijeras finas (de preferencia anguladas a 45°) justo sobre la fisura central hasta llegar a la primera incisión ocular. Procure no insertar demasiado la punta pues el tejido cerebral se rompe y comienza un daño importante. Retire los huesos frontal, temporal y parietal con las pinzas de punta de forma lateral. Remueva el cerebro con una espátula, empujando desde el tallo cerebral hacia arriba, pero direccionando el cráneo disecado hacia el vaso de precipitados con PBS frío. Procure traer el bulbo olfatorio completo cortando cuidadosamente los huesos nasales antes de retirar el cerebro. Si no es posible, se puede retirar después.

Retire tanto tejido meníngeo como sea posible con las pinzas de punta y retire también los coágulos. Realice la disección de las partes a analizar sobre un filtro Whatman pre-humedecido con PBS frío y dispuesto sobre la caja Petri invertida, siempre sobre el hielo. Puede disecar el cerebelo y el tallo, cortando con la espátula de metal y colocándolos en PBS pre-enfriado. Cada hemisferio puede ser dividido también con la espátula. Para obtener el hipocampo y la corteza, remueva con la espátula el hipocampo y esponja desde adentro hacia afuera. Con unas tijeras puede cortar hipotálamo, estriado, tálamo y otras áreas interiores en forma de pequeños filetes, hasta que no haya materia blanca visible. Esto se considera como la corteza.

Si se trabaja con cerebro completo, cada hemisferio puede ser procesado aparte y en total se obtiene cerca de 1g de tejido. Con otros tejidos, se recomienda usar más de una animal por tejido. Tenga cuidado de no usar mayor masa pues esto contamina con glía y otros detritus a la fracción sinaptoneurosomal.

## Homogeneización y Centrifugación

1. Homogeneice a velocidad media el tejido en 4 mL de solución A más 30 U/mL de inhibidores de RNAsas (e. g., RNase OUT de Invitrogen). Mantenga en hielo en todo momento. Aplique entre 8 y 12 golpes de forma vertical en ángulo recto para evitar la inclusión de burbujas, hasta que la mezcla se vuelva homogénea (demasiados golpes producirán daño importante en las mitocondrias y otros organelos, contaminando la fracción SN). La presencia de burbujas favorece el rompimiento de membranas. En este punto puede tomar una alícuota de 50  $\mu$ L para analizar proteína o RNA.
2. Vacíe la el homogenado en un tubo pre-enfriado de policarbonato (cap. 50 mL) y mantenga en hielo. Centrifugue a 1,400 x g por 10 min en un rotor JA-17 (Beckman) o similar, a 4 °C. Con una pipeta Pasteur retire el sobrenadante con cuidado y repita la operación. Importante mantener en hielo en todo momento. Procurar no introducir burbujas al momento de pipetear. Recuerde balancear los tubos antes de Centrifugar.
3. El sobrenadante se coloca en un tercer tubo de 50 mL pre-enfriado y se centrifuga a 13, 800 x g por 10 min a 4 °C.
4. En esta fase el sobrenadante se descarta y el pellet se resuspende en aproximadamente 4 mL de solución B fría, triturando con la pipeta Pasteur al subir y bajar la mezcla. No introducir burbujas y realizar la operación en hielo.
5. Colocar aproximadamente 2 mL del homogenado sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (2mL de sacarosa por capa de 0.8 M:1.0 M:1.2 M, de arriba a abajo) previamente enfriado a 4 °C en un tubo de 15mL de polipropileno apropiado. Balancear los tubos preferentemente en una balanza granataria calibrada. Mantener en frío tanto como sea posible. Se recomienda hacerlo en un cuarto frío.
6. Centrifugar a 82, 500 x g por 120 min en un rotor SW-40Ti a 4 °C.
7. La tercera interfaz (color blanco grisáceo) se retira con una pipeta Pasteur. Una vez afuera es posible que el agua del aire se precipite sobre el tubo e impida una adecuada visibilidad, por lo que se recomienda secar con un paño. Ajustar el volumen a 1-2 mL con solución B.
8. Colocar el sobrenadante sobre una cama de 2 mL de sacarosa de la solución de sacarosa 1 M en un tubo limpio de polipropileno de 15 mL pre-enfriado y Centrifugar una vez más por 120 min con los mismos parámetros.

9. Al finalizar, retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur desde la superficie hacia abajo y resuspender en 500 uL de solución B fresca y pre-enfriada. Se pueden tomar 50 uL de muestra para WB o TEM. Se agrega 1 mL de Trizol\*\* (Invitrogen) y se mezclan por inversión 15 veces, sin agitar, en un tubo eppendorf de polipropileno de 2 mL preferentemente, o bien, en 2 tubos de 1.5 mL. Mantener en hielo por al menos 15 min (o toda la noche a -70 °C si se quiere almacenar) y después Centrifugar para extraer el RNA (ver protocolo de purificación de RNA total).

---

\*\* NOTA IMPORTANTE: Antes del paso 9 se puede agregar un RNA artificial (*spike-in*) en el volumen total de Trizol que se va a utilizar (5 nM final) para poder normalizar los efectos del pipeteo. Como la amplificación será un evento empírico, se recomienda hacer una curva estándar para delimitar el intervalo dinámico más adecuado.

## 8.2 Purificación y Cuantificación de RNA.

Este protocolo se basa en el que provee Invitrogen con el Trizol, pero que fue modificado para reducir al máximo la contaminación por fenol al final de la extracción. Alternativamente puede utilizarse el kit RNeasy (Qiagen) a partir de las muestras SN, siguiendo su protocolo al pie de la letra. Revisar su sitio de internet (<http://www.qiagen.com>). Este se recomienda para la purificación de RNAs 200nt.

### Para RNA total (Trizol)

1. Descongelar las muestras a T.A. (25 °C).
2. Invertir tres veces las muestras para homogeneizar la suspensión.
3. Centrifugar a 4 °C a 13, 000 x g por 10 min.
4. Separar la fase acuosa (aprox. 500 uL) lentamente con una punta de 200 uL, cuidando que no toque la base de la pipeta. La tensión superficial suele ser muy baja y se levanta rápidamente el líquido dentro de la punta. Al reducir el menisco es posible que se arrastre una gota rosácea (fase orgánica) que es preferible regresar bajando nuevamente un poco de líquido hasta que salga. En su defecto centrifugue nuevamente.
5. Colocar en un tubo nuevo y añadir un vol. de cloroformo. Agitar con vórtex por al menos 15 s.
6. Centrifugar por 2 min a 13, 000 x g.
7. Separar nuevamente la fase acuosa (superior) y verterla en un tubo nuevo (aprox. 200-300 uL).
8. Aforar a 500 uL con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y agregar un vol. de cloroformo.
9. Centrifugar por 2 min, separar la fase acuosa y colocarla en un tubo nuevo. Agregar 1 mL de isopropanol y mezclar por inversión.
10. Agregar 2 µM de acarreador, ya sea glucógeno o acrilamida lineal. Mezclar perfectamente.
11. Congelar a -20 °C por al menos 2 h para precipitar o bien a -70 °C si deja más tiempo.
12. Centrifugar a 13, 000 x g durante 15 min a 4 °C.
13. Retirar el sobrenadante por decantación, cuidando que el pellet (blancuzco casi invisible en algunos casos) no se despegue del tubo. Tenga en cuenta que éste siempre se adhiere a la porción contralateral a la tapa.
14. El resto de líquido retenido puede ser retirado con pipeta. Dejar evaporar durante 5-15 min hasta que el alcohol ya no sea visible.
15. Resuspender con 11 uL de agua libre de nucleasas y agitar cada 5-10 min por al menos 3 veces.
16. Usar 1 uL de la muestra para cuantificarla en un espectrofotómetro (i. e., Nanodrop, Agilent).
17. Se espera que la relación 260/280 nm (280 nm mide proteína) sea superior a 1.8 al igual que a 260/320, que mide la contaminación con fenol. Si no es el caso, será necesario volver a precipitar con el método descrito, agregando agua y 1 vol. de fenol:cloroformo:cloroformo (esto quiere decir que se añade un paso más de mezcla con cloroformo). Seguir los pasos desde el punto 8. NOTA: Es posible trabajar con un nivel aceptable de confianza si la relación 260/320 es mayor a 1.6. Valores inferiores afectan gravemente las reacciones enzimáticas subsecuentes.

### Para RNA de bajo peso molecular (LMW, 200nt, Qiagen)

Se puede usar el método de miRvana (Ambion-Life Technologies) pero tiene ciertos problemas. El primordial es que las columnas tienen baja retención del RNA y he determinado que las columnas del kit RNAEasy (Quiagen) tienen mayor rendimiento. Se recomienda comprar la versión de 500 columnas.

Este método se basa en la capacidad de las moléculas de RNA en precipitar diferencialmente en función de su tamaño y de la concentración de etanol circundante, por lo que se observado que en presencia de 1/3 de volumen de etanol, se precipitan muy fácilmente las moléculas 200 nt de longitud, incluidos los mRNAs.

Se recomienda usar una masa mínima de 1-5  $\mu$ M de RNA total para precipitar.

1. A partir del paso 9. del protocolo anterior, utilizar ETANOL al 85% (EtOH) en  $\mu$ Mar de isopropanol. Agregar 1/3 de volumen a la fase acuosa recuperada y mezclar por inversión (5-7veces). Usualmente se recuperan 350-450  $\mu$ L. Es importante asegurarse del volumen de trabajo antes de proceder a la adición de EtOH. Recuérdese que las columnas tienen una capacidad máxima de 700  $\mu$ L, por lo que será posible que se tenga que repetir la centrifugación para eluir completamente toda la muestra.
2. Eluir en una columna la nueva solución, centrifugando a 8,000 x g por 2 min. Es importante RESCATAR el líquido eluido pues en él están disueltos los miRNAs y otros snRNAs.
3. Adicionar  $\geq 2/3$  de volumen de EtOH a la muestra eluida y mezclar por inversión.
4. Eluir la muestra en una NUEVA COLUMNA, centrifugando por 2 min a 8,000 x g. Repetir la operación si el volumen es superior a 750  $\mu$ L. Descartar el líquido eluido.
5. Agregar 700  $\mu$ L de buffer RW1 a cada columna. Para este momento se deben tener 2 columnas por muestra biológica. La primera tiene RNA de alto peso molecular (HMW) y la segunda RNA de bajo peso molecular (LMW).
6. Centrifugar, descartar el eluido.
7. Agregar 500  $\mu$ L de buffer RPE (previamente suplementado con 4 volúmenes de EtOH absoluto), centrifugar por 15 s, descartar el eluido y repetir la operación. Es muy importante asegurarse que las columnas no tengan trazas de etanol en las orillas antes de realizar el sig. paso. Si es así, centrifugue de nuevo.
8. Colocar las columnas sobre un TUBO COLECTOR NUEVO y agregar 30  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Dejar reposar por 1 min y centrifugar por 1 min extra. NOTA: El agua puede ser calentada a 60 °C antes de adicinarla, con lo que se maximiza la solubilización del RNA.
9. El RNA resuspendido puede ser cuantificado inmediatamente. Se espera que con este método el rendimiento sea muy alto. Si las relaciones 260/280 y 260/230 nm no son las óptimas, puede repetirse la operación con el método anterior a partir del paso 8.

¡Felices extracciones!

## 8.3 Análisis de la Integridad del RNA por PAGE.

Si se cuenta con suficiente masa, es posible utilizar un gel desnaturante de acrilamida para determinar la integridad del rno-rRNA 5 (120 nt) y rno-rRNA 5.5S (158 nt) así como las bandas que corresponden a los tRNAs (70-90 nt). Si el RNA no está íntegro, se observa un barrido en las tres bandas mencionadas.

Este método, con pequeñas modificaciones, es íntegro al que viene en el inserto del kit de Ambion miRVana (Life Technologies) para purificar RNAs de bajo peso molecular.

### Soluciones

(ver Apéndice IC)

- TBE 10X
- Urea (8 M final)
- Acrilamida al 30% (Acril:bis-acrilamida, 19:1).
- Buffer desnaturante de cargado (II).
- Persulfato de Amonio (PSA, 10%). NOTA: No usar PSA más viejo que un mes.
- TEMED

Para preparar el gel (15mL)

Cantidad	Reactivo
7.2 g	Urea
1.5 mL	10X TBE
5.6 mL	40% acrilamida (acryl:bis acryl = 19:1)
	Aforar a 1.5 mL con agua libre de nucleasas (NO DEPC)
	Mezclar por inversión continua calentando con la mano
75 µL	10% PSA
15 µL	TEMED

Una vez polimerizado y con el peine retirado, se debe enjuagar con agua bidestilada el exceso de UREA cristalizada.

Se monta en la cámara y se agrega TBE 0.5-1X para la electroforesis. Se puede diluir en el momento de usar a partir del stock 10%. Usualmente se requieren 500 mL.

El gel se debe pre-correr a 100 V por 10-15 min para movilizar parte de la UREA acumulada en diversos puntos.

### Para preparar las muestras

1. Usar 100-200 ng de RNA total (o purificado de bajo peso molecular; ver método anterior) para cargar en el gel. Si se realiza NB, se recomienda usar de 1 a 5 µM para maximizar la señal (Ver protocolo 8.7 de NB para más detalles). Utilizar un volumen máximo de 15 µL por muestra, si no es posible que no quepa en el pozo.
2. Adicionar 1 volumen de Buffer de Carga II (usualmente incluido en los kits de Ambion) y calentar la muestra. NOTA: Hacer lo mismo para el marcador de peso molecular (MWM) SI Y SÓLO SI se va hacer un ensayo de NB. En este caso siempre se usó la escalera de 10-150 nt de Ambion (#Cat. AM7778 con 10 reacciones). Se usa 1 µL por gel. Es posible prescindir de la escalera si sólo se va a revisar la integridad del RNA. Recuerde ahorrar dinero y tiempo.
3. Calentar las muestras a 95 °C por 5 min. Enfriar en hielo por 2 min y centrifugar.
4. Mantener en hielo todo el tiempo.



5. Antes de cargar el gel es **IMPORTANTE** desplazar la UREA en difusión de cada pozo. Esto puede hacerse con una pipeta pasteur de punta corta y un bulbo. Desplace en ángulo subiendo y bajando una par de veces el exceso de urea usando el buffer de corrida (TBE 0.5-1X). Cargar la muestra inmediatamente. Omitir este paso ocasiona que la migración de las bandas no sea la adecuada pues la UREA causa un retardo en la migración por efectos de la densidad.
6. Se aconseja correr el gel hasta que la banda de azul de bromofenol del primer frente casi se salga. La electroforesis puede realizarse a 100-150 V por 30-60 min. En ocasiones una corrida lenta puede favorecer una mejor resolución de las bandas. Esto será empírico.
7. Para revelar las bandas, el gel se baña en buffer TBE0.5X con 0.5-1  $\mu\text{M}/\text{mL}$  de Bromuro de Etidio (EtBr) por 5min en agitación lenta. Se lava el exceso en buffer fresco en agitación por 10-15 min y se observa al transiluminador de luz UV. Las bandas deber ser perfectamente definidas.

## 8.4 Electroforesis Capilar en Chip (Bioanalyzer, Agilent).

La electroforesis en chip tiene la virtud de poder analizar la integridad del RNA de hasta 12 muestras simultáneamente utilizando solamente 20-200 ng de material.

El principio del análisis se basa en la electroforesis capilar en la que el RNA fluye a través de un gel desnaturizante que se encuentra embebido en un microcanal grabado en vidrio. Al RNA se le incorpora un agente intercalante fluorescente cuya unión es directamente proporcional a la longitud de la molécula; semejante al principio seguido con la tinción de EtBr.

Cuando se aplica una corriente eléctrica, el RNA fluye y pasa a través de un haz de luz láser que excita al fluoróforo, mismo que emite luz en una longitud de onda específica que es captada por un detector. La fluorescencia se mide en función del tiempo por lo que se genera un gráfico con “picos” de intensidad de fluorescencia (tal y como se esquematizó en la Fig. 4.2.2).

Con esta información se puede representar de forma digital un “gel virtual” y se puede asignar una número de integridad del RNA denominado RIN (*RNA Integrity Number*) que es un índice que mide la geometría de los picos prominentes que corresponden al los rRNAs 5S y 5.5S.

### Para preparar el gel

1. Filtrar por centrifugación, 550 uL de la matriz de gel RNA 6000 Nano en un tubo con filtro integrado.
2. Centrifugar a 1500 x g por 10 min a T.A. y hacer alícuotas de 65 uL que se guardan a 4 °C.

### Para preparar la mezcla con el colorante (referencia pasiva)

1. Dejar que el colorante se atempera a T.A. por 30 min.
2. Vortexear y centrifugar por 10 s.
3. Añadir 1 uL a una alícuota de gel.
4. Vortexear y centrifugar a 13, 000 x g por 10 min a T.A. Preparar solamente la mezcla que se usará en ese momento.

### Para cargar el gel en el chip

1. Coloque un chip RNA 6000 Nano en el adaptador y coloque 0.9 uL de la mezcla gel-colorante en el pozo marcado para ese propósito.
2. Presione el émbolo previamente posicionado en la marca a 1 mL, hasta que se ancle al seguro.
3. Esperar 30 s y liberar el seguro, esperar 5 s y luego levantar el émbolo.
4. Agregar 0.9 uL de la mezcla anterior en todos los pozos marcados.

### Para cargar el colorante (referencia activa)

1. Coloque 5 uL del del colorante en cada pozo donde se cargarán las muestras y el marcador de peso molecular (MWM).
2. Para desnaturizar las muestras

3. Calentar a 70 °C por 2 min cada tubo con RNA y enfríe en hielo inmediatamente, mantenga por 5 min en el hielo y centrifugue momentáneamente para bajar la muestra al fondo del tubo.

**Para cargar el MWM y las muestras**

1. Pipetee 1 uL de la escalera en el pozo indicado para ello.
2. Agregue 1 uL de RNA por cada muestra a cada uno de los pozos.
3. Agite durante 1 min con el adaptador para el vórtex a 2400 rpm.
4. Inicie la electroforesis antes de 5 min y déjese proceder durante 15 min aproximadamente.

¡Felices trazos!

## 8.5 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

La preparación de las muestras usualmente corre a cargo de los encargados de las unidades de microscopía electrónica de cada institución, por lo que no es necesario describir con todo detalle la metodología de fijación. Solamente se describen los pasos generales que se utilizaron para el presente estudio.

1. Resuspender los SN en 500uL de buffer PBS.
2. Fijar con buffer de Karnovsky (Formaldehído/Glutaraldehído 0.1M en Buffer de fosfatos de Milloning).
3. La post-fijación se hace con buffer de Tetróxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% por 1h.
4. Las muestras se deshidratan mediante inmersión progresiva en soluciones de etanol cada vez más concentradas y al final se embeben en un coctel de resina Epon-Araldita.
5. Las secciones se realizan con un ultramicrotomo con navaja de diamante y se montan en rejillas de oro.
6. Las secciones se tiñen con Acetato de Uranilo (50%) y luego se sumergen en una solución de Citrato de Plomo (0.5%), para después lavarse con agua bidestilada libre de  $\text{CO}_2$  por 2 min (tinción de Reynold).
7. Las muestras se observaron en un microscopio JEM-100CXII (JEOL LTD. Tokio, Japón) a magnitudes de 10, 000-60, 000X. Las condiciones de voltaje y apertura son manipuladas por el operador especializado.

## 8.6 Western blot (WB).

En este método se utilizó la siguiente estrategia general:

Para preparar las muestras

1. Tomar 50 uL de cada muestra a analizar y añadir en 450 uL de buffer de lisis enfriado en hielo (Ver apéndice IB). En este punto las muestras pueden ser congeladas a -20 °C hasta que se requieran.
2. Usar de 5-10 uL de una dilución 1:10 en buffer de lisis para cuantificar la concentración de proteína por el método de MicroBCA (Pierce-ThermoScientific).
3. Adicionar a un tubo el volumen adecuado para alcanzar una masa de proteína de 10-25 µM.
4. Adicionar buffer de desnaturalización y calentar a 90 °C por 5 min, enfriar en hielo y Centrifugar por 2 min.
5. Rescatar el sobrenadante pasarlo a un tubo nuevo.

Para electroforesis y transferencia

1. Se utilizaron los geles, membranas y buffers de Invitrogen para realizar el análisis.
2. Cargar volúmenes idénticos de proteína desnaturalizada (no mayor a 40 uL) en un gel precorrido de acrilamida (4-12%) a 20 mA/h en buffer MOPS 1X (comercial). Siempre se realizó con 2 geles en paralelo.
3. Las muestras fueron transferidas en húmedo (condiciones estándar, 15-25 mA/h) a membranas de PVDF cargadas positivamente (Invitrolon) usando MOPS 1X con la misma corriente constante y usando bloques de hielo a los costados para evitar el sobrecalentamiento.
4. Las membranas fueron bloqueadas con 10-15 mL de solución de bloqueo por 2 h a 4 °C en agitación constante.
5. Antes de incubarlas con los anticuerpos primarios, las membranas deben ser lavadas con PBS 1X tres veces por decantación.

Para bloqueo con anticuerpos primarios

1. Los anticuerpos usados fueron diluidos como se indica en la tabla a continuación:

Anticuerpos Primarios							
Ab	Tipo	Hosp.	Desarrollador	Origen	Dilución	Vol	Proveedor
<b>Ago1-4</b>	Mono (4F9)	Mouse	--	Santa Cruz, CA--	1:1, 000	5 mL	Santa Cruz Biotech
<b>Ago2</b>	Poly	Rabbit	--	Billerica, MA	1:1, 000	5 mL	Upstate/Millipore
<b>β-actin</b>	Mono (mAbcam 8226)	Mouse	--	Cambridge, MA	1:10, 000	5 mL	Abcam
<b>FMRP</b>	Mono (7G1-!)	Rat	Stephen T. Warren	Emory University Med School	1:5, 000	5 mL	DSHB
<b>NeuN</b>	Mono (A60)	Mouse	--	Temecula, CA	1:100	5 mL	Chemicon/Millipore
<b>NMDAR1</b>	Poly	Rabbit	--	Temecula, CA	1:1, 000	5 mL	Chemicon/Millipore
<b>Psd-95</b>	Mono (7E3-1B8)	Mouse	--	Rockford, IL	1:2, 000	5 mL	Affinity Bioreagents
<b>Sv2</b>	Mono (SP2/0)	Mouse	Kathleen M. Buckley	Harvard Med. School	1:1, 000	5 mL	DSHB
<b>Synaptotagmin</b>	Mono (asv48)	Mouse	Louis Richrdt	UCSF	1:500	5 mL	DSHB
<b>Tuba1</b>	Mono (AA4.3)	Mouse	Charles Walsh	University of Pittsburgh	1:1, 000	5 mL	DSHB
<b>TuJ1 (Tubβ3)</b>	Mono (TUJ1-15-79)	Rabbit	--	Princeton, NJ	1:1, 000	5 mL	Covance

NOTA: El anticuerpo 4F9 detecta las 4 isoformas de las proteínas de Argonauta de humano, rata y ratón (elF2C1-4).

Hosp., especie hospedera en donde se generó el anticuerpo.

DSHB, *Developmental Studies Hybridoma Bank* (<http://dshb.biology.uiowa.edu/>). Estos anticuerpos fueron comprados en forma de sobrenadantes de cultivo.

2. Los anticuerpos fueron diluidos en buffer de bloqueo (de anticuerpos) e incubados por 8-16 h a 4 °C en agitación constante.
3. Para remover el exceso de anticuerpo, las membranas fueron lavadas 5 veces cada 10-15 min con 10 mL PBS 1X a T.A. en agitación constante.
4. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP (anti-mouse ó anti-rabbit) se incuban por 1 h a T.A. en diluciones 1:20, 000 y 1:50, 000 respectivamente en PBS 1X + Tween-20 (1%).
5. Al terminar se vuelven a lavar como en el paso 2.
6. La expresión se mide por quimioluminiscencia utilizando las instrucciones del kit ECL Plus de Pierce-Amersham y las instrucciones que ahí vienen (<http://tiny.cc/4yn1ew>).
7. Las imágenes se obtienen por autorradiografía (Hyperfil ECL, Amersham-GE) o bien con una cámara CCD (Gel Logic 220 Image Station, Kodak, Inc.), de acuerdo con los lineamientos estándar. Las exposiciones se establecen empíricamente.
8. Para reutilizar las membranas se utiliza el buffer comercial de *stripping* (Restore Plus Western Blot Stripping Buffer, #Cat. 46430, Pierce-ThermoScientific) incubando por 5 min a 37 °C y lavando con PBS 1X.
9. Las membranas pueden reutilizarse hasta por 5 ocasiones sin pérdida notable de la señal, aunque estas condiciones son establecidas empíricamente.



## Consideraciones Previas para el Trabajo con Radiactividad

Antes de describir los métodos que utilizan radiactividad para cuantificar la expresión de un grupo de genes es necesario hacer algunas consideraciones con respecto a la seguridad.

### IMPORTANTE

- Portar bata todo el tiempo.
- **Usar doble guante.**
- Disponer de los residuos líquidos y sólidos en mamparas de acrílico de al menos 1 cm de espesor.
- **No usar calzado descubierto cuando se maneje radioactividad.**
- Confinar el uso de reactivos e instrumentos a un área cerrada.
- **Desechar la basura de acuerdo con los lineamientos establecidos por la institución donde se labore.**
- Portar tubos y reactivos marcados en gradillas de acrílico especialmente diseñadas y marcadas para tal propósito.
- **Utilizar pipetas únicamente para esa función así como puntas con filtro.**
- Nunca colocarse detrás de bloques metálicos como aluminio (excepto plomo) cuando haya elementos radiactivos como el  $^{32}\text{P}$ , pues esto ocasiona la exposición a radiación alfa ionizante. Recuérdese que este tipo de radiación es la más peligrosa.
- **Llevar un registro preciso de la cantidad de radiactividad recibida, utilizada cada día de experimento y residual, para llevar un control exacto, mismo que será necesario durante el desecho de los residuos o en caso de un accidente.**
- Si se está expuesto a la contaminación por radiactividad es necesario quitarse los accesorios expuestos como guantes, bata o prendas y almacenarlos en lugares adecuados. Se deberá determinar con precisión los sitios con mayor actividad radiactiva mediante el uso de un contador *Geiger*, ajustado para medir la radiación del isótopo en cuestión. Siempre hay que tener especial cuidado en vigilar que este instrumento no está contaminado de forma alguna.
- **Si hay alguna parte del cuerpo afectada, se deberá limpiar con sanitas humedecidas desechadas apropiadamente y posteriormente ser lavadas con agua y jabón abundantes, suficiente como para determinar con el detector que ya no se presenta más actividad.**
- Dado que el  $^{32}\text{P}$  tiene una  $T_{1/2}$  de 14.29 días, se requiere al menos del doble de tiempo para tener un 25% de actividad, lo que implica que al menos deberá ser almacenado por 1 mes o más.
- **Existen sprays que pueden facilitar la limpieza de áreas contaminadas, los cuales tienen que estar a la mano para una emergencia.**
- Lo más importante es no solamente cuidarse como usuario, sino también a los demás, por eso es de especial cuidado mantener limpias las áreas de uso común, limitando al máximo la exposición de fuentes radiactivas hacia áreas con acceso colectivo. Por eso, es necesario evitar mover aparatos y reactivos en áreas transitadas.
- **Es indispensable llevar un control de contaminación de superficies e instrumentos utilizados realizando frotis frecuentemente con trozos de papel filtro (Whatman) remojado ligeramente en agua. Se frota superficies previamente registradas en una lista y los filtros monitor se meten en frasquitos para contador de centelleo con 3 mL de agua desionizada. Las superficies aceptables deben tener 300cpms. Si es mayor, las superficies deberán ser limpiadas cuidadosamente o bien puestas en cuarentena hasta que la actividad haya decaído.**

Con esto en mente es posible realizar los experimentos que a continuación se reportan.

## 8.7 Dot blot (DB).

El ensayo de DB permite explorar la expresión de un grupo de genes a modo de una versión casera de microarreglo, pues la mayor diferencia, no radica en la plataforma sino en la densidad de variables.

En este caso se utilizó para cuestionar la abundancia de miRNAs cuyos blancos predichos ya habían sido reportados cercanos a las sinapsis. Se utilizó el protocolo reportado en *Krichevsky, A. M., K. S. King, et al. (2003). "A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development." RNA 9(10): 1274-1281.*

El protocolo consta de dos fases: la de fijación de las sondas a una membrana de nylon y la de hibridación de una poza de RNA marcada con radiactividad.

### Diseño de sondas

El diseño de las sondas se hace con base en las secuencias que se quieren explorar, en este caso de miRNAs maduros así como otras dirigidas a hacia regiones del "loop" en los precursores. El tamaño de las sondas está restringido por los blancos, pero es posible aumentar la sensibilidad acortando la sonda 1-3 nt en la región 3' del blanco, cuidando que la Tm no decaiga más de 10 °C por debajo de 55 °C. El intervalo de Tm oscila entre 50-80 °C ya que está restringido por las secuencias endógenas de los miRNAs. En este estudio se seleccionaron miRNAs con tres criterios:

- Que sus blancos ya hayan sido encontrados en mRNAs de localización dendrítica.
- Que su expresión ya haya sido demostrada en cerebro y ésta sea alta.
- Que contengan, si es posible, más de un MRE predicho por el algoritmo miRanda.

Como control positivo se pueden utilizar sondas dirigidas a tRNAs, rRNAs u otros ncRNAs. En este caso se dirigieron contra tRNAs (Phe, Arg, Lys y Asp) y un snoRNA bien caracterizado en dendritas, BC1 (200 nt).

Como control negativo se diseñaron secuencias para un miRNA muscular (rno-miR-1) y de hígado (rno-miR-122, así como una sentido para BC1.

Hacer alícuotas a una concentración de 10 uM de cada sonda.

### Preparación de las membranas

Recortar una membrana de nylon nitrada (Amersham), misma que se utiliza para NB, con un tamaño de 6 por 4 cm. Es necesario manejarla desde una esquina con pinzas delgadas y si se requiere marcar sólo hacerlo con un lápiz muy ligeramente.

La matriz debe ser consistente, por lo que es elemental tener un esquema del mapa de sondas.

Colocar un papel filtro Whatman debajo de la membrana. Se recomienda fijar con cinta adhesiva las esquinas de la membrana ya que tiende a curvarse con facilidad.

Con una pipeta multicanal gotear 2-3 uL de sonda sobre la membrana. Dejar secar.

Entrecruzar con NaOH (100 mM) por 5 min y lavar brevemente con Buffer de Neutralización (Apéndice ID).

Lavar con buffer de lavado (Ap. ID) a 72 °C por 30 min. Si se quieren almacenar las membranas se utiliza una solución de SDS 0.2% y se guardan a 4 °C.

### Marcaje de RNA

Calentar a 80 °C por 3 min el RNA total (5-10 µM) o bien de bajo peso molecular (1 µM, 200 nt) para desnaturalización.

Utilizar el protocolo de recambio de P (Exchange) de la enzima Polinucleótido Cinasa de T4 (Invitrogen) que se explica en el recuadro siguiente (NB). Para marcar se usan 30 uCi de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP 6000 uCi/mmol (PERKin-Elmer).

Reacción de Intercambio de P (Exchange)		Vol. final: 25uL
Reactivo	Cantidad	Volumen
RNA	1-10 $\mu$ M	—uL
5X Exchange Buffer	—	5 uL
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (6000 mCi/mmol)	10 uCi	5 uL
T4 PNK (10 U/uL)	5 U	0.5 uL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	—	Aforar a 25 uL
Incubar por 10 min a 37 °C		
Detener la reacción con EDTA 5 mM e inactivar a 65 °C por 10 min		

El exceso de marca no incorporada se limpia haciendo pasar el RNA a través de columnas de Sefarosa G50 (Amersham). La marca libre queda atrapada en la columna de acuerdo con la porosidad de la sefarosa. Se usa el protocolo incluido en el producto sin modificaciones.

### Hibridación de la Membranas

1. Pre-hibridar las membranas a 37 °C por al menos 30 min (usualmente por 2 h) con 10-15 mL de Buffer de Prehibridación casero (Apéndice IC) o bien comercial. Esto se realiza en frascos bien sellados para horno rotatorio de hibridación, preferentemente con volúmenes pequeños para concentrar la marca. Precalear el horno antes de incubar las membranas. La velocidad debe ser media (15-20 rpm).
2. Decantar y agregar 5 mL de buffer de pre-hibridación más la marca.
3. La hibridación se lleva a cabo a velocidad baja (5-10 rpm) a 37 °C durante 8-12 h. Al final el buffer con marca se guarda a -20 °C si se quiere usar una vez más.
4. Lavar con 10 mL de buffer de lavado I (SDS 2%, Ap. ID) por dos veces cada 10 min a 37 °C. Cada lavado se hace con mucho cuidado extrayendo el líquido con pipeta de 10 mL.
5. Se realiza un último lavado con 15 mL de buffer de lavado II (SDS 1%) a 37 °C por 15 min. Éste se puede decantar en la tarja para no acumular demasiado volumen de desechos líquidos. La radiactividad en este paso es despreciable.
6. Las membranas se sacan del frasco con unas pinzas siempre tomándolas desde una esquina. Éstas se colocan en una envoltura plástica de *Saran Wrap* (Kleenpack) o bien en portaacetatos recortados.

### Exposición y Revelado

1. Las membranas se exponen a una pantalla de Phosphorimager pre-blanqueada durante 8-10 h. Se reporta que desde 2 h puede verse la señal, pero se maximiza de forma acumulativa en el tiempo. Para miRNAs es necesario dejarla el tiempo indicado, pero esta variable se debe establecer empíricamente.
2. Las placas se sacan del cassette de exposición y las membranas se retiran. Se coloca la placa dentro del cassette y se escanean en un instrumento *Typhoon* (Molecular Dynamics). Se recomienda establecer la densidad a 100 píxeles si se escanean membranas con baja señal o que se tengan varias.
3. ¡No olvidar blanquear la membrana antes de reutilizarla!
4. Las imágenes pueden ser analizadas mediante el software del *Typhoon ImageQuant* (Molecular Dynamics) o bien mediante ImageJ (NIH).

## 8.8 Northern blot (NB).

Esta metodología está orientada a la detección de fragmentos de RNA mediante la hibridación de un oligonucleótido, de DNA, RNA o de variantes químicas (LNAs, Morfolinos, 2-O-metil-oligos, etc), mismo que está marcado enzimáticamente con el radionúclido beta,  $^{32}\text{P}$ . La detección se hace por autorradiografía a partir de una membrana de nylon nitrado, a la que le fue transferido y entrecruzado el RNA resuelto a través de PAGE en condiciones desnaturalizantes.

Para los ensayos que se mostraron en la presente tesis, se muestra el protocolo usado para medir la expresión de microRNAs.

### Para marcar el RNA purificado (<200 nt)

1. Purificar el RNA de acuerdo con el protocolo 8.2 de esta sección.
2. Marcar el RNA con 10 uCi de  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  (6000 uCi/mmol) según el siguiente protocolo de marcado directo (*forward*), adaptado del inserto de la enzima T4 PNK de Invitrogen (Life Technologies).

Reacción Directa (Forward)		Vol. final: 25uL
Reactivo	Cantidad	Volumen
Oligo (desalado a 20 uM)	20 pmol	2.5 uL
5X Forward Buffer	—	5 uL
$\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (6000 mCi/mmol)	10 uCi	5 uL
T4 PNK (10 U/uL)	5 U	0.5 uL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	—	12 uL

Incubar por 10 min a 37 °C

Detener la reacción con EDTA 5 mM e inactivar a 65 °C por 10 min

3. Limpiar el exceso de marca con columnas de sefrosa de G25 (Amersham) según su protocolo. Resuspender en 50 uL de H<sub>2</sub>O final.
4. Usar 5 uL de oligo marcado disuelto 1:100 en agua, para cuantificar en el contador de centelleo (en 3 mL de agua bidestilada).

### Para preparar la membrana

1. Se carga un gel desnaturalizante, previamente corrido como se indicó en la sección 8.2, con 1  $\mu\text{M}$  de RNA (LMW, 200 nt) con un volumen máximo de 30 uL para un gel de PA/Urea 8 M de 1.5 mm de espesor de 7.5 por 12.5 cm). Recuerde que el Buffer de Carga está a 2X por lo que la muestra de RNA deberá tener un volumen de 15 uL. NOTA: Esto siempre se hace detrás de una mampara de acrílico (10mm de espesor). Es importante rellenar con buffer de carga y agua los pozos que no se utilicen para evitar la deformación de las bandas debidas al flujo variable de corriente entre muestras y pozos vacíos.
2. El marcador de peso molecular de RNA (Decade, Ambion) se marca de acuerdo con su protocolo. Se usará 1-5 uL por gel, usando 1 uL de  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  (6000 uCi/mmol). El volumen de marcador dependerá de la actividad remanente de radiactividad, esto se establece empíricamente. La escalara alcanza para 20 geles si se usa fresca.
3. Se corre a 100-200 V en TBE 1X hasta que el primer frente casi se haya salido (30-90 min). Es conveniente que se revise la corrida pues a veces se prefiere una corrida lenta para permitir mejor definición de las bandas.
4. El gel se corta en una esquina con una espátula para marcar la orientación y se le quitan los fragmentos correspondientes a los pozos.
5. El gel se coloca sobre una membrana nitrada de nylon (Amersham) del mismo tamaño que el gel. Ésta deberá estar prehumedecida sobre 3 hojas de papel filtro (ó bien una gruesa) con buffer TBE 0.5%. El sándwich se cierra con otras hojas equivalentes prehumedecidas sobre el gel. Recuerde establecer perfectamente la dirección de la transferencia. Usando la cámara de transferencia semiseca (Biorad) se coloca así:

Orientación de la Transferencia	Cámara de Biorad
Dirección de corriente	<b>(-) Polo Negativo (tapa superior)</b>
	Filtro Whatman (3 hojas delgadas)
	<b>GEL ORIENTADO ADECUADAMENTE</b>
	MEMBRANA PREHUMEDECIDA
	Filtro Whatman (3 hojas delgadas)
	<b>(+) Polo Positivo (placa metálica)</b>

- Usar una pipeta trozada de 10 ó 20 mL para rodarla sobre el sándwich y retirar por desplazamiento las burbujas de aire que pueden afectar la transferencia. Retirar con una sanita el exceso de buffer.
- Transferir a 0.2 A/h por membrana. Si se usan 4 entonces se incrementa la corriente por 4X. Se deja durante 45 min. **NOTA:** No hay posibilidad de que el RNA traspase la membrana pues se retiene por su carga eléctrica. El gel se puede desechar en la basura corriente. Recuerde lavar con un poco de agua desionizada la cámara de transferencia. Las sales se quedan pegadas y altera las transferencia posteriores. El papel filtro se puede reutilizar también.
- Las membranas transferidas (teñidas con los cromóforos en azul y violeta) se entrecruzan con el RNA con luz UV (254 nm) por 25-50 s a 120, 000 uJ/cm<sup>2</sup> (Stratagene, Autocrosslink mode). Esto provoca la formación de un enlace covalente entre el grupo NH<sub>3</sub> de la membrana y los residuos de U del RNA. Opcional: Alternativamente las membranas se pueden hornear por 30 min a 80 °C para aumentar la eficiencia de entrecruzamiento, pero esto reduce el número de veces que se pueden reutilizar.

#### Pre-hibridación e Hibridación de la marca

- La membrana se prehibrida con 10-15 mL de buffer de pre-hibridación (Apéndice IC) a 65 °C durante al menos 1 h. Se recomienda que esto ocurra durante la noche. Utilizar guantes apropiados pues la solución está muy caliente y el frasco también. **NOTA IMPORTANTE: ¡¡Destapar muy lentamente la tapa para evitar que explote y se derrame el contenido!!.**
- La marca (1-10<sup>6</sup> cpms) se añade a 10 mL de buffer de hibridación precalentado para disolver el SDS precipitado (si es el caso), (ver Ap. IC). Se deja hibridar por 8-16 h a velocidad baja (5-10 rpm) con la siguientes temperaturas de acuerdo con el tipo de oligo:

Temperaturas de Hibridación		Vol. final: 10 mL	
Oligo	Longitud	T <sub>m</sub> (°C)	Temp. Hib. (°C)
DNA	20-30 nt	55-70	37
LNA	20-25 nt (30% LNA)	60-70	42-45

#### Lavado y exposición

- Retirar con cuidado extra y guardar el buffer de hibridación en un tubo de 15 mL (Falcon) y almacenar dentro de una caja de acrílico a -20 °C si se quiere reutilizar.
- Lavar 3X con 10 mL de buffer de lavado (Apéndice IE) por 10 min a velocidad media (10-15 rpm). Descartar con mucho cuidado usando una pipeta de 10-20 mL. **NOTA:** Si se trabaja con más de un oligo a la vez recuerde cambiar la pipeta de lavado en cada ocasión para evitar contaminar la muestra. El tercer lavado se puede descartar por decantación en la tarja ya que contiene muy baja cantidad de marca.
- Lavar una vez más a 42 °C con 10 mL de buffer de lavado por 5-10 min. Descartar el sobrenadante por decantación.
- Sacar y escurrir las membranas con una pinza, tomándolas desde una esquina. Envolver en una capa plástica y exponer en una placa de Phosphorimager (Amersham) por al menos 8 h.

5. Revelar la marca en el *Typhoon* y analizar datos.
6. Si se quiere reutilizar la membrana, la marca hibridada deberá ser retirada mediante calentamiento en un detergente catiónico. Esto se logra mediante el lavado de la membrana a 95 °C con 15-20 mL de buffer de *stripping* para NB (Ap. IF), dos veces cada 15 min. Para asegurarse que no hay señal remanente, se deberá exponer la membrana a una placa pre-blanqueada por al menos 2 h y revelar de forma convencional en el *Typhoon*. Si existe señal remanente, el lavado se repetirá 1 vez más.

**NOTA IMPORTANTE:** ¡¡El contenido de las botellas a esta temperatura es altamente peligroso!!. Es necesario usar guantes gruesos para autoclave. Las botellas se deberán dejar reposar unos 5-10 min a T.A. y destapar muy lentamente para que se vaya liberando la presión interna. El contenido del primer lavado se desecha en los residuos especiales de radiactividad, y el segundo en la tarja. En ocasiones, si no está bien cerrada la botella, la tapa puede botarse y el contenido quedar en el horno, por tanto se deberá realizar una limpieza exhaustiva del área contaminada y verificarse con un frotis. Por eso se recomienda usar volúmenes bajos en estos casos. Ubicar perfectamente las tapas que no sellen bien es elemental. Verificar que todas tengan sus empaques en buen estado.

¡Felices bandas!

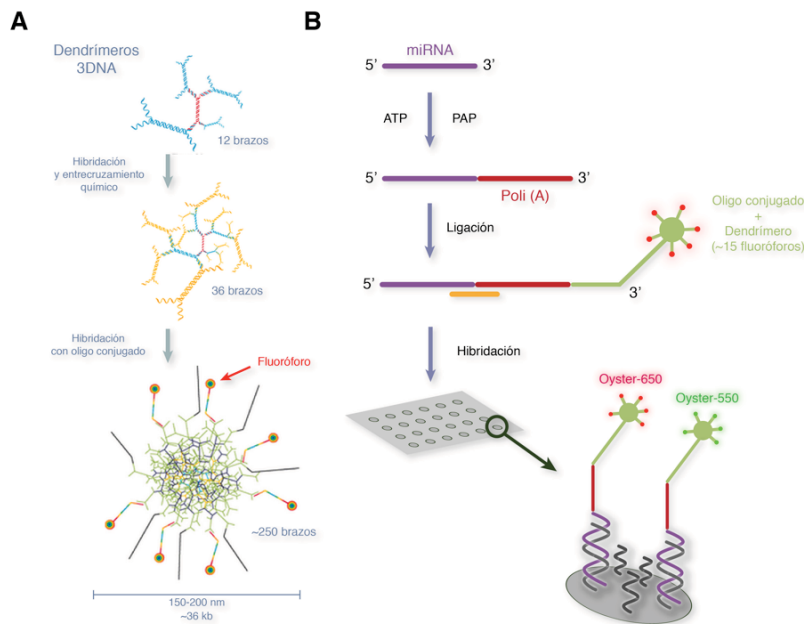


## 8.9 Marcaje de RNA Para Análisis de Microarreglo.

Esta metodología está diseñada para identificar los niveles globales de expresión de miRNAs mediante microarreglo. La plataforma que se utilizó para este estudio es una plataforma casera en su origen (miR-max, *printed in-house*), pero que sirvió de base para la que distribuye comercialmente Life Technologies bajo el nombre de NCode. Esta plataforma tiene la ventaja de permitir la exploración de los miRNAs de diferentes especies de metazoarios (humano, ratón, rata, pez cebra, *D. melanogaster* y el nemátodo *C. elegans*). Las sondas en su mayoría están diseñadas para hibridarse con los miRNAs maduros (miRBase v9.0), y algunas están dirigidas para detectar algunos pre-miRNAs y otros miRNAs predichos *in silico*.

El RNA de interés se marca, mediante una reacción de ligación, con dendrímeros de DNA (3DNA, tecnología de Genisphere, Hatfield, PA, USA) que acoplan en promedio 15 residuos de cianinas fluorescentes (Cy5 y Cy3) modificadas químicamente (Oyster 650 y Oyster 550, respectivamente). Esto permite amplificar la señal de fluorescencia detectable, en comparación con otros métodos más convencionales (Fig. 8.9.1). El protocolo usado es exactamente el mismo que el utilizado en su inserto ([http://www.genisphere.com/pdf/FlashTag\\_30April2007.pdf](http://www.genisphere.com/pdf/FlashTag_30April2007.pdf)) por lo que no se explicará aquí. Por convención, utilizaré el término Cy3 para referirme al fluoróforo Oyster 550 y Cy5 para el de Oyster 650, que corresponden a las fluorescencias de emisión en el intervalo de verde y rojo, respectivamente.

### Procedimiento de marcaje



**Figura 8.9.1. Método de Marcaje por Ligación FlashTag para Microarreglo (Genisphere).**

**(A)** Formación de dendrímeros (3DNA) donde se acoplan oligos de DNA modificados que se entrelazan y entrecruzan químicamente. Se indican los "brazos" o porciones de oligos disponibles para entrecruzamientos progresivos. Al final se le hibridan oligos adaptadores que acarrean fluoróforos en su extremo 3', en este caso cianinas modificadas (Oyster 550 y 650). **(B)** Procedimiento secuencial de marcaje por adenilación y ligación. Es método culmina con la hibridación al microarreglo y los subsecuentes lavados en alta astringencia, para reducir el ruido de fondo asociado a un pegado inespecífico. Empíricamente, este método funciona mejor utilizando RNA total en 1  $\mu$ M de RNA de bajo peso molecular (<200 nt).

1. Purificación del RNA por el método de Trizol. En todos los experimentos se usó 1  $\mu$ M de RNA total (260/280  $\geq$  1.8, 260/320  $\geq$  1.8).
2. Poliadenilación del RNA por una Poli-A Polimerasa (PAP).
3. Ligación del dendrímero utilizando un oligo adaptador.
4. Hibridación del RNA a los microarreglos a 65 °C por 8-12 h.
5. Aplicación de tres lavados, uno de los cuales ocurre a 52 °C al finalizar. Centrifugación para retirar el exceso de marca.
6. Protección de los microarreglos de la luz y ozono es elemental.
7. Lectura del microarreglo en un instrumento GenePix calibrado para cada fluoróforo.

## 8.10 Análisis Estadístico Aplicado a los Datos de Microarreglo.

Esta sección es la parte medular del análisis por microarreglo, ya que solamente en esta fase puede generarse información biológicamente relevante, libre de la mayor cantidad de sesgos provistos por artefactos de origen técnico.

Aunque no se mencionan con absoluta precisión todos los algoritmos utilizados para este proyecto, solamente se hace un recuento de los pasos tomados y la lógica detrás de ellos. Para más información se recomienda revisar la bibliografía relevante mencionada en el capítulo V.

Entre las variables que pueden afectar la eficacia de una medición “real” se encuentran la variabilidad asociada a las muestras biológicas, la manipulación del del RNA durante su purificación y cuantificación, al marcaje diferencial, a la oxidación y/o “quemado” de los fluoróforos durante el procesamiento de las muestras, a la variabilidad entre réplicas técnicas así como durante el tratamiento matemático de los datos. Todos estos elementos tienen que ser considerados e interpretados adecuadamente durante el análisis estadístico.

Por ello resulta muy importante establecer límites mínimos de aceptación de la señal detectada para cada gen en particular, basado en el análisis global de los resultados. Por consiguiente es necesario realizar un análisis estadístico con un alto poder para distinguir un alto grado de confianza en la interpretación de los datos. En este caso el uso de análisis de varianza aplicado para microarreglo (MAANOVA) así como los estadísticos F fueron los más adecuados.

Al final, la resultante de usar estos métodos es que al eliminar todos los artefactos, solamente queda la información asociada a las diferencias biológicas verdaderas, que es la información que se reporta al final y de la que se pueden inferir hipótesis viables..

### Diseño Experimental: Análisis de Expresión de miRNAs en Cerebro Completo

1. Para este estudio se siguió un diseño experimental que permite disminuir notablemente los efectos técnicos derivados del marcaje diferencial y de la hibridación, al tiempo que se minimiza el número de microarreglos necesarios para realizar dicho análisis estadístico. Tomando en cuenta que cada microarreglo puede costar hasta 700 USD, esto es digno de considerarse.
2. Con el fin de comparar simultáneamente las diferencias de expresión entre las muestras del homogenado total o de los SN, se utilizó la modalidad de microarreglo de dos colores, en la cual cada muestra de interés se marca con un fluoróforo distinto y ambas son hibridadas simultáneamente en la misma plataforma, de esta forma se determina la cooperación de cada muestra en la fluorescencia total. Sin embargo, en este tipo de experimentos, el marcaje suele tener un sesgo asociado a la capacidad de las cianinas de ser incorporadas al DNA. En este caso, cuando fueron asociadas químicamente con los dendrímeros. Por ello es necesario marcar cada muestra con el fluoróforo contrario para calcular la diferencia del marcaje (*Dye Swap*).
3. En este experimento se utilizaron tres animales y se separaron sus fracciones SN. El RNA total de cada fracción (1  $\mu$ M) fue marcado diferencialmente alternando cada muestra (total o SN) con un color diferente (Cy3 y Cy5, ó verde y rojo, respectivamente). Este diseño experimental SÓLO puede contestar la pregunta sobre las diferencias de expresión entre las fracciones total y SN del cerebro completo, y sólo aquéllas que sean las más conspicuas, dada la astringencia aplicada en el análisis estadístico.

Una vez marcado, el RNA fue hibridado por pares de muestras en seis microarreglos, alternándolas como se indica en la tabla siguiente:

Microarreglo	Fluoróforo Cy3	Fluoróforo Cy5
1	Ce1	SCe1
2	SCe1	Ce2
3	Ce2	SCe2
4	SCe2	Ce3
5	Ce3	SCe3
6	SCe3	Ce1

## Diseño Experimental: Análisis de Expresión de miRNAs en Regiones del Cerebro

Este diseño experimental sólo permite identificar las diferencias de expresión entre cada región del cerebro, pero no toma en cuenta las variedades entre individuos ya que las muestras de tres animales fueron alicuotadas juntas para alcanzar la masa crítica de RNA (1  $\mu$ M), así como para reducir el número de microarreglos (se requerirían al menos 27). Por tanto el diseño quedó de la siguiente manera:

Microarreglo	Fluoróforo Cy3	Fluoróforo Cy5
1	Ob	SOb
2	SOb	Hp
3	Hp	SHp
4	Cx	SCx
5	SCx	Bs
6	Bs	SBs
7	SBs	Cb
8	Cb	SCb
9	SCb	Ob

### Captura de Datos

1. Todos los microarreglos fueron guardados en presencia de agentes reductores (DTT) para disminuir la oxidación (niveles de ozono debajo de 60) y posteriormente escaneados en un instrumento GenePix 4400A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Los pasos fueron así:
2. Captura de los archivos .GPR (GenePix Results). Estos son los archivos generados durante el escaneo de los microarreglos.
3. Ajuste supervisado del diámetro de cada SPOT dentro de una rejilla prediseñada, para que el aparato calcule correctamente los límites de área a analizar por gene.
4. Generación de los archivos DESIGN con la matriz de datos mencionada arriba, y DATA, con los valores de mediana de cada canal (F532 y F635, verde y rojo, respectivamente).

### Análisis Computacional: Método 3SD

1. Para identificar TODOS los genes expresados en cada tejido se hizo la siguiente maniobra:
2. Tomar los valores de MEDIANA de cada gen y cada canal y ajustar las diferencias entre cada canal. Se calculan los cocientes F532/F635 y F635/532 y se multiplican para cada gen por canal y se combinan los valores mediante un promedio.
3. Se calcula la media y desviación estándar (SD) de fluorescencia para las SONDAS CONTROL (MM, SCRAMBLED, miR-1 y miR-122 que son miRNAs expresados únicamente en músculo e hígado respectivamente).
4. Para normalizar se restan los valores de fluorescencia de las sondas control sumados a 3SD y se establece un nivel de corte.
5. Se aplica una NORMALIZACIÓN por CUANTILES para hacer comparables los datos y se extrae la lista de genes.
6. Si el diseño lo permite, se promedian los valores de expresión entre réplicas biológicas (cerebro completo).
7. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas se aplica una PRUEBA DE T DE STUDENT para cada gen (miRNA) y se determina un valor P para calcular los genes diferencialmente expresados entre las fracciones TOTAL y SN.

## Análisis Computacional: Método de MAANOVA

1. Cargado en R (software para análisis estadístico) de los archivos anteriores así como de la matriz de nombres de cada sonda .GAL (*GenePix Array List*) junto con las librerías LIMMA (*Linear Models for Microarray Analysis*), MAANOVA (*Microarray Analysis of Variance*), descargadas desde Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)), así como las relacionadas para generar los gráficos (GPLLOT y GGPLOT2).
2. Conversión de todos los valores de fluorescencia a escala LOG2. Esto facilita el análisis computacional ya que registra valores fáciles de interpretar y manejar en términos aritméticos para el procesador.
3. Normalización de los datos mediante cuantiles. Esto hace que la distribución de datos sea muy parecida entre cada microarreglo y por tanto comparable (asumiendo que se distribuyen de manera Gaussiana).
4. Generación de archivos .CSV (*Comma Separated Variables*) con la nueva lista de datos normalizados.
5. Cargado en el paquete de LIMMA junto al archivo DESIGN (.csv) y una MATRIZ de CONTRASTES donde se indica cómo se van a comparar los datos (de acuerdo con el *loop-design*).
6. Con la paquetería MAANOVA se realiza un análisis iterativo (10, 000 repeticiones) aleatorizando los datos de cada microarreglo y realizando cada vez una comparación estadística acerca de las diferencias halladas, a lo que le asigna un valor P basado en la distribución F de datos (derivado de ANOVA).

En este punto se considera la siguiente ecuación (MAANOVA):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + (AD)_{ij} + G_g + (AG)_{ig} + (VG)_{jg} + \epsilon_{ijk}'$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = la intensidad de fluorescencia medida para el microarreglo  $i$ , color  $j$ , variedad  $k$  y gene  $g$

$\mu$  = media

$A_i$  = microarreglo (array)

$D_j$  = color (dye)

$(AD)_{ij}$  = variedad (variety) muestra estudiada (réplica biológica)

$G_g$  = gene

$\epsilon_{ijk}'$  = error

7. Así, cada iteración se realiza comparando las diferencias entre quitar el término VG o no.
8. Al conjunto de comparaciones se le aplica una prueba de corrección de Benjamini-Hochberg (FDR ó *False Discovery Rate*) y se corrigen los valores  $P$ .
9. Se seleccionan aquellos genes (miRNAs) que sobrepasen los valores  $P \leq 0.01$  para F1 y  $P \leq 0.05$  para F3 y Fs para el estudio de Cerebro Completo. Para el estudio de Regiones del Cerebro los valores fueron  $P \leq 0.1$  para F1 y  $P \leq 0.05$  para F3 y Fs.
10. A los nuevos datos se les aplica un análisis supervisado de HIERARCHICAL CLUSTERING, basado en K-MEANS y se grafica junto al HEATMAP.
11. La lista de miRNAs significativos se extrae en un archivo .txt y se toma como referencia para nuevos experimentos.

## 8.11 Método Taqman (ABI-Life Technologies) para qRT-PCR.

Esta estrategia, descrita en el Panel B de la sección 4.5 (p. 59) es la que proporciona la mayor especificidad para reconocer las formas maduras de los miRNAs, pero también a plataforma más cara, por lo que sólo se utilizó para validar la primeras muestras.

El protocolo usado es exactamente el mismo que se reporta en el inserto del kit, mismo que se puede consultar en la siguiente liga: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_039308.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_039308.pdf).

## 8.12 Método NCode (Life Technologies) para qRT-PCR.

El método de NCode, como se explica en la sección 5.3 (p. 69) es menos preciso al seleccionar miRNAs maduros, pues su sistema de dos oligos, sumado al tiempo de extensión aplicado (15 s) puede amplificar fragmentos de hasta 150 nt, si existen las condiciones apropiadas en el molde (como se explica en la sección 5.6 de Discusión).

Esta plataforma por ende es más barata y por tanto fue que seleccionamos para realizar los experimentos.

El protocolo utilizado es exactamente el mismo al que viene en el kit de NCode, mismo que se puede consultar en la siguiente liga: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ncode\\_express\\_sybgreener\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ncode_express_sybgreener_man.pdf).

La única modificación hecha es que los volúmenes de reacción fueron escalados a 10 uL en lugar de 50 uL sin pérdida de señal.

Todas las reacciones fueron realizadas en placas de 96 o 384 pozos.

## 8.13 Microdissección y Captura con Láser (LCMD).

Este método utiliza un sistema de microscopía confocal convencional (Zeiss PALM) en donde está adaptado a una platina motorizada y un láser infrarrojo (2 W de potencia máxima) y un software que permite identificar y seleccionar áreas específicas sobre un portaobjetos.

La ventaja principal de este método es la posibilidad de seccionar áreas muy finas en un tejido o cultivo celular para ser analizado vía qRT-PCR ya que la sección celular o grupo de células pueden ser catapultados fuera de la muestra hacia una resina pegajosa colocada dentro de la tapa de un tubo eppendorf, todo gracias hacia un pulso de 1 ns del láser a máxima potencia, lo que evita la transferencia térmica hacia la muestra. El RNA capturado puede ser pre-amplificado y posteriormente analizado de forma convencional.

Este sistema fue utilizado para seccionar dendritas de neuronas cultivadas y diferenciadas in vitro.

Los pasos fueron los siguientes:

1. Bañar a los portaobjetos estériles para cultivo, que a su vez están recubiertos de una capa plástica (Zeiss), con una solución de laminina al 1%. Dejar reposar por 2 h en una campana de flujo laminar hasta que se seque.
2. Sembrar 50, 000 precursores neuronales sobre los cubreobjetos y dejarlos con 3 mL de medio completo (RPMI suplementado con FGF) durante una noche.
3. Cambiar el medio por uno nuevo sin FGF. Dejar crecer por 5-6 días hasta que se observen suficientes neuritas entre las células.
4. Una vez diferenciadas, las células son enjuagadas con PBS a T.A. y deshidratadas seriadamente mediante inmersión progresiva en soluciones de etanol:xileno (30/40/50/70/90/100% de etanol:xileno) por 2-3 min cada una.
5. Guardar a -70 °C dentro de un tubo de 50 mL si no se utilizarán ipso facto. Es importante que en el fondo del tubo se coloque sílica seca para evitar la re-hidratación de la muestra por agua de condensación dentro del tubo. Esto activará la actividad de RNAsas dentro de las células.
6. Una vez temperizadas, las muestras se colocan sobre la platina y se seleccionan los campos que se van a seccionar, de acuerdo con las instrucciones del programa. Para este estudio se seleccionaron áreas que solamente contenían neuritas alejadas de los cuerpos celulares.
7. Las muestras capturadas son procesadas con Trizol y el RNA se precipita siguiendo el protocolo del reactivo. Se adiciona acrilamida lineal como acarreador. Al final el pellet se resuspende en 5 uL.
8. Se utilizan 2.5 uL para una reacción de pre-amplificación con el *kit Pre-Amp* (Applied Biosystems-Life Technologies) por 15 ciclos.
9. Se toman 4 uL de esta reacción y en un volumen de 10 uL de reacción se mide la expresión de miRNAs usando las sondas Taqman (ABI) para los diferentes moldes. Se amplifica hasta 40 ciclos. El protocolo usado es exactamente el mismo que incluye el kit, sin modificaciones al protocolo. Se puede consultar en la siguiente liga:

[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/4387854\\_D.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/4387854_D.pdf).

NOTA: Se requiere usar uno de los oligos mezclados en las sondas Taqman para miRNAs para la síntesis de cDNA y pre-amplificación.



## 8.14 Epileptogénesis Inducida con Ácido Kaínico (KA).

Esta metodología se utilizó para inducir la sobreactivación eléctrica neuronal in vivo para determinar este efecto sobre la expresión de los miRNAs sinápticos.

Este modelo ha sido ampliamente utilizado desde hace más de 60 años y se utiliza para estudiar los efectos celulares y moleculares que subyacen a las variedades de epilepsias generalizadas originadas en el hipocampo y en la corteza mesiotemporal.

Como se mencionó en el capítulo 6, este método cursó de la siguiente manera:

1. Ratas Sprague-Dawley macho de 200-250 g fueron pesadas y habituadas hasta por 2h a un ambiente nuevo antes de realizar el protocolo. Ninguna dieta especial fue administrada previamente.
2. Se inyecta una dosis de 1 mg/kg de metilescopolamina (Sigma) vía intraperitoneal (i.p.). Esto sirve para disminuir el efecto cataléptico del KA. Es necesario envolver al animal con una franela para evitar que muerda antes de inyectarlo. La inyección requiere que el animal esté inclinado hacia su cabeza para evitar perforar los intestinos. Recuerde separar la inyección de cada individuo por 15 min, llevando un registro cuidadoso sobre el tiempo. Esto es para tener un espacio suficiente para realizar la disección y el homogenado después del tratamiento.
3. Después de 30 min se procede a inyectar el KA (10 mg/kg de peso; Sigma) o NaCl (0.9%) vía i.p.
4. Se esperan 15 min a que aparezcan los signos como mirada fija, asentimiento de la cabeza, erección pilosa del dorso, sacudidas esporádicas de la cabeza, salivación y espasmos esporádicos. A partir de aquí se inicia el cronometrado.
5. Después de 2 h se inyectan diazepam (10 mg/kg; Roche) y fenitonina (Sigma) y se espera a que el animal quede cataléptico.
6. Se procede a la extracción de los SN como indica el protocolo 8.1.

## 8.15 Protocolo de Despolarización Prolongada con Alto Potasio en SN *in vitro*.

Este protocolo consta de tres pasos y fue adaptado de *Nicholson, R.A., Li, G.H., Buenaventura, E. Graham, D. A rapid and sensitive assay for paralytic shellfish poison (PSP) toxins using mouse brain synaptoneurosomes. Toxicol: official journal of the International Society on Toxicology 40, 831-8 (2002).*

### Preincubación de los SN

1. Los SN de cerebro completo o corteza, preparados según el protocolo 8.1, se resuspenden en 1.4 mL de Solución 1 (Bajo Potasio) + TTX (1  $\mu$ M) durante 10 min a T.A. (Ver Ap. IG). El vol. final será de 1500  $\mu$ L.
2. Se alicuotan los SN de tal manera que cada reacción contenga 300  $\mu$ L de SN. Es imperativo no generar burbujas pues éstas pueden romper las estructuras.
3. Se incuban en un rotor giratorio u orbital a velocidad media para permitir la mezcla de manera homogénea.

### Estimulación con ALTO POTASIO EXTRACELULAR (KCl 50 mM)

4. A cada par de reacciones, de Alto Potasio (50 mM) y Bajo Potasio (5 mM; Ctrl-) se les agregan 200  $\mu$ L de Solución 2 y 3, respectivamente. Recuerde desfasar cada par de tubos por 5-10 min para lograr para las reacciones en los tiempos planeados. Lleve un registro adecuado.
5. Agitar continuamente de forma ligera en el rotor como en el paso anterior durante 5 ó 120 min, o según el tiempo que se requiera.

### Finalización de la estimulación

6. Para parar la reacción se agregan 500  $\mu$ L de Trizol. ¡Et Voilá!
7. Se procede a la extracción, cuantificación y análisis del RNA como en la sección 8.2.

# Apéndice I

## AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES DE TRABAJO

Los buffers de uso común en los laboratorios de biología molecular como PBS, Tris, EDTA, soluciones comerciales de desnaturalización de proteína y RNA y otros incluidos en los kits no serán descritos a menos que se haya realizado alguna modificación relevante. Como estas soluciones son estándar o bien su composición puede ser consultada en línea, esto se deja a discreción del lector.

### A. Soluciones para Purificación de SN.

Todas las soluciones mencionadas a continuación utilizaron agua libre de nucleasas.

<b>Solución: Sacarosa para gradiente</b>		<b>M.W. (FW): 180.3</b>	<b>Volumen final: 50 mL</b>
<b>Concentración</b>	<b>Pesar</b>	<b>Solución añadida: NaHCO<sub>3</sub> 100mM</b>	
1.2 M	20.54 g	0.5 mL	
1.0 M	17.12 g	0.5 mL	
0.85 M	14.55 g	0.5 mL	

<b>Soluciones para extracción de SN (Stocks)</b>			<b>Volumen final: 50mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>MW (FW) <sup>2</sup></b>	<b>Pesar</b>
NaHCO <sub>3</sub>	100 mM	84.00	0.42 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50 mM	147.01	0.28 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>	100 mM	203.30	0.51 g

<sup>1</sup> La forma hexahidratada muy higroscópica y la reacción es endergónica cuando se solubiliza en agua, contrario a la forma deshidratada que es altamente reactiva y calienta mucho la solución. Tomar precauciones.

<sup>2</sup> MW, peso molecular; FW, peso molecular total cuando las sustancias están hidratadas.

<b>Solución: "A"</b>			<b>Volumen final: 100mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Pesar</b>	<b>Añadir</b>
Sacarosa	0.32 M	5.48 g	0.5 mL
NaHCO <sub>3</sub>	100 mM	--	0.5 mL
CaCl <sub>2</sub>	50 mM	--	0.5 mL
MgCl <sub>2</sub>	100 mM	--	0.5 mL

<b>Solución: "B"</b>			<b>Volumen final: 100mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>Pesar</b>	<b>Añadir</b>
Sacarosa	0.32M	5.48g	0.5mL
NaHCO <sub>3</sub>	100mM	--	0.5mL

## B. Buffers para Western blot (WB).

<b>Buffer de Lisis</b>		<b>pH 7.5</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	
Tris-HCl	50 mM	
NaCl	150 mM	
Nonidet P-40	0.5%	
SDS	1%	
Coctel de Inhibidor de proteasas	20 $\mu$ L	

Utilizar frío a 4°C.

<b>Buffer de Desnaturalización de Proteínas</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	
Tris-HCl	50 mM	
NaCl	150 mM	
Nonidet P-40	0.5%	
SDS	1%	
Coctel de Inhibidor de proteasas	20 $\mu$ L	

<b>Buffer de Bloqueo de Señal Inespecífica</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	
PBS	1X	
Tween-20	1% (v/v)	
Leche descremada en polvo (Svelty)	10%	

<b>Buffer de Bloqueo con Anticuerpos</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	
PBS	1X	
Tween-20	1% (v/v)	
NaN <sub>3</sub>	0.02%	

## C. Buffers Comunes para Dot (DB) y Northern blot (NB)

<b>Solución de Denhardt (50X)</b>		<b>Vol final: 1 L</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Peso</b>	
Ficoll	10 g	
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	10 g	
Polivinilpirrolidona (PVP)	10 g	
Aforar a 1 L con agua miliQ		
Calentar en microondas por 30-45 s y filtrar con papel Whatman		
Hacer alícuotas de 50 mL y congelar a -20 °C (recuerde que el hielo incrementa el volumen por lo que puede romperse la tapa, use tubos adecuados)		

<b>SSC pH7.0 (20X)</b>		<b>Vol final: 1 L</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Peso</b>	
NaCl	175.3 g	
Citrato de Sodio	88.2 g	
Aforar a 1 L con agua miliQ y calibrar el pH con HCl		

<b>TBE (10X)</b>			<b>Vol final: 1 L</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración final</b>	
Tris-Base	109 g		
Ácido Bórico	55 g		
EDTA (0.5 M)	40 mL	20 mL	
Aforar a 1 L con agua miliQ			

Este buffer precipita muy fácilmente en vidrio, por lo que si se elige almacenarlo ahí conviene que se use en menos de dos meses.

<b>Buffer de Pre-Hibridación</b>				<b>Vol final: 500mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>	
SSC (pH 7.0)	20X	6X	150 mL	
SDS	10%	0.2%	10 mL	
Sol. Denhardt	50X	10X	100 mL	
Aforar con 240 mL de agua miliQ				

Precalear en un horno de microondas por 30 s para solubilizar el SDS, el cual precipita fácilmente a T.A. Esto ayuda a que el detergente catiónico no forme grumos que se peguen en la membrana.

<b>Buffer de Hibridación</b>				<b>Vol final: 500 mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>	
SSC (pH 7.0)	20X	6X	150 mL	
SDS	10%	0.2%	10 mL	
Sol. Denhardt	50X	5X	50 mL	
Aforar con 240 mL de agua miliQ				

Precalear en el microondas (por 1 min) antes de usar, con la tapa del frasco aflojada para evitar que estalle.

## D. Buffers para DB.

<b>Buffer de Neutralización de Membranas Entrecruzadas</b>			
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>
SDS	10%	5%	10 mL
TRIS-HCl (pH 7.5)	1 M	500 mM	10 mL

<b>Buffer de Lavado I</b>			<b>Vol final: 100 mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>
SSC (pH7.0)	20X	2X	10 mL
SDS	10%	0.5%	5 mL
Aforar con 85mL de agua milliQ			

<b>Buffer de Lavado II</b>			<b>Vol final: 100 mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>
SSC (pH7.0)	20X	1X	10 mL
SDS	10%	0.5%	5 mL
Aforar con 85 mL de agua milliQ			

## E. Buffer de Lavado para NB.

<b>Buffer de Lavado para NB</b>			<b>Vol final: 500 mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>
SSC (pH 7.0)	20X	6X	150 mL
SDS	10%	0.2%	50 mL
Aforar con 300 mL de agua milliQ			

## F. Solución de Desnudamiento de Membrana para NB.

<b>Solución de Stripping (NB)</b>			<b>Vol final: 100 mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Vol. usado</b>
SDS	10%	2%	20 mL



## G. Soluciones para Despolarización de SN con Alto Potasio.

<b>Stocks</b>				
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>	<b>MW (FW) g/mol</b>	<b>Pesar</b>	<b>Volumen final</b>
NaCl	1 M	58.4	11.68 g	200 mL
NaHCO <sub>3</sub>	500 mM	84.0	2.10 g	50 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100 mM	156.0	780.0 mg	50 mL
CaCl <sub>2</sub>	100 mM	111.0	555.00 mg	50 mL
Glucosa	100 mM	180.2	180.20 mg	10 mL
TTX <sup>1</sup>	100 mM	319.3	1.60 mg	50 uL

<sup>1</sup>Usar guantes y cubrebocas al pesar este compuesto porque es altamente tóxico y potencialmente letal. Esta solución es un stock 100, 000X, por lo que se recomienda diluir 1:100 para hacer un stock 1000X.

<b>Solución 1 de Despolarización (Bajo Potasio) pH 7.4</b>			<b>Volumen final: 10 mL</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración Final Efectiva</b>	<b>Concentración Final Compensada</b>	<b>Stock</b>	<b>Añadir</b>
KCl	5 mM	5.50 mM	200 mM	0.550 mL
NaCl	125 mM	137.50 mM	1 M	1.375 mL
NaHCO <sub>3</sub>	26 mM	28.60 mM	500 mM	0.572 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6 mM	1.76 mM	100 mM	0.176 mL
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM	2.75 mM	100 mM	0.275 mL
Glucosa	10 mM	10.1 mM	100 mM	1.010 mL
TTX	1 uM	1.1 uM	1 mM	11 uL

1. Esta solución se prepara fresca antes de realizar el experimento.
2. Se requieren preparar 3 tubos de 10 mL, uno para la solución de pre-incubación (bajo potasio) y otra SIN potasio.
3. El pH se calibra añadiendo todo con EXCEPCIÓN de la TTX, llevando el volumen de UNA de las soluciones hasta 9 mL. Se agrega NaOH 1N hasta ajustar. Al finalizar se agregan 11 uL de la solución 1000X de TTX y se afora con agua libre de RNasas a 10mL.
4. Los SN se resuspenden en 1100 uL de este buffer después del último paso de centrifugación. Los SN tendrán aproximadamente 1/10 de volumen total, lo que compensará el exceso de solutos.

<b>Solución 2 Complementaria de KCl (Alto Potasio)</b>			<b>Volumen final: 10mL</b>
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Stock</b>	<b>Añadir</b>
KCl	45 mM	1 M	22.5 uL a 200 uL de sol. 1 por réplica biológica

1. Esta es la solución de complementación para ALTO POTASIO.
2. Se agregan 90 uL de KCl 1M a 800 uL de Sol. 1 el volumen para tener 4 volúmenes de complementación.
3. Se mezclan 1.440 mL de KCl 1 M más 11, 800 mL de Sol. Final Compensada. Se calibra el pH a 7.4 y se agregan 12.8 uL de TTX 1000X y se afora a 12.8 mL.
4. De esta solución se toman 200 uL para añadir en las réplicas técnicas que contienen 300 uL cada una con Solución 1 para iniciar la estimulación.

<b>Solución 3 de Complementación de Sol. 1 (Bajo Potasio) pH 7.4</b>			<b>Volumen final: 10 mL</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Concentración Final Efectiva</b>	<b>Stock</b>	<b>Añadir</b>	
KCl	5 mM	200 mM	0.50 mL	
NaCl	125 mM	1 M	1.25 mL	
NaHCO <sub>3</sub>	26 mM	500 mM	0.52 mL	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6 mM	100 mM	0.16 mL	
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM	100 mM	0.25 mL	
Glucosa	10 mM	100 mM	1.00 mL	
TTX	1 uM	1 mM	10 uL	

El pH se calibra añadiendo todo todo EXCEPTO la TTX, llevando el volumen de UNA de las soluciones hasta 9 mL. Se agrega NaOH 1 N hasta ajustar a pH de 7.4. Al finalizar se agregan 11 uL de la solución 1000X de TTX y se afora con agua libre de RNasas a 10 mL.

# Apéndice II

## OLIGONUCLEÓTIDOS

**Tabla de Oligonucleótidos 1. Amplificación de mRNAs por qRT-PCR**

Ago2 F	5' -CCAGCTGGTGGTGGTTATCC-3'
Ago2 R	5' -TGACTTCCGCGTACACAGGAG-3'
Arc F	5' -CCCAGTCTGTGGCTTTTGTCA-3'
Arc R	5' -GTGTCAGCCCCAGCTCAATC-3'
ArhGef11 F	5' -GGAGGGCCCCATTATCAGAG-3'
ArhGef11 R	5' -ATCAAACCGAGCCAGCATG-3'
ArhGef5 F	5' -CACACGTCTCAAGCTGTGC-3'
ArhGef5 R	5' -CCAGGCTGGGTTCTCTTTCAG-3'
γ-Actin F	5' -CGTAGCCATCCAGGCTGTGT-3'
γ-Actin R	5' -CCAGTGGTACGACCAGAGGC-3'
Camk2α F	5' -AGTCAGCCTGCATCGCCTAC-3'
Camk2α R	5' -CACCCGCATCCAGTACTG-3'
Gapdh F	5' -AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'
Gapdh R	5' -GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC-3'
MAP2 F	5' -CAAAATCGGATCAACCAGACA-3'
MAP2 R	5' -ACCTGACCCCCCTTAGGCT-3'
Mbp F	5' -GACACGGGCATCCTTGACTC-3'
Mbp R	5' -ACCCCTGTCACCGCTAAAGA-3'
NMDAR1 F	5' -TTCGGTATCAGGAATGCGACT-3'
NMDAR1 R	5' -AAGTGAGGGTTGCAGGAGCA-3'
Psd-95 F	5' -GTGGAGGCCCTCAAAGAGG-3'
Psd-95 R	5' -GCGCATGACATAGAGGCGA-3'
Tuba1 F	5' -GGCAATGTGTGCTTTCATACAGTT-3'
Tuba1 R	5' -GACAAATCATTCACACTTAAAGTCAGTAAC-3'
Tubβ3 F	5' -TGCCTCTTCGTCTCTAGCCG-3'
Tubβ3 R	5' -TGTGCACGATCTCCCTCATG-3'
U6 F	5' -TTCGGCAGCACATATACTAAAATTG-3'
U6 R	5' -CCATGCTAATCTTCTCTGTATCGTTC-3'

**Tabla de Oligonucleótidos 2. Oligos FWD para qRT-PCR por el Método de NCode® (Life Technologies)**

rno-let-7a-1	5' -TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT-3'
rno-let-7c	5' -TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT-3'
rno-let-7d	5' -AGAGGTAGTAGGTTGC-3'
rno-let-7f	5' -TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT-3'
rno-miR-124	5' -TAAGGCACGCGGTGAATGCC-3'
rno-miR-125a	5' -TCCCTGAGACCCCTTAAACCTGTGA-3'
rno-miR-126	5' -TCGTACCGTGAGTAATAATGCG-3'
rno-miR-128	5' -TCACAGTGAACCGTCTCTTT-3'
rno-miR-129*	5' -AAGCCCTTACCCCAAAAAGCAT-3'
rno-miR-132	5' -TAACAGTCTACAGCCATGGTCG-3'
rno-miR-134	5' -TGTGACTGGTTGACCAGAGGGG-3'
rno-miR-138	5' -AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG-3'
rno-miR-143	5' -TGAGATGAAGCACTGTAGCTC-3'
rno-miR-145	5' -GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT-3'
rno-miR-150	5' -TCTCCAACCCTTGTACCAGTG-3'
rno-miR-181a	5' -AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT-3'
rno-miR-182	5' -TTTGGCAATGGTAGAACTCACACCG-3'
rno-miR-183	5' -TATGGCACTGGTAGAATTCAC-3'
rno-miR-196	5' -TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG-3'
rno-miR-200a	5' -TAACACTGTCTGGTAAC-3'
rno-miR-200b	5' -TAATACTGCCTGGTAATGATGA-3'
rno-miR-200c	5' -TAATACTGCCGGTAATGATGG-3'
rno-miR-204	5' -TTCCCTTGTTCATCCTATGCC-3'
rno-miR-292-5p	5' -ACTCAAACCTGGGGCTCTTTTG-3'
rno-miR-29a	5' -TAGCACCATCTGAAATCGGTTA-3'
rno-miR-29b	5' -TAGCACCATTTGAAATCAGTGT-3'
rno-miR-324-5p	5' -CGCATCCCTTAGGGCATTGGTGT-3'
rno-miR-429	5' -TAATACTGTCTGGTAATGCCGT-3'
rno-miR-434	5' -TTTGAACCATCACTCGACTCCT-3'
rno-miR-449a	5' -TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT-3'
rno-miR-96	5' -TTTGGCACTAGCACATTTTGCT-3'

# Apéndice III

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla Suplementaria 1. Expresión de MiRNAs de Cerebro Completo Seleccionados por MAANOVA (P≤0.01)**

miRNA	Microarreglo (SN/Total)
miR-347	1.36
miR-434	1.36
miR-342	1.35
miR-92	1.35
miR-92b	1.32
miR-146	1.32
miR-323	1.31
miR-327	1.31
miR-204	1.30
miR-329	1.29
miR-132	1.28
miR-142-5p	1.26
miR-339	1.25
miR-344	1.25
miR-139	1.24
miR-485	1.23
miR-99b	1.23
miR-146b	1.21
miR-331	1.19
miR-382	1.19
miR-184	1.19
miR-495	1.18
miR-338	1.18
miR-487b	1.17
miR-181a	1.17
miR-652	1.17
miR-30e*	1.17
miR-196a	1.16
miR-422b	0.86
miR-195	0.84
miR-199a*	0.81
miR-705	0.78
miR-466	0.77
miR-265	0.75
miR-352	0.72
miR-467a	0.64
miR-467b	0.60
miR-685	0.51
miR-690	0.42
miR-650	0.42
miR-154	0.39
miR-151*	0.35
miR-129	0.35
miR-150	0.35
miR-709	0.34
miR-126	0.33
miR-145	0.33
miR-143	0.08

**Tabla Suplementaria 2. Cociente de Expresión de miRNAs (SCe/Ce) Determinado por Microarreglo (3SD)**

<b>miRNA</b>	<b>SN/Total</b>	<b>Ce</b>	<b>SCe</b>	<b>P-val</b>	<b>PS/T</b>
miR-124	0.8	55460.8	43884.2	6.52E-02	79.1
let-7a	1.1	35827.9	36822.0	9.03E-01	102.8
miR-128a	1.4	28797.4	36785.2	1.92E-01	127.7
let-7c	1.2	34289.8	35821.2	8.58E-01	104.5
miR-125b-5p	1.5	27614.4	35474.0	3.33E-01	128.5
miR-128b	1.3	24662.4	32291.2	2.78E-02	130.9
let-7b	1.3	24016.4	25481.5	8.34E-01	106.1
miR-494	1.2	24416.9	25300.4	9.17E-01	103.6
miR-29a	0.8	28148.4	21903.4	2.56E-01	77.8
let-7f	0.9	25750.4	21877.1	2.24E-01	85.0
let-7d	1.2	16937.3	19478.0	5.37E-01	115.0
miR-9	1.1	18628.9	18213.9	9.47E-01	97.8
miR-26a	1.0	15097.7	14301.2	4.97E-01	94.7
miR-129*	1.5	8351.2	11810.2	4.31E-02	141.4
miR-434	1.9	5741.4	10968.0	7.53E-02	191.0
miR-30c	1.2	9044.7	10699.6	3.73E-01	118.3
miR-181a	1.5	6213.6	8888.3	6.99E-02	143.0
miR-127	1.3	6284.9	8263.5	2.93E-01	131.5
miR-132	1.7	5131.8	8240.9	1.01E-01	160.6
miR-23b	1.3	5442.2	6444.5	5.39E-01	118.4
miR-23a	1.5	5630.4	6412.9	7.07E-01	113.9
miR-125a-5p	1.3	4727.7	6056.6	1.38E-01	128.1
miR-24	0.8	7501.9	5672.6	2.09E-02	75.6
miR-22	0.9	5939.8	5158.3	2.51E-01	86.8
miR-352	1.2	4233.8	4994.9	5.34E-01	118.0
miR-30d	1.0	4838.3	4473.4	4.04E-01	92.5
let-7e	1.0	4458.2	4319.7	8.56E-01	96.9
miR-99a	1.3	3176.8	4306.7	1.87E-01	135.6
let-7i	0.7	5902.9	4234.0	6.27E-02	71.7
miR-221	1.3	2807.6	3471.4	2.06E-01	123.6
miR-103	1.0	3904.1	3400.9	5.88E-01	87.1
miR-107	0.9	3792.7	3294.4	4.94E-01	86.9
miR-222	1.5	2553.9	3252.4	2.97E-01	127.4
miR-191	1.4	2344.7	3159.5	1.13E-01	134.7
miR-218	0.5	5035.7	2510.1	1.95E-02	49.8
miR-30b	1.0	2599.1	2445.0	6.45E-01	94.1
miR-664	2.0	1210.2	2405.4	9.84E-02	198.8
miR-328	1.4	1729.3	2388.3	2.09E-01	138.1
miR-100	1.4	1523.7	2189.5	1.40E-01	143.7
miR-98	1.0	2128.3	2161.9	9.53E-01	101.6
miR-27b	0.8	2760.6	2157.7	1.16E-02	78.2
miR-16	0.7	2786.2	2136.5	3.69E-02	76.7
miR-30a-5p	0.6	3625.0	2102.4	1.48E-02	58.0
miR-382	1.5	1400.8	2036.3	1.82E-01	145.4
miR-29b	0.2	8189.2	2031.6	6.86E-03	24.8
miR-129	1.3	1532.8	1877.6	3.44E-01	122.5
miR-181b	1.1	1688.3	1790.7	5.65E-01	106.1
miR-376b	0.9	2072.5	1720.9	6.25E-01	83.0
miR-204	2.1	1002.8	1720.6	1.35E-01	171.6
miR-137	0.5	3742.9	1698.3	5.72E-02	45.4
miR-539	1.2	1326.5	1635.7	5.33E-01	123.3
miR-487b	1.4	1092.6	1511.8	2.63E-02	138.4
miR-151*	1.3	1145.3	1466.3	4.23E-01	128.0
miR-99b	1.9	794.4	1455.9	1.91E-01	183.3
miR-329	1.9	854.6	1440.3	1.60E-01	168.5
miR-323	2.0	757.6	1401.1	1.46E-01	184.9
miR-27a	0.7	1910.1	1388.3	2.61E-02	72.7
miR-154	1.2	1087.1	1311.0	2.68E-01	120.6
miR-342	2.2	653.5	1297.5	5.02E-02	198.5
miR-185	0.8	1549.8	1261.8	2.57E-02	81.4
miR-26b	0.7	1547.7	1121.6	5.85E-02	72.5
miR-543	2.1	530.4	1079.3	1.86E-01	203.5
miR-326	1.1	973.8	1069.8	6.34E-01	109.9
miR-361	1.3	705.8	889.2	2.51E-01	126.0
miR-331	1.5	574.5	880.0	1.04E-01	153.2
miR-181c	1.3	714.8	862.5	2.65E-01	120.7



**Tabla Suplementaria 2. Cociente de Expresión de miRNAs (SCe/Ce) Determinado por Microarreglo (3SD)**

<b>miRNA</b>	<b>SN/Total</b>	<b>Ce</b>	<b>SCe</b>	<b>P-val</b>	<b>PS/T</b>
miR-335	0.7	1127.0	855.4	8.33E-03	75.9
miR-214	1.1	881.6	802.7	8.47E-01	91.0
miR-195	0.7	1181.9	795.3	1.48E-01	67.3
miR-29c	0.4	1821.5	788.6	1.05E-02	43.3
miR-383	1.7	425.5	677.7	3.34E-01	159.3
miR-146	2.1	319.0	662.2	2.83E-02	207.6
miR-212	1.3	526.2	661.9	8.01E-02	125.8
miR-21	0.5	1263.9	660.0	6.62E-02	52.2
miR-324-3p	1.7	429.4	651.7	3.45E-01	151.8
miR-422b	0.8	899.9	618.9	3.66E-01	68.8
miR-320	1.4	486.5	614.1	5.15E-01	126.2
miR-433	1.9	337.5	591.6	2.21E-01	175.3
miR-138	0.7	1032.8	589.6	2.61E-01	57.1
miR-379	0.6	939.4	589.6	3.14E-02	62.8
miR-369-5p	1.3	445.7	584.8	4.34E-01	131.2
miR-139	2.0	295.6	562.1	4.08E-02	190.1
miR-300	1.0	525.1	537.6	4.14E-01	102.4
miR-381	0.9	563.2	530.8	6.31E-01	94.2
miR-330	1.6	332.8	514.2	3.24E-01	154.5
miR-93	1.2	390.4	462.0	5.08E-01	118.3
miR-376b*	0.6	751.4	437.9	2.12E-01	58.3
miR-148b	1.2	373.1	435.1	4.86E-01	116.6
miR-22*	1.1	407.2	434.0	8.24E-01	106.6
miR-126	0.1	4942.7	413.6	2.56E-02	8.4
miR-29c*	1.3	314.7	408.9	3.53E-01	129.9
miR-424	0.6	635.1	405.0	1.66E-01	63.8
miR-101a	0.4	941.2	394.7	2.11E-02	41.9
miR-34a	0.4	951.6	393.1	2.15E-02	41.3
miR-341	0.8	462.4	380.0	3.78E-01	82.2
miR-92	1.8	221.6	365.6	2.44E-01	165.0
miR-101b	0.4	811.3	363.0	1.19E-02	44.7
miR-134	1.5	259.7	356.2	2.71E-01	137.1
miR-374	1.2	275.2	337.1	5.98E-01	122.5
miR-186	1.1	338.0	334.1	9.67E-01	98.9
miR-345	1.8	206.4	332.4	4.90E-01	161.0
miR-30a-3p	1.7	219.6	310.5	3.89E-01	141.4
miR-28	1.8	245.5	303.1	7.82E-01	123.5
miR-338	0.5	559.3	301.9	4.46E-03	54.0
miR-344	0.7	412.0	294.2	2.94E-02	71.4
miR-351	2.0	165.1	273.8	3.97E-01	165.8
miR-541	1.3	223.2	268.5	6.64E-01	120.3
miR-19b	0.4	657.5	260.3	8.78E-02	39.6
miR-106b	0.5	550.2	256.1	3.48E-02	46.5
miR-15b	1.2	253.7	249.6	9.69E-01	98.4
miR-130a	0.6	405.9	244.1	1.25E-01	60.1
miR-20a	0.6	347.5	234.7	4.04E-02	67.5
miR-17	0.9	286.2	232.3	3.00E-01	81.2
miR-140*	1.1	237.9	224.1	7.92E-01	94.2
miR-497	0.9	240.2	212.4	4.35E-01	88.4
miR-505	1.5	147.5	207.3	4.81E-01	140.6
miR-409-5p	0.8	260.3	193.6	4.08E-01	74.4
miR-7	0.5	448.5	190.7	1.85E-01	42.5
miR-324-5p	0.5	405.7	190.1	5.82E-02	46.9
miR-150	0.1	2383.6	185.0	2.03E-02	7.8
miR-346	1.5	159.0	182.1	8.11E-01	114.5
miR-25	1.1	172.1	173.9	9.74E-01	101.0
miR-382*	1.4	116.8	167.2	4.17E-01	143.2
miR-187	1.2	176.3	153.4	7.44E-01	87.0
miR-31	0.7	199.0	147.0	2.49E-01	73.9
miR-325	0.9	134.8	127.9	7.14E-01	94.9
miR-485	1.1	115.5	113.4	9.72E-01	98.2
miR-145	0.1	2435.8	112.5	6.29E-02	4.6
miR-350	0.9	125.4	99.5	5.97E-01	79.4
miR-194	1.0	119.1	95.7	5.39E-01	80.4
miR-143	0.0	3001.0	94.9	4.88E-02	3.2
miR-337	0.5	116.9	62.7	1.39E-01	53.6

**Tabla Suplementaria 2. Cociente de Expresión de miRNAs (SCe/Ce) Determinado por Microarreglo (3SD)**

<b>miRNA</b>	<b>SN/Total</b>	<b>Ce</b>	<b>SCe</b>	<b>P-val</b>	<b>PS/T</b>
miR-140	0.2	149.3	40.5	3.65E-02	27.1
miR-153	0.1	277.9	23.3	5.28E-02	8.4
pre-mir-128b	0.2	107.2	21.1	4.42E-02	19.6
miR-126*	0.0	156.1	3.1	1.23E-01	2.0
miR-297	0.0	106.0	2.5	8.67E-02	2.4
miR-376a	0.0	367.2	2.5	3.00E-02	0.7
miR-219	0.0	527.5	0.0	7.30E-03	0.0
miR-451	0.0	379.3	0.0	1.02E-01	0.0
miR-30e	0.0	159.1	0.0	5.57E-02	0.0
<b>No. Total</b>		<b>141</b>	<b>138</b>		
<b>Total miRNAs de rata (%)</b>		<b>59.0</b>	<b>57.7</b>		

Los valores de Ce y SCe corresponden a la fluorescencia normalizada en el microarreglo.

**Tabla Suplementaria 3. Expresión Relativa y Absoluta de miRNAs de Cinco Regiones del Cerebro de la Rata Adulta (3SD). Parte I.**

miR	SOB/Ob	Ob	SOB	miR	SCx/Cx	Cx	SCx	miR	SHp/Hp	Hp	SHp	miR	SCb/Cb	Cb	SCb	miR	SBs/Bs	Bs	SBs
miR-124	0.59	61836.41	36445.05	miR-124	0.97	60439.44	58814.54	miR-124	0.84	29594.11	24768.58	miR-124	0.98	65198.87	64124.17	miR-124	0.72	25182.49	18075.46
miR-182	1.01	31853.41	32095.03	miR-128	1.45	20501.44	29662.54	let-7c	1.26	19253.86	24186.08	let-7c	0.92	35843.37	32996.92	miR-494	0.89	18230.74	16176.96
miR-429	0.95	33867.16	32045.53	miR-128b	1.25	23075.19	28851.04	miR-125b-5p	1.39	16940.11	23523.08	let-7a	0.90	35530.62	32024.42	miR-125b-5p	0.45	19151.24	8648.21
miR-200b	1.09	28511.66	31137.03	miR-9	0.95	22341.94	21302.04	let-7a	1.20	18876.11	22736.33	miR-26a	0.84	30740.87	25946.42	miR-29a	0.61	12127.24	7349.96
miR-494	0.99	27580.41	27178.55	let-7a	0.93	21215.69	19632.54	let-7b	1.24	12971.11	16148.83	let-7b	0.83	28533.12	23736.92	let-7c	0.32	22170.49	7089.96
let-7a	0.67	27741.91	18665.55	miR-125b-5p	1.05	18155.69	18989.54	miR-128	1.43	8566.86	12269.08	miR-181a	1.16	14150.87	16442.67	let-7a	0.32	22227.49	7075.96
miR-200a	0.82	22287.16	18343.53	miR-29a	0.93	20236.94	18737.04	miR-9	0.91	13009.61	11806.83	let-7d	0.68	22171.37	15159.67	miR-9	0.86	8043.74	6931.71
let-7c	0.69	26622.41	18289.55	let-7c	1.04	17600.19	18300.79	let-7f	0.99	11603.36	11501.83	miR-129*	1.18	12268.87	14529.42	let-7b	0.35	15340.24	5309.71
miR-9	0.61	27992.91	17114.05	miR-494	0.64	27641.44	17628.54	miR-128b	1.36	7859.61	10723.08	let-7f	0.52	25039.87	12994.42	miR-181a	0.68	7756.49	5283.46
let-7d	0.68	21701.66	14831.55	miR-26a	1.18	11448.94	13491.79	miR-29a	1.11	9317.61	10329.58	miR-125b-5p	1.32	9286.62	12267.17	let-7d	0.46	10079.24	4653.46
let-7f	0.68	20780.41	14108.55	let-7b	1.05	12474.69	13160.04	let-7d	1.13	8011.61	9038.08	miR-29a	0.60	16048.12	9658.42	let-7f	0.31	12796.99	3930.96
miR-200c	1.39	9769.16	13538.78	let-7d	0.88	13870.94	12248.29	miR-494	0.23	31366.86	7350.33	miR-125a-5p	1.22	7070.62	8597.92	miR-24	0.45	5564.49	2527.21
let-7b	0.66	18684.41	12404.05	let-7f	0.78	15414.19	11991.54	miR-26a	0.88	8201.36	7232.08	miR-128b	0.83	10134.62	8374.42	miR-29b	0.75	3346.74	2500.21
miR-125b-5p	0.83	14306.91	11834.30	miR-132	1.60	6186.19	9894.79	miR-129*	1.63	3724.36	6079.83	miR-30c	0.75	11165.37	8345.17	miR-26a	0.30	7889.99	2377.96
miR-128b	0.77	15234.66	11759.55	miR-129*	1.25	7930.69	9878.79	miR-30c	1.18	3780.86	4464.58	miR-9	0.52	16044.87	8297.17	miR-129*	0.42	5281.49	2242.71
miR-96	0.73	15721.41	11483.53	miR-181a	1.19	4906.69	5849.54	miR-125a-5p	1.14	3439.61	3930.83	miR-128	0.82	9935.62	8130.42	miR-30c	0.43	5138.24	2199.96
miR-26a	0.69	16070.41	11141.55	miR-30c	1.06	5494.19	5828.29	miR-127	1.63	2048.61	3331.08	miR-494	0.68	10093.12	6903.17	miR-127	0.48	4400.49	2098.21
miR-128	0.76	12243.91	9304.05	miR-434	1.60	3246.94	5209.29	miR-23b	1.23	2678.36	3304.33	miR-30d	0.68	9956.12	6758.67	miR-22	0.65	3165.74	2044.96
miR-183	0.87	10377.16	8993.28	miR-24	0.85	6013.94	5111.79	miR-23a	1.26	2504.11	3166.08	miR-195	0.60	9468.87	5679.92	miR-434	0.67	2907.99	1952.71
miR-29a	0.54	13561.41	7310.30	miR-22	1.04	4871.69	5068.04	miR-434	1.97	1588.36	3127.83	miR-204	1.06	5023.12	5317.92	miR-34a	0.35	5222.99	1843.96
miR-191	1.01	4179.91	4221.28	miR-23b	1.25	3913.94	4876.29	miR-181a	1.10	2838.36	3113.83	miR-24	0.71	7386.12	5225.42	miR-30d	0.52	3242.74	1686.46
miR-30c	0.59	6392.41	3752.53	miR-127	1.02	4651.94	4726.04	miR-99a	1.06	2857.11	3032.83	miR-352	0.56	7446.37	4134.17	miR-23b	0.34	4427.99	1494.46
miR-352	0.76	4455.16	3405.03	miR-23a	1.29	3626.44	4665.04	miR-24	0.95	2935.36	2787.33	miR-16	0.57	6896.37	3911.67	miR-125a-5p	0.45	3248.24	1458.46
miR-181a	0.42	7374.66	3082.30	miR-125a-5p	0.96	3874.94	3715.29	let-7i	1.02	2613.61	2670.58	let-7i	0.48	8189.12	3905.67	miR-128b	0.45	3101.24	1410.21
miR-125a-5p	0.66	4002.41	2626.30	miR-376b-3p	1.10	3369.94	3704.29	miR-22	1.22	2149.36	2632.83	miR-191	0.91	3913.12	3566.67	miR-27b	0.48	2770.99	1329.46
miR-129*	0.72	3635.66	2622.78	miR-30d	0.90	3871.44	3493.04	miR-352	1.08	2194.11	2358.83	miR-23b	0.85	4126.37	3511.17	miR-128	0.36	3540.49	1283.46
let-7i	0.53	4661.16	2448.05	miR-29b	0.89	3541.19	3136.79	miR-218	0.79	2918.86	2304.83	miR-23a	0.80	3415.37	2727.67	miR-21	0.61	2035.49	1251.21
miR-30d	0.49	4539.66	2230.03	miR-137	0.78	3701.44	2894.79	miR-221	1.31	1708.11	2231.58	miR-129	0.95	2632.87	2496.92	miR-181b	0.61	2060.99	1247.71
miR-132	0.71	3085.41	2189.55	let-7i	0.83	3296.94	2733.04	miR-191	1.94	1139.61	2216.33	miR-30a-5p	0.39	6184.87	2399.17	miR-23a	0.26	4240.74	1099.96
miR-141	0.61	3378.16	2049.03	miR-107	0.98	2608.69	2569.29	let-7e	1.07	2012.61	2151.83	miR-434	0.90	2528.37	2266.17	let-7i	0.30	3682.49	1089.71
miR-16	0.61	3313.66	2034.53	miR-99a	1.11	2307.44	2567.29	miR-29b	1.13	1887.36	2126.08	miR-127	0.89	2488.37	2216.92	miR-99a	0.51	2136.24	1080.71



**Tabla Suplementaria 3. Expresión Relativa y Absoluta de miRNAs de Cinco Regiones del Cerebro de la Rata Adulta (3SD). Parte II.**

miR	SOB/Ob	Ob	SOB	miR	SCx/Cx	Cx	SCx	miR	SHp/Hp	Hp	SHp	miR	SCb/Cb	Cb	SCb	miR	SBs/Bs	Bs	SBs
miR-376b-3p	0.94	2089.91	1966.05	miR-352	0.84	2931.69	2459.04	miR-30d	1.12	1873.61	2089.58	let-7e	0.59	3629.12	2142.92	miR-30a-5p	0.50	2124.99	1068.96
miR-22	0.75	2472.91	1853.03	miR-103	1.00	2422.69	2410.79	miR-103	1.02	1834.11	1877.08	miR-328	0.97	2184.87	2127.42	miR-107	0.54	1870.99	1001.46
miR-24	0.60	2934.41	1751.03	miR-191	1.05	2113.69	2226.29	miR-107	1.15	1617.36	1856.33	miR-22	0.68	3057.37	2091.67	miR-376b-3p	1.16	821.99	951.46
let-7e	0.56	2940.41	1643.05	miR-98	1.27	1687.69	2137.79	miR-100	1.17	1457.61	1712.58	miR-101b	0.61	3090.87	1897.42	miR-191	0.49	1815.74	885.96
miR-127	0.93	1543.91	1439.05	miR-221	1.22	1694.69	2068.54	miR-132	1.97	815.36	1604.08	miR-378	0.66	2830.87	1868.17	miR-328	0.71	1223.49	869.71
miR-30b	0.74	1743.66	1291.28	let-7e	0.90	2275.44	2055.04	miR-222	1.26	1190.36	1498.58	miR-30b	0.69	2370.37	1631.42	miR-352	0.32	2322.99	737.46
miR-107	0.68	1815.16	1232.28	miR-328	1.17	1698.94	1983.29	miR-328	1.28	1042.86	1333.83	miR-99a	0.72	2232.12	1612.42	miR-16	0.44	1614.74	711.46
miR-98	0.53	2308.41	1223.78	miR-30a-5p	0.69	2803.69	1938.79	miR-30a-5p	0.90	1400.36	1265.08	miR-103	0.70	2258.12	1571.67	miR-132	0.85	831.49	709.71
miR-103	0.65	1807.66	1181.78	miR-129	1.23	1545.44	1897.54	miR-98	0.90	1397.36	1256.33	miR-107	0.56	2628.12	1461.67	miR-103	0.35	1996.74	700.71
miR-204	0.88	1201.91	1063.03	miR-27b	0.88	2080.44	1823.04	miR-30b	1.19	952.86	1138.58	miR-320	0.99	1449.87	1433.92	miR-204	0.35	2008.99	700.71
miR-23b	0.65	1569.66	1025.78	miR-218	0.65	2569.69	1681.29	miR-204	0.90	1232.61	1105.58	miR-181b	0.80	1777.37	1415.67	miR-29c	1.13	608.74	689.71
miR-30a-5p	0.37	2705.66	1007.03	miR-100	1.12	1481.19	1663.54	miR-137	0.80	1267.86	1014.58	miR-181c	0.97	1430.62	1393.67	miR-100	0.45	1329.99	594.46
miR-129	0.87	1153.91	1003.80	miR-222	1.11	1456.44	1621.04	miR-27b	1.03	925.11	953.58	miR-27b	0.67	1827.62	1223.92	miR-98	0.36	1611.24	585.21
miR-434	0.95	1014.41	960.78	miR-138	0.85	1850.69	1570.79	miR-664	1.74	539.11	939.33	miR-185	0.57	2012.12	1138.92	miR-181c	0.81	714.49	578.71
miR-26b	0.65	1363.91	890.53	miR-30b	0.98	1585.69	1552.54	miR-16	0.99	925.61	915.83	miR-98	0.42	2489.37	1057.42	miR-27a	0.39	1372.24	529.71
miR-378	0.72	1212.41	878.78	miR-29c	0.93	1589.94	1486.54	miR-181b	0.99	872.11	861.58	miR-34a	0.47	2006.37	951.67	miR-326	0.78	654.49	510.46
miR-99a	0.57	1453.66	829.30	miR-101b	1.19	1148.19	1368.04	miR-185	1.23	645.11	792.33	miR-342-3p	1.59	558.37	889.17	miR-129	0.73	654.74	478.71
miR-100	0.66	1251.41	820.28	miR-664	1.39	950.94	1326.04	miR-382	2.23	318.61	709.83	miR-100	0.97	907.37	882.42	miR-185	0.34	1390.74	468.71
miR-23a	0.56	1387.91	784.03	miR-16	0.64	1990.19	1282.79	miR-329	1.83	385.36	706.83	miR-99b	1.12	768.62	859.92	let-7e	0.22	1957.99	436.96
miR-341	4.15	186.16	772.05	miR-27a	0.76	1644.19	1250.29	miR-129	1.31	522.11	681.83	miR-218	0.37	2288.87	842.92	miR-30b	0.37	1162.49	430.21
miR-328	0.70	1100.66	767.03	miR-181b	1.18	996.44	1177.04	miR-487b	1.99	342.11	680.83	miR-26b	0.49	1522.37	745.67	miR-382	0.46	909.99	418.96
miR-29b	0.22	3397.66	760.78	miR-181c	1.43	781.19	1120.79	miR-376b-3p	0.31	2206.61	676.83	miR-29b	0.21	3439.62	710.92	miR-338	0.51	693.99	353.96
miR-181c	0.61	1238.41	757.78	miR-154	1.34	808.44	1084.29	miR-539	1.68	366.36	614.33	miR-361	0.83	840.37	700.67	miR-134	0.60	487.24	291.96
miR-151*	0.84	876.41	737.03	miR-382	1.44	718.44	1034.79	miR-195	1.41	423.61	595.83	miR-194	0.81	660.87	536.42	miR-219-5p	0.69	421.99	290.21
miR-27b	0.56	1232.66	686.53	miR-185	1.04	913.69	951.04	miR-342-3p	2.89	199.11	575.08	miR-497	0.50	1065.37	536.42	miR-664	0.46	619.24	282.96
miR-181b	0.52	1218.66	639.28	miR-331	1.18	693.19	816.04	miR-151*	1.29	412.36	532.83	miR-324-3p	1.02	522.62	534.67	miR-218	0.23	1207.24	282.71
miR-21	0.59	1081.66	637.28	miR-342-3p	1.72	448.19	772.54	miR-99b	1.59	330.86	524.58	miR-27a	0.44	1190.37	527.67	miR-101b	0.52	538.49	278.71
miR-195	0.41	1497.16	609.53	miR-487b	1.31	586.44	770.04	miR-27a	0.91	514.61	470.58	miR-154	0.59	767.87	455.17	miR-137	0.57	477.49	271.71
miR-137	0.62	909.41	563.05	miR-151*	0.97	790.94	768.54	miR-26b	0.92	509.61	469.33	miR-664	0.89	500.12	446.42	miR-154	0.44	573.99	252.96
miR-101b	0.38	1322.91	508.03	miR-329	1.47	494.19	725.04	miR-29c	0.50	880.86	444.08	miR-132	1.43	307.12	438.17	miR-151*	0.36	628.74	223.46
miR-93	0.85	542.16	460.53	miR-21	0.80	864.44	692.79	miR-326	0.84	519.36	436.58	miR-29c	0.23	1692.37	395.67	miR-26b	0.21	1017.99	213.71
miR-185	0.57	789.66	452.78	miR-204	1.55	440.44	684.29	miR-361	2.15	194.99	419.58	miR-382	0.77	508.12	390.92	miR-330	0.44	476.24	209.71



**Tabla Suplementaria 3. Expresión Relativa y Absoluta de miRNAs de Cinco Regiones del Cerebro de la Rata Adulta (3SD). Parte III.**

miR	SOB/Ob	Ob	SOB	miR	SCx/Cx	Cx	SCx	miR	SHp/Hp	Hp	SHp	miR	SCb/Cb	Cb	SCb	miR	SBs/Bs	Bs	SBs
miR-331	0.69	657.66	452.53	miR-335	1.29	530.19	683.29	miR-154	2.06	199.86	411.58	miR-326	0.71	540.12	386.17	miR-381	0.75	275.99	206.96
miR-664	0.55	813.66	448.78	miR-539	0.87	783.44	677.79	miR-101b	0.86	476.36	408.33	miR-151*	0.84	409.62	342.92	miR-195	0.40	479.99	193.21
miR-342-3p	1.00	431.66	433.03	miR-326	0.92	706.44	646.79	miR-323	2.24	175.11	392.83	miR-130a	0.44	774.12	336.92	miR-138	0.86	216.74	185.46
miR-101a	0.54	782.66	424.53	miR-101a	1.14	533.69	606.54	miR-21	0.95	366.86	347.33	miR-21	0.46	695.37	321.67	miR-341	0.75	247.74	184.71
miR-214	0.33	1232.41	407.03	miR-195	0.55	1034.44	567.54	miR-331	1.23	278.36	341.33	miR-148b	1.00	304.87	306.17	miR-300-5p	0.58	295.99	171.46
miR-19b	0.82	494.41	403.78	miR-323	1.41	390.44	552.04	miR-543	3.79	74.86	284.08	miR-106b	0.49	600.37	292.17	miR-148b	0.59	264.74	157.21
miR-335	1.18	340.41	402.78	miR-34a	0.69	764.69	525.79	miR-320	1.65	162.11	268.08	miR-376b-3p	0.30	916.62	277.92	miR-320	0.38	406.24	154.21
miR-138	0.50	776.16	391.28	miR-543	1.58	316.44	500.54	miR-138	0.44	595.11	260.83	miR-101a	0.24	1147.87	274.67	miR-342-3p	0.40	385.74	154.21
miR-320	0.83	458.41	380.03	miR-324-3p	1.44	339.19	488.79	miR-101a	0.94	271.36	255.33	miR-329	0.86	290.12	250.42	miR-101a	0.52	266.24	137.71
miR-106b	0.60	629.66	379.28	miR-26b	0.52	931.44	487.04	miR-324-3p	1.64	144.11	236.08	miR-331	0.75	329.37	247.67	miR-331	0.33	374.99	122.96
miR-29c	0.31	1201.66	376.78	miR-361	1.62	282.44	456.29	miR-181c	0.53	441.11	231.83	miR-140*	0.82	284.37	232.92	miR-329	0.25	398.74	98.46
miR-99b	1.00	367.91	367.53	miR-212	1.66	267.19	443.54	miR-148b	1.34	158.61	211.83	miR-323	1.21	173.26	209.67	miR-19b	0.33	297.49	97.21
miR-20a	0.96	373.16	359.03	miR-381	1.12	379.69	426.29	miR-341	1.43	141.11	201.58	miR-93	0.58	355.37	205.08	miR-324-3p	0.42	206.49	87.21
miR-218	1.41	240.16	339.30	miR-341	0.69	616.69	423.79	miR-433	2.50	79.36	198.58	miR-15b	0.90	225.62	202.92	miR-539	0.28	308.24	85.46
miR-28	1.03	321.16	331.03	miR-300-5p	1.30	324.19	422.79	miR-335	3.96	49.99	197.83	miR-30a	0.93	190.37	177.42	miR-378	0.20	407.74	81.21
miR-17-1-3p	0.63	500.66	313.78	miR-146a	1.83	222.94	408.29	miR-330	2.51	75.86	190.08	miR-381	0.46	385.12	175.67	miR-93	0.23	350.24	80.71
miR-27a	0.35	793.41	277.28	miR-148b	1.18	340.44	402.54	miR-346	3.22	56.11	180.58	miR-137	0.35	493.87	174.42	miR-15b	0.23	343.99	80.46
miR-148b	0.50	515.41	257.78	miR-378	0.53	750.19	400.79	miR-126	0.10	1725.61	177.08	miR-487b	0.72	234.12	168.17	miR-214	0.31	194.99	60.32
miR-324-3p	0.70	340.66	239.53	miR-186	0.93	429.94	398.79	miR-146a	3.27	53.74	175.83	miR-134	0.61	256.62	156.67	miR-99b	0.14	367.24	52.21
miR-92b	0.79	301.91	239.03	miR-134	1.18	334.19	394.04	miR-93	1.79	97.61	174.33	miR-25	0.87	166.76	145.17	miR-487b	0.28	174.49	49.71
miR-221	0.86	273.91	234.28	miR-376b-5p	0.68	567.19	385.04	miR-378	0.71	233.61	166.08	miR-543	1.07	135.62	145.17	miR-146a	0.21	225.99	48.21
miR-15b	0.74	314.41	231.78	miR-99b	1.33	274.44	364.54	miR-22*	2.24	71.24	159.83	miR-300-5p	0.48	297.37	142.42	miR-92b	0.43	89.49	38.07
miR-186	0.62	351.41	216.78	miR-19b	1.90	185.69	352.29	miR-139-5p	2.55	62.11	158.58	miR-206	0.48	288.37	139.67	miR-126	0.01	3509.49	35.96
miR-126	0.11	2023.91	215.05	miR-93	1.14	274.94	314.29	miR-19b	1.87	83.86	157.08	miR-187	0.64	210.12	135.42	miR-133b	0.08	384.49	31.21
miR-34a	0.34	610.91	205.28	miR-330	1.38	205.44	284.29	miR-214	0.09	1583.61	149.58	miR-341	0.65	199.62	129.42	miR-186	0.31	97.24	30.32
miR-326	0.42	485.16	202.53	miR-214	0.37	769.94	282.04	miR-379	1.17	119.61	140.08	miR-28	0.95	129.87	123.58	miR-335	0.14	211.49	29.39
miR-222	1.03	190.66	196.53	miR-320	1.22	231.19	282.04	miR-381	2.51	52.86	132.83	miR-505	0.82	145.51	119.33	miR-17-1-3p	0.18	153.74	27.32
miR-361	0.67	284.16	189.78	miR-126	0.07	4253.44	278.79	miR-134	2.45	53.61	131.08	miR-338	0.82	144.62	118.92	miR-322*	0.15	175.24	26.57
miR-539	1.14	155.16	176.53	miR-130a	0.55	474.44	260.79	miR-300-5p	2.01	65.11	130.83	miR-335	0.48	238.87	114.33	miR-187	0.54	43.84	23.57
miR-382	0.79	214.41	168.78	miR-139-5p	1.61	153.94	248.54	miR-29c*	2.50	51.74	129.33	miR-539	0.60	189.37	114.08	miR-376b-5p	0.14	144.24	20.07
let-7d*	6.94	22.16	153.80	miR-106b	1.06	226.44	240.54	miR-92b	1.73	72.61	125.58	miR-186	0.57	185.37	106.17	miR-143	0.01	2253.49	19.82
miR-487b	0.90	161.66	145.28	miR-433	1.35	177.19	239.54	miR-15b	1.98	56.49	111.83	miR-29c*	0.44	184.12	80.33	miR-433	0.10	185.99	18.07
miR-25	1.01	119.66	120.53	miR-379	0.55	409.94	227.04	miR-106b	2.38	45.24	107.58	miR-345-5p	1.31	52.26	68.58	miR-29c*	0.23	70.99	16.07
miR-130a	0.20	592.91	120.03	miR-28	0.84	247.19	207.54	miR-322*	0.23	431.61	100.58	miR-330	2.29	29.01	66.33	miR-133a	0.03	403.49	13.32
miR-329	1.27	92.66	117.28	miR-322*	0.49	393.19	190.79	miR-34a	0.49	193.86	95.08	miR-7*	0.62	93.62	58.08	miR-361	0.05	260.24	11.89
miR-330	1.40	83.66	117.28	miR-383	1.03	175.69	181.79	miR-369-5p	2.94	30.24	88.83	miR-378	0.56	102.37	57.08	miR-140*	0.06	197.49	10.96
miR-31	0.71	162.91	115.78	miR-140*	1.05	172.19	180.79	miR-130a	0.66	133.36	88.58	miR-214	0.20	281.62	55.67	miR-145	0.01	1859.99	9.57

**Tabla Suplementaria 3. Expresión Relativa y Absoluta de miRNAs de Cinco Regiones del Cerebro de la Rata Adulta (3SD). Parte IV.**

miR	SOB/Ob	Ob	SOB	miR	SCx/Cx	Cx	SCx	miR	SHp/Hp	Hp	SHp	miR	SCb/Cb	Cb	SCb	miR	SBs/Bs	Bs	SBs
miR-140*	0.41	277.41	114.78	miR-17-1-3p	0.94	184.44	173.29	miR-376b-5p	0.82	100.86	82.72	miR-133b	0.81	64.37	52.42	miR-543	0.09	103.49	8.82
miR-146a	0.66	171.66	113.78	miR-29c*	1.08	159.44	172.79	miR-186	0.87	90.11	78.22	miR-19b	0.31	166.62	50.83	miR-130a	0.03	170.24	4.39
miR-383	1.60	60.66	97.03	miR-344a	0.72	216.44	155.29	miR-30a	3.19	21.24	67.83	miR-379	0.20	226.37	46.33	miR-151	0.14	28.74	4.07
miR-344a	0.43	224.66	96.78	miR-369-5p	1.00	145.43	144.79	miR-344a	1.62	41.74	67.58	miR-126	0.02	2539.12	42.67	miR-106b	0.03	119.24	3.64
miR-350	0.58	146.66	84.53	miR-92b	1.23	115.44	142.54	miR-374	1.49	40.86	61.08	miR-150	0.02	1745.12	38.83	miR-323	0.01	128.74	1.39
miR-322*	0.27	298.66	82.03	miR-346	1.34	101.44	136.04	miR-20a	1.86	28.99	53.83	miR-346	0.45	79.37	35.33	miR-10a-5p	0.01	51.99	0.32
miR-505	1.07	76.41	82.03	miR-351	1.43	92.44	132.04	miR-212	1.44	36.99	53.33	miR-145	0.03	1113.87	30.67	miR-10b	0.00	53.99	ND
miR-154	0.40	197.66	78.78	miR-30a	1.80	61.68	110.79	miR-338	0.79	66.86	52.83	miR-433	1.33	20.01	26.58	miR-122	0.00	21.09	ND
miR-22*	2.36	30.16	71.03	miR-22*	0.75	146.93	110.04	miR-7a	0.17	294.36	49.22	miR-146a	0.16	144.26	23.58	miR-150	0.00	2489.74	ND
miR-323	0.86	78.16	67.03	miR-187	1.34	78.94	105.54	miR-324-5p	0.92	45.49	41.72	miR-143	0.01	1953.37	23.08	miR-181a-1*	0.00	26.49	ND
miR-374	0.88	63.16	55.53	miR-143	0.03	3577.69	102.79	miR-17-1-3p	1.42	27.99	39.72	miR-130b	0.46	48.37	22.34	miR-182	0.00	166.24	ND
miR-211	1.96	26.16	51.28	miR-15b	1.09	90.69	99.04	miR-145	0.04	997.11	37.22	miR-350	0.20	81.12	16.08	miR-192	0.00	27.34	ND
miR-145	0.04	1267.66	51.03	miR-20a	0.77	127.19	97.79	miR-25	0.87	39.24	34.08	miR-138	0.10	136.37	14.08	miR-194	0.00	31.49	ND
miR-338	0.25	202.41	50.28	miR-7a	0.28	308.44	85.79	miR-140*	1.14	28.24	32.22	miR-325	0.30	38.51	11.58	miR-20a	0.00	78.99	ND
miR-30e	0.25	187.41	46.03	miR-145	0.02	2950.69	70.29	miR-150	0.03	1025.61	28.33	miR-133a	0.11	78.37	8.83	miR-210	0.00	94.49	ND
miR-7a	0.26	172.41	45.28	miR-541	0.86	78.44	67.79	miR-143	0.03	979.86	27.97	miR-192	0.10	63.76	6.08	miR-22*	0.00	46.49	ND
miR-29c*	0.66	68.66	45.03	let-7d*	0.65	100.51	65.65	miR-126*	0.00	36.87	ND	miR-376b-5p	0.03	230.37	6.08	miR-221	0.00	48.24	ND
miR-324-5p	0.15	208.91	31.53	miR-374	0.64	94.43	60.54	miR-297	0.00	101.11	ND	miR-343	0.08	40.26	3.33	miR-222	0.00	34.40	ND
miR-379	0.69	43.91	30.28	miR-338	0.30	192.69	57.29	miR-30e	0.00	23.87	ND	miR-22*	0.09	23.26	2.08	miR-25	0.00	90.24	ND
miR-30a	0.71	40.66	29.03	miR-194	1.15	47.94	55.04	miR-376c	0.00	55.74	ND	miR-344a	0.08	27.76	2.08	miR-28	0.00	45.24	ND
miR-134	0.30	87.16	26.53	miR-345-5p	2.09	25.93	54.29					miR-126*	0.00	38.01	ND	miR-297	0.00	47.74	ND
miR-376b-5p	0.36	67.41	24.28	miR-409-5p	0.37	141.69	52.54					miR-140	0.00	42.37	ND	miR-298	0.00	79.49	ND
miR-381	0.45	40.66	18.28	miR-365	1.11	46.43	51.54					miR-17-1-3p	0.00	44.76	ND	miR-30a	0.00	128.24	ND
miR-351	0.57	27.41	15.53	miR-153	0.56	89.44	50.15					miR-210	0.00	21.76	ND	miR-31	0.00	28.74	ND
miR-497	0.14	93.91	12.78	miR-130b	0.46	101.69	47.04					miR-219-5p	0.00	112.62	ND	miR-324-5p	0.00	87.99	ND
miR-153	0.61	20.16	12.28	miR-150	0.03	1759.44	46.89					miR-297	0.00	55.62	ND	miR-339	0.00	22.90	ND
miR-297	0.02	402.41	9.03	miR-25	1.35	27.18	36.64					miR-301a	0.00	26.62	ND	miR-345-5p	0.00	22.24	ND
miR-143	0.01	1598.41	8.53	miR-505	0.89	30.18	26.79					miR-30e	0.00	268.37	ND	miR-346	0.00	135.24	ND
miR-135b	0.01	40.66	0.28	miR-324-5p	0.11	247.44	26.54					miR-324-5p	0.00	144.26	ND	miR-350	0.00	94.24	ND
miR-150	0.00	767.41	ND	miR-31	0.43	60.43	25.79					miR-34b	0.00	30.01	ND	miR-351	0.00	21.49	ND
miR-210	0.00	140.16	ND	miR-350	1.00	21.93	21.89					miR-34c	0.00	134.37	ND	miR-369-5p	0.00	27.65	ND
miR-130b	0.00	127.66	ND	miR-136	0.23	53.26	12.15					miR-322*	0.00	104.37	ND	miR-379	0.00	301.49	ND
miR-152	0.00	95.16	ND	miR-126*	0.01	239.44	3.14					miR-451	0.00	101.37	ND	miR-451	0.00	124.74	ND
miR-140	0.00	84.91	ND	miR-497	0.03	80.94	2.14									miR-485	0.00	23.90	ND
miR-126*	0.00	66.91	ND	miR-140	0.00	75.94	ND									miR-497	0.00	28.90	ND
miR-300-5p	0.00	61.16	ND	miR-196b	0.00	143.76	ND												
miR-187	0.00	50.66	ND	miR-199a-3p	0.00	23.51	ND												



**Tabla Suplementaria 3. Expresión Relativa y Absoluta de miRNAs de Cinco Regiones del Cerebro de la Rata Adulta (3SD). Parte V.**

miR	SOB/Ob	Ob	Sob	miR	SCx/Cx	Cx	SCx	miR	SHp/Hp	Hp	SHp	iR	SCb/Cb	Cb	SCb	miR	SBs/Bs	Bs	SBs
miR-181a-1*	0.00	31.16	ND	miR-210	0.00	28.68	ND												
miR-194	0.00	28.26	ND	miR-297	0.00	53.94	ND												
miR-18a	0.00	25.26	ND	miR-451	0.00	29.68	ND												
<b>Total</b>		<b>140</b>	<b>129</b>			<b>140</b>	<b>134</b>			<b>120</b>	<b>116</b>			<b>133</b>	<b>120</b>			<b>135</b>	<b>106</b>
<b>Tejido-específicos</b>		<b>11</b>				<b>4</b>				<b>1</b>				<b>7</b>				<b>6</b>	
<b>Ausentes en SN</b>			<b>11</b>			<b>6</b>				<b>4</b>				<b>13</b>				<b>29</b>	
<b>Loc. sináptica (%)</b>			<b>92.14</b>			<b>95.71</b>				<b>96.67</b>				<b>90.23</b>					
<b>R<sup>2</sup></b>			<b>0.93</b>			<b>0.96</b>				<b>0.77</b>				<b>0.96</b>				<b>0.83</b>	
<b>Porcentaje del total de miRNAs de rata</b>		<b>58.58</b>	<b>53.97</b>			<b>58.58</b>	<b>56.07</b>			<b>50.21</b>	<b>48.54</b>			<b>55.65</b>	<b>50.21</b>			<b>56.49</b>	<b>44.35</b>

miRNAs en rojo son tejido-específicos

ND; no detectado en SN

Los miRNA enmarcados con líneas punteadas fueron seleccionados por MAANOVA



Cb	Secuencia	nt	Cb	Secuencia	nt
miR-30a	UG-UAAAC-AUCCU-CGA--CUGGAAG-----	22	miR-22*	-----A-GU-----UCUU--CAGUG--G-CAA-GCUUUA	22
miR-378	-----ACUGGACUUGGAGUC-AGAAGG-----	21	miR-301a	-----CA-GU-----GCAA--UAGUAUUGUCAAGC----	23
miR-134	UGU--GACUGGUU--GA--CCAGAGGG-----	22	miR-126*	-----CAUUUU--UACUU--UUG--G--UACGCG----	21
miR-379	UGGUAGACUA---UGGAA-C--GUAGG-----	21	miR-140	-----CAGUGGUUUUA--CC--CUAU--GGU-AG----	22
miR-15b	---UAG-CAG---CACAU--AU--GGUUUACA-----	22	miR-376b-5p	-----GUGGAU--AU-UCCUU--CUAU--GGUUA-----	22
miR-497	---CAG-CAG---CACA-C-UGU--GGUUUGUA-----	22	miR-219-5p	-----UGAUUG--UCCAA--ACGC-----AAUUCU----	21
miR-505	---GUCAA---CACU--UGCUGGUU-UCC-----	20	miR-350	-----UUACAAG-----CCAU-ACACUUU--CA-C-----	24
miR-300-5p	---UUG-AAG---AGAG---G-UUUA--CCUUUGU-----	22	miR-451	-----AAACCCUU-----ACCAUACUG-----AGUU-----	22
miR-539	---G-GAG---AAAU---U---AU--CCUUGGUGUGU-----	22	miR-210	-----CUGUG--CGUGUGACAG--CGG-----CUGA-----	22
miR-382	---G-AAGUUGUUCGUG--GUGGAU--UC--G-----	22	miR-343	---U---C-UCCCUC--CGUGGCC--CAG-----A-----	20
miR-100	----AACC-C-----GUAGAUCGAAACUUGUG-----	22	miR-133a	UUUG---G-UCCC-CUUA---AC---CAG-----CUG-----	22
miR-326	-----CCUC--UG-GGC--CCUCCUCCAGU-----	21	miR-192	-CUG---A-CCUAUG--AAUUGACAG--CC-----	21
miR-106b	-----UAA--AGUGCUGAC-AGU-GCAG-AU-----	21	miR-378	ACUG---G-ACUU-G--GA--GUCAG--AAG-----G-----	21
miR-345-5p	-----UGC---UG-AC-CCCUAGU-CCAGUGC-----	21	miR-34b	---A---G-GCAGUGU--AAUUGACUG--AUU-----GU-----	23
miR-335	-----UCAAG--AGCAAUAACGAAAAAUU-----	23	miR-34c	---A---G-GCAGUGU--AGUUGACUG--AUU-----GC-----	23
miR-381	---UAUACAAG--GGCAA--GUCUCU-----	18	miR-297	-AUGUAUGUGUGCAU-GU-----AU-G--CAU-----G-----	23
miR-130a	-----CA-G---UGCAAU-GUAAAAGGGCAU-----	22	miR-30e	--UGUAAACAU-CCUUG-----ACUG--GAA-----G-----	22
miR-206	-----UG-----GAAUGUAAG-GAAGUGUGU-GG-----	22	miR-17-1-3p	ACU-----GCA--G--UG-AAGGCAC--UUU-----G-G-----	22
miR-338	-----UCCA-----GCAU--CAGUGAUU-UUGUUGA-----	23	miR-324-5p	-C-----GCAUCC--CCUAGGGCAU--U-G-----GUGU-----	23
miR-137	-----UUAU---UGCU--UAAG-AAUACGCG-UAG-----	23	miR-344a	UCAG-----GCU---CCU--GGCUA---G-----AUU-----	19

Bs	Secuencia	nt	Bs	Secuencia	nt
miR-9	----UCUUUGGUUU--CU---AG-CUGUAU--GA-	23	let-7a	-UGAG-GUAGUAG---GUUGUAUAGUU----	22
miR-98	---UGA---GGU-AGU--A---AG-UUGUAU--UGUU	22	let-7d	-AGAG-GUAGUAG---GUUGCAUAGUU----	22
miR-382	-----G--AAGUUGU--UCG---UG-GUGGAUU-CG-	22	let-7e	-UGAG-GUAGGAG---GUUGUAUAGUU----	22
miR-485	----AG--AGGCUGG---CCG---UG-AUGAAUU-C--	22	let-7f	-UGAG-GUAGUAG---AUUGUAUAGUU----	22
miR-543	-----AAGUUGC---CCG---CG-U-GUUUUUCG-	21	let-7c	-UGAG-GUAGUAG---GUUGUAUAGUU----	22
miR-93	----CA--AAGU-GCUGUUCG---UG-CAGGU--AG-	23	let-7b	-UGAG-GUAGUAG---GUUGUGUGUU----	22
miR-378	----ACU--GG--ACUU--GG---AGUCAGAAG--G--	21	let-7i	-UGAG-GUAGUAGUUUGU--GCU--GUU----	22
miR-99a	-----AACCCGU-AGAU-CCG--AUCU--UGUG-----	22	miR-103	-AGCA--G-CAUUGUACAGGGCUAUGA-----	23
miR-99b	-----CACCCGU-AGAA-CCG--ACCU--UGCG-----	22	miR-107	-AGCA--G-CAUUGUACAGGGCUAUGA-----	23
miR-451	-----AAACCGUUA---CCAUAU-CU---GAGU-U-----	22	miR-106b	UAAAGUG-CU--G-ACAGUGC-A-GAU-----	21
miR-497	-----CAGCAG-CAC--ACU---G--UG-GU-UUGUA	22	miR-124	-UAAG-G-CAC-G--CGGUGA-AUGCC-----	20
miR-539	-----GGAGAAAUUUAU--CCU---UG--GUGU--GU-	22	miR-10a-5p	UACCCUGUAUGAUCG--AAUUUGUG-----	23
miR-322*	----AAA-CAU-G-AAGCGCUG---CAACA-----	20	miR-10b	--CCCUGUAGAACC--AAUUUGUGU-----	22
miR-433	-----AU-CAU-G-AUGGGCU---CCUCGGUGU-----	22	miR-100	AACCC--GUAGAUCG--AACUUUGU-----	22
miR-381	-----UAU-ACAAGGGCAA--GCUCU-----	18	miR-125a-5p	-UCCUG--AGACCCUUUAACCUUGUGA-----	24
miR-494	---UGAAA-CAU-ACACGGGAAA--CCUCU-----	23	miR-125b-5p	-UCCUG--AGACCCU--AACUUUGUGA-----	22
miR-487b	-----AAU-CGU-ACAGGGUCAU--CCACUU-----	22	miR-101a	UACAGUACUGUGAU--AA---CUGAA-----	21
miR-434	-UUUGAAC-CAU-CACUCGACU---CCU-----	22	miR-101b	UACAGUACUGUGAU--AG---CUGAA-----	21
miR-664	----UAUU-CAUUUACUCCCCAG--CCUA-----	22	miR-126	-UCGU-ACCUGAGU--AAUA-AUGCG-----	22
miR-92b	UAUUGCACUCG--UCC-CGGCCU--CC-----	22	miR-122	--UGG-AGUGUGAC---AAU--G-GUGUUUG-----	22

# Apéndice IV

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Algunas Clases de RNAs No Codificantes (ncRNA) con Funciones Variadas.	27
Tabla 2. Clases de RNAs No Codificantes (ncRNA) Asociados al Silenciamiento Génico.	29
Tabla 3. Numero de microRNAs por Genoma en Humano, Ratón y Rata.	35
Tabla 4. Funciones Asociadas a microRNAs Pro-Neuronales.	43
Tabla 5. microRNAs Implicados con Plasticidad Sináptica.	44
Tabla 6. Valores Densitométrico Relativos de Marcadores Extra- e Intra-Sinápticos en la Fracción SN.	59
Tabla 7. Valores de Densitometría de microRNAs Maduros Cuantificados por DB.	66
Tabla 8. Valores de Densitometría de pre-miRNAs Cuantificados por DB.	67
Tabla 9. Índice de Enriquecimiento Relativo de miRNAs Sinápticos Seleccionados por MAANOVA..	80
Tabla 10. Concordancia entre Valores de Microarreglo y qRT-PCR..	83
Tabla 11. Expresión de Secuencias Líder y Pasajeras (*) de miRNAs Medidos por Microarreglo.	88
Tabla 12. microRNAs Sinápticos (Top-20) Asociados a Patologías Neurológicas.	90

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Anatomía de una Neurona y de los Contactos Sinápticos.	16
Figura 2. Tipos de Sinapsis	18
Figura 3. Cascada de Señalización Inducida Durante la Potenciación a Largo Plazo (LTP) en Rata.	21
Figura 4. Aparato Espinar y Ribosomas en Dendritas.	22
Figura 5. Mensajeros Localizados en Dendritas de Neuronas Hipocampales.	23
Figura 6. Transporte Anterógrado de mRNAs Somato-Dendríticos Hacia Espinas Dendríticas.	25
Figura 1.2.1. Estructura de un microRNA maduro y su precursor.	31
Figura 1.2.2. Longitud Promedio de microRNAs en Diferentes Especies.	33
Figura 1.2.3. Árbol Filogenético del microRNA Neuronal miR-124.	34
Figura 1.2.4. Conservación Filogenética del Precursor de miR-124 en Animales.	35
Figura 1.2.5 Modalidades de Interacción de microRNAs con su Blanco.	36
Figura 1.3.1 Vía de Maduración de microRNAs en Mamíferos.	40
Figura 2.2.1. Funciones Asociadas de microRNAs con el Control de la Expresión Génica Global y de LTP en Neuronas.	45
Figura 2.2.1. Expresión de miRNAs en el Cerebro de Roedor.	46
Figura 2.2.2. microRNAs Somato-Dendríticos con Función Localizada en Espinas Dendríticas.	47
Figura 2.2.3. Mecanismo Concertado de Regulación de las Espinas Dendríticas por microRNAs.	48
Figura 2.2.4. Frecuencia de Secuencias Semilla de miRNAs en Mensajeros Somato-Dendríticos.	48
Figura 2.2.5. Dicer y Ago en Dendritas de Neuronas Maduras.	49
Figura 2.2.6. Modelo General de Regulación Traduccional por microRNAs en Espinas Dendríticas.	50
Figura 4.1.1. Método de Purificación de Sinaptoneurosomas (SN).	54
Figura 4.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión de Sinaptoneurosomas de Cerebro Completo.	55
Figura 4.1.3. Presencia de Polirribosomas Contenidos en SN.	56
Figura 4.1.4. Análisis Ultraestructural de SN de Cinco Regiones del Cerebro.	56
<b>PANEL A. Regiones del Cerebro.</b>	57
Figura 4.1.6. Western Blot de Marcadores de Núcleo, Gíala, Soma Neuronal, Sinapsis y RISC en Fracciones Asociadas a la Purificación de SN.	58
Figura 4.3.1. RT-PCR de punto final de Tubc1 y Gapdh en SN.	60
Figura 4.3.2. Integridad del RNA en SN.	61
Figura 4.3.3. Curvas de Amplificación por qRT-PCR de mRNAs de Soma y Sinapsis.	62
Figura 4.3.4. Perfil de Expresión de mRNAs de Soma y Somato-Dendríticos en SCe.	62
Figura 4.3.5. Expresión de mRNAs Marcadores de Soma o Sinapsis en la Fracción Nuclear P1.	63

<b>Figura</b>	<b>Pág.</b>
Figura 4.4.1. Análisis de Expresión de microRNAs Sinápticos por Dot Blot.	64
Figura 4.4.2. Histograma de Expresión de microRNAs Sinápticos Analizados por DB.	65
Figura 4.5.1. Northern blot de microRNAs de Homogenado Total y SN de Ce, Cx y Hp.	68
<b>PANEL B. Método de Amplificación por qRT-PCR de microRNAs con Sondas Taqman®.</b>	69
Figura 4.6.1. qRT-PCR de microRNAs Maduros en SN.	70
Figura 5.1.1. Modelo de Diseño de Asa (loop design) para el Análisis de Microarreglos.	77
Figura 5.1.2. Gráfico MA de Control de Calidad de los Datos de Microarreglo.	77
Figura 5.1.3. Análisis por Microarreglo de la Expresión de microRNAs en SN (3SD).	78
Figura 5.1.4. Comparación de Resultados entre los Métodos Estadísticos de MAANOVA y 3SD.	78
Figura 5.1.5. Heatmap de microRNAs Seleccionados por MAANOVA.	79
Figura 5.1.6 Expresión Relativa (SN/Total) de microRNAs de Ce.	81
<b>PANEL C. Método NCode® de Amplificación por qRT-PCR de microRNAs.</b>	82
Figura 5.1.7 Amplificación de microRNAs detectados en S Ce.	83
Figura 5.2.1 Expresión Relativa de microRNAs Sinápticos de Distintas Regiones del Cerebro (3SD).	85
Figura 5.2.2 Expresión Relativa de microRNAs por Región Analizada (3SD).	86
Figura 5.2.1 Expresión Diferencial de microRNAs Originados del Mismo Precursor.	87
Figura 5.2.4 Identificación por MAANOVA de microRNAs Diferencialmente Expresados en SN de Cinco Áreas del Cerebro.	89
Figura 5.2.5 Secuencia Consenso Basada en 20 microRNAs con la MAYOR y MENOR Expresión en SN por Región Neuroanatómica.	90
Figura 5.2.6 Análisis de Representatividad de Categorías de Gene Ontology (GO) para mRNAs Blanco Predichos para microRNAs Sinápticos.	92
Figura 5.3.1 Validación de Datos de Microarreglo por qRT-PCR de microRNAs Expresados por Región del Cerebro.	93
Figura 5.4.1. NB de microRNAs en Fracciones Total y de SN de Cinco Regiones Neuroanatómicas.	95
Figura 5.4.2. NB de miR-9 en las fracciones total y SN de 5 regiones neuroanatómicas.	95
Figura 5.4.3. NB de miR-125a en las Fracciones Total y SN de 5 Regiones Neuroanatómicas.	96
Figura 5.4.4. NB de miR-150 en las Fracciones Total y SN de 5 Regiones Neuroanatómicas.	97
Figura 5.5.1. Expresión de microRNAs Determinada por qRT-PCR en 30 Dendritas Microdisseccionadas por Láser (LCMD).	98
Figura 5.6.1. Coordenadas Cromosómicas del Clúster de miR-200.	102
Figura 6.1.1. Expresión de Receptores Ionotrópicos de Kainato en el Cerebro de Roedor y su Efecto Epileptogénico.	107
Figura 6.1.2. Protocolo Epileptogénico Inducido por KA.	108
Figura 6.2.1. qRT-PCR de microRNAs Sinápticos de Cx y Hp en Animales Tratados con KA o NaCl.	109
Figura 6.3.1. NB de miR-128 en Cx y Hp de Ratas Tratados con KA ó NaCl.	110
Figura 6.3.2. NB de miR-150 en Cx y Hp de Ratas Tratadas con KA ó NaCl.	111
Figura 6.4.1. Expresión de microRNAs en SN Estimulados con Alto Potasio in vitro.	112
Figura 6.4.2. Modelo General de Regulación de la Síntesis de Proteínas en Dendritas.	114
Figura 6.4.3 Contexto Genómico de mo-miR-125a.	116
Figura 8.9.1. Método de Marcaje por Ligación FlashTag para Microarreglo (Genisphere).	141



Author's personal copy

BRAIN RESEARCH 1436 (2012) 20–33



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)

BRAIN  
RESEARCH

Research Report

**Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation**

Israel Pichardo-Casas<sup>a</sup>, Loyal A. Goff<sup>ab</sup>, Mavis R. Swerdel<sup>b</sup>, Alejandro Athie<sup>a</sup>, Jonathan Davila<sup>b</sup>, Mariana Ramos-Brossier<sup>a</sup>, Martha Lapid-Volosin<sup>c</sup>, Wilma J. Friedman<sup>c</sup>, Ronald P. Hart<sup>b,\*</sup>, Luis Vaca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510 México

<sup>b</sup>W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, Rutgers University, Piscataway, NJ 08854-8082 USA

<sup>c</sup>Department of Biological Sciences, Rutgers University, Newark, NJ 07102 USA

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 1 December 2011

Available online 9 December 2011

Keywords:

microRNA  
Synaptoneuroosomes  
Kainic acid  
Quantitative real-time polymerase chain reaction  
Reaction  
Microarray  
miRNA-induced silencing complex

ABSTRACT

In recent years, microRNAs or miRNAs have been proposed to target neuronal mRNAs localized near the synapse, exerting a pivotal role in modulating local protein synthesis, and presumably affecting adaptive mechanisms such as synaptic plasticity. In the present study we have characterized the distribution of miRNAs in five regions of the adult mammalian brain and compared the relative abundance between total fractions and purified synaptoneuroosomes (SN), using three different methodologies. The results show selective enrichment or depletion of some miRNAs when comparing total versus SN fractions. These miRNAs were different for each brain region explored. Changes in distribution could not be attributed to simple diffusion or to a targeting sequence inside the miRNAs. In silico analysis suggest that the differences in distribution may be related to the preferential concentration of synaptically localized mRNA targeted by the miRNAs. These results favor a model of co-transport of the miRNA-mRNA complex to the synapse, although further studies are required to validate this hypothesis. Using an in vivo model for increasing excitatory activity in the cortex and the hippocampus indicates that the distribution of some miRNAs can be modulated by enhanced neuronal (epileptogenic) activity. All these results demonstrate the dynamic modulation in the local distribution of miRNAs from the adult brain, which may play key roles in controlling localized protein synthesis at the synapse.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding authors. Fax: +52556225611.

E-mail addresses: [pichardo@email.ifc.unam.mx](mailto:pichardo@email.ifc.unam.mx) (I. Pichardo-Casas), [lgoff@csail.mit.edu](mailto:lgoff@csail.mit.edu) (L.A. Goff), [swerdel@biology.rutgers.edu](mailto:swerdel@biology.rutgers.edu) (M.R. Swerdel), [alejandroathie@yahoo.com.mx](mailto:alejandroathie@yahoo.com.mx) (A. Athie), [jodavila@eden.rutgers.edu](mailto:jodavila@eden.rutgers.edu) (J. Davila), [clafouti93@hotmail.com](mailto:clafouti93@hotmail.com) (M. Ramos-Brossier), [marlapid@andromeda.rutgers.edu](mailto:marlapid@andromeda.rutgers.edu) (M. Lapid-Volosin), [wilmaf@andromeda.rutgers.edu](mailto:wilmaf@andromeda.rutgers.edu) (W.J. Friedman), [rhart@rci.rutgers.edu](mailto:rhart@rci.rutgers.edu) (R.P. Hart), [lvaca@ifc.unam.mx](mailto:lvaca@ifc.unam.mx) (L. Vaca).

Abbreviations: miRNA, microRNA; SN, synaptoneuroosomes; KA, kainic acid; qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; miRISC, miRNA-induced silencing complex

0006-8993/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2011.12.001



## 1. Introduction

Translation of synaptically localized mRNAs is critical for neuronal processes such as synaptic plasticity, learning and memory (Skup, 2008; Sutton and Schuman, 2006). However, both timing and space constraining of such process seem to be key variables that may be fine-tuned by synaptic miRNAs (Kosik, 2006; Schratt, 2009) given their ability to selectively down-regulate partially complementary target mRNAs (Bhattacharyya et al., 2006; Farh et al., 2005).

Nearly 50% of all mammalian miRNAs are expressed in the brain (Krichevsky et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Sempere et al., 2004) and many have critical roles in neurogenesis and neuronal development (Giraldez et al., 2005; Krichevsky et al., 2006), yet their roles in the adult brain remain largely unexplored.

Many miRNAs not only show differential neuroanatomical expression (Bak et al., 2008; Davis et al., 2007; Landgraf et al., 2007; Olsen et al., 2009), but also display sub-cellular compartmentalization near the synapse (Konecna et al., 2009; Schratt, 2009). Several miRNAs have been found either enriched or depleted in laser-excised dendrites (Kye et al., 2007) and in synaptoneurosomal preparations (Siegel et al., 2009), with some pre-miRNAs enriched in the post-synaptic densities (Lugli et al., 2008). Likewise, several partner proteins forming the miRNA silencing complex (miRISC) (i.e. Dicer, Argonaute 2 Lugli et al., 2005), and FMRP (Bassell and Warren, 2008; Jin et al., 2004) have been identified both pre- (Hengst et al., 2006; Murashov et al., 2007) and post-synaptically (Feng et al., 1997; Fiore et al., 2009; Kye et al., 2007; Lugli et al., 2008; Natera-Naranjo et al., 2010).

It is well documented that neuronal stimulation may elicit an increase in protein synthesis (reviewed in Martin and Zukin, 2006; Wu et al., 2007), but there is little evidence showing an effect on miRNA abundance. In some cases chemical or electrical induction of LTP/LTD (Park and Tang, 2009; Wibrand et al., 2010), exposure to cocaine (Chandrasekar and Dreyer, 2011) and alcohol (Wang et al., 2009) may exert changes in miRNA expression and processing as well. In other cases, BDNF and NMDA also appear to reverse miRNA inhibitory activity over selective messenger RNA (mRNA) targets (Banerjee et al., 2009; Kye et al., 2007).

Despite this, evidence for the involvement of miRNA activity in learning and memory has been provided only in invertebrates such as *Drosophila* (Ashraf et al., 2006) and *Aplysia* (Rajasethupathy et al., 2009), such results suggest that synaptic miRNAs act as key regulators of synaptic efficacy. However, the identity, regional and temporal abundance of synaptically localized miRNAs has not been fully established in the mammalian brain, much less their local regulation.

Here, we characterized synaptoneurosomal (SN) miRNAs based on their sequence and relative abundance across several regions of the mammalian brain. Furthermore, we explored

the effect of prolonged excitatory stimulation over synaptic miRNA abundance in the cortex and hippocampus, after acute kainic acid (KA) administration, in a model well known to exhibit extensive synaptic plasticity (Vincent and Mulle, 2009). Our findings demonstrate that miRNAs are differentially expressed at the neuroanatomical and sub-cellular levels, and that their local (synaptic) content is rapidly and selectively modulated during epileptogenic activity *in vivo*.

## 2. Results

### 2.1. Detection of miRNAs in synaptoneurosomes from total forebrain

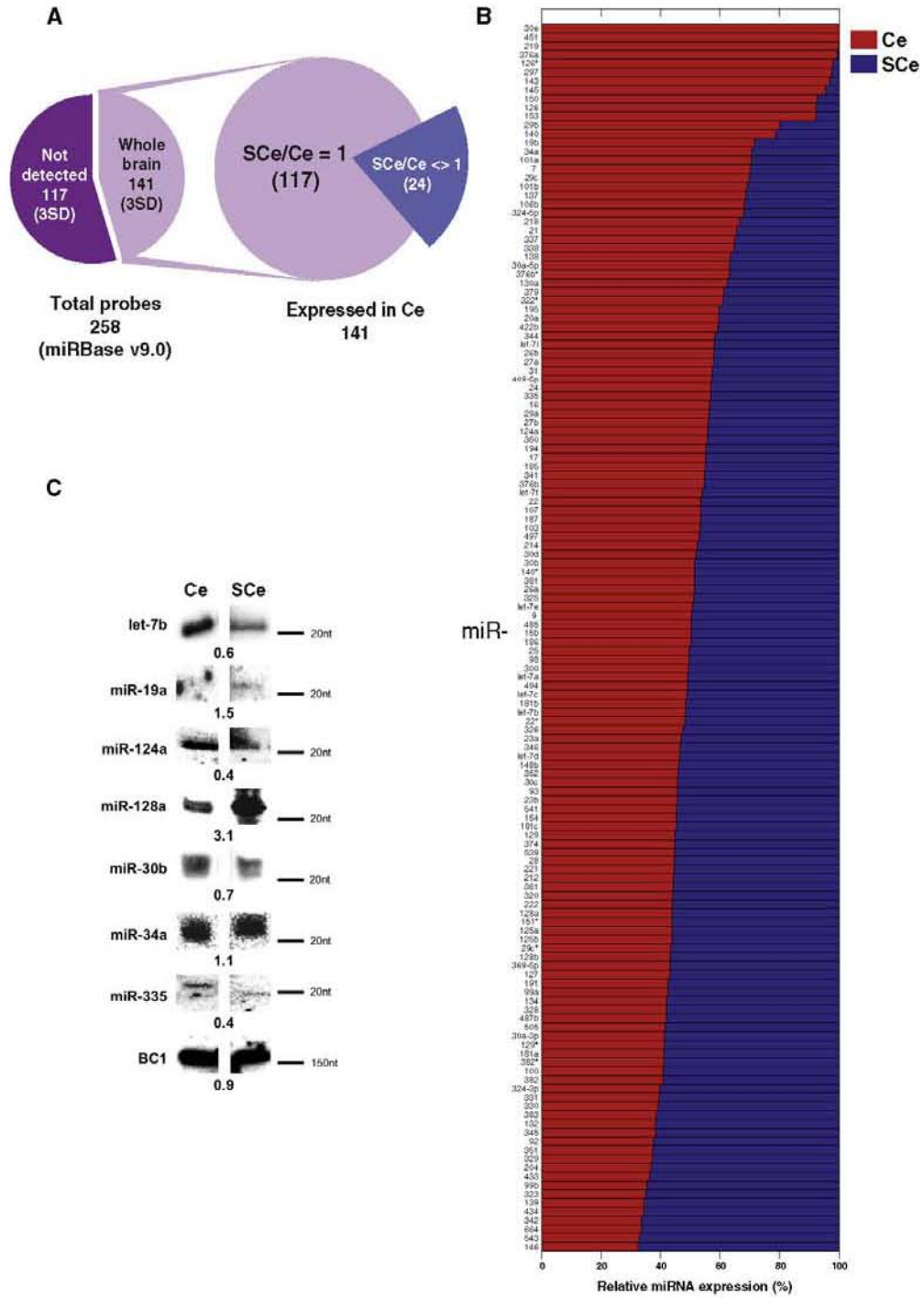
We analyzed the mRNA and protein content from synaptoneurosomes (SN) extracted from the forebrain (Ce) of adult male rats (without olfactory bulb), following a method that allows enrichment of post-synaptic densities (PSDs; Supplemental Figure 1A). SN fractions (SCe) exhibited a good integrity of synaptic structures, as judged by transmission electron microscopy (TEM), accompanied by significant absence of nuclear and soma-related proteins (Supplemental Figure 1B–E). Interestingly several components of the miRISC machinery were abundant in this fraction, including Ago family and FMRP proteins (Supplemental Figure 1C). This finding is in agreement with recent observations showing enrichment of Dicer and other miRISC proteins in postsynaptic densities (Lugli et al., 2005).

Likewise, the recovered RNA from all SN fractions showed good integrity (Supplemental Figure 2A) and qPCR analysis of SCe fractions revealed low abundance of soma-enriched mRNA markers such as ArhGEF5 or Tuba1 (Supplemental Figure 2B), which was accompanied by a significant expression of NMDAR1 and PSD-95 synaptic mRNAs (Supplemental Figure 2C). We could not detect signal amplification in the SN fraction of low molecular weight non-coding RNAs (ncRNAs), like the nucleolar marker snoRNA U43, indicating low contamination of soma or nuclear components in our SN fraction (Supplemental Figure 2D–E).

In order to determine the number and abundance of miRNAs from the forebrain, we probed 258 miRNAs (miRBase v9.0 (Griffiths-Jones, 2006; Griffiths-Jones et al., 2006)) on several microarrays arranged in a loop design, alternating Total and SCe samples following dye-swap labeling with Cy3 and Cy5 fluorophores (see Materials and Methods). We use swapping to reduce the effects of differential labeling on the results obtained.

To determine the relative abundance of these miRNAs on SCe, we used two methods of analysis, one to globally assess the number of miRNAs expressed in each sample (3SD), and the other with higher statistical stringency (MAANOVA), capable of disregarding technical effects (i. e. dye labeling

**Fig. 1 – Expression analysis of synaptoneurosomal microRNAs from the whole brain of the adult rat. (A) Pie diagram illustrating the 141 microRNAs found in the adult rat brain from the 258 explored (miRBase v9.0). (B) Percentage Ce/SCe miRNAs expression for the 141 found in the rat brain. (C) Identification of some of the most abundant matured miRNAs by Northern Blot (NB). Numbers shown below illustrate the ratio Ce/SCe from densitometry analysis. The non-coding RNA BC1 is used as control.**





efficiency, differential background intensity, or chip-to-chip variability) that commonly bias expression estimation in microarray experiments.

First we selected three standard deviations (3SD) above the average fluorescent signal intensity observed on negative control probes, as upper limit to consider any miRNA as truly expressed. Using this protocol we identified 141 miRNAs in Ce with no sample or labeling bias (Supplemental Figure 3A). These miRNAs accounted for nearly 55% of all 258 miRNAs probed in our platform. These miRNAs have been previously identified as neuronal miRNAs in mammals (Bak et al., 2008; Lagos-Quintana et al., 2002; Landgraf et al., 2007). Nearly 98% of them were also found in S<sub>Ce</sub>, although showing variable degrees of abundance as compared to Ce.

Based on the relative percentage expression ratio S<sub>Ce</sub>/Ce (named PS/T, see Materials and Methods), two subsets of miRNAs were identified (Fig. 1A). One contained 117 miRNAs expressed almost equally between both fractions (Supplemental 3B, see 3SD distribution, gray dots). The second subset contained 24 miRNAs that displayed significant differences between each fraction, either up- or down regulated in S<sub>Ce</sub> ( $P \leq 0.05$ ) (Supplemental Figure 3B). This pattern of differential expression remained similar across several sub-structures of the brain.

Such observations were corroborated by northern blot analysis (NB) for several highly expressed miRNAs (Fig. 1C). We decided to test only highly expressed miRNAs given the lower sensitivity of the NB when compared to microarray or qPCR. Nevertheless, not all mature miRNAs tested were detectable with this method (Fig. 1C). This was the case for miR-145 and miR-150, yet in the latter we observed two bands between 80 and 100 nt long (Supplemental Figure 4D). Since mature miRNAs are contained within the pre-miRNA sequences, methods such microarrays and qPCR cannot distinguish between both structures, whereas NB can identify both of them based on the migration pattern in the electrophoresis. This is the reason we considered relevant to study several abundant miRNAs with NB.

In order to verify the expression differences between the total and SN fractions detected by microarray, we used the same RNA as input in real-time qPCR for 21 candidate miRNAs. We selected these candidates based on our stringent MAANOVA method (Table 1A).

As expected, after comparing SN/Total ratios from microarray and real-time qPCR data, all six significant miRNAs positively correlated between both methods, although with slight differences in magnitude (Supplemental Figure 5 and Table 1B). In agreement with microarray data, qPCR showed that several miRNAs, such as miR-143 and miR-145 were nearly absent in S<sub>Ce</sub> (Supplemental Figure 5).

These results indicate that miRNA abundance in SN has a selectivity component, which does not necessarily depends upon the level of expression observed in the total fraction (containing mainly cell bodies and glia).

## 2.2. Identification of synaptic microRNA expression patterns by brain region

Several groups have demonstrated that miRNAs are differentially expressed across the brain (Bak et al., 2008; Landgraf et

**Table 1A – Relative expression of miRNAs from Ce and S<sub>Ce</sub> selected by MAANOVA. Relative abundance is represented as the ratio S<sub>Ce</sub>/Ce for significant miRNAs expressed in the whole brain.**

miRNA	Microarray (SN/Total)
miR-347	1.36
miR-434	1.36
miR-342	1.35
miR-92	1.35
miR-92b	1.32
miR-146	1.32
miR-323	1.31
miR-327	1.31
miR-204	1.30
miR-329	1.29
miR-132	1.28
miR-142-5p	1.26
miR-339	1.25
miR-344	1.25
miR-139	1.24
miR-485	1.23
miR-99b	1.23
miR-146b	1.21
miR-331	1.19
miR-382	1.19
miR-184	1.19
miR-495	1.18
miR-338	1.18
miR-487b	1.17
miR-181a	1.17
miR-652	1.17
miR-30e*	1.17
miR-196a	1.16
miR-422b	0.86
miR-195	0.84
miR-199a*	0.81
miR-705	0.78
miR-466	0.77
miR-265	0.75
miR-352	0.72
miR-467a	0.64
miR-467b	0.60
miR-685	0.51
miR-690	0.42
miR-650	0.42
miR-154	0.39
miR-151*	0.35
miR-129	0.35
miR-150	0.35
miR-709	0.34
miR-126	0.33
miR-145	0.33
miR-143	0.08

al., 2007; Olsen et al., 2009). However, to this date there is no evidence suggesting that both the type and levels of expression also show a regional correlation for synaptically localized miRNAs. We explored whether the expression pattern of each region was maintained at the synaptic level across five major regions of the brain: olfactory bulb (Ob), cortex (Cx), hippocampus (Hp), cerebellum (Cb), and brain stem (Bs). We will be referring henceforward to each SN fraction with a capital "S" next to the name of their total homogenate fraction.

**Table 1B – qPCR validation of highly enriched or depleted miRNAs in synaptoneurosomes from the whole brain.**

miRNA	Microarray (SN/total)	qPCR (SN/total)	P-val (qPCR)
miR-434	1.36	2.5±0.17	5.00×10 <sup>-4</sup>
miR-132	1.28	2.29±0.48	8.30×10 <sup>-2</sup>
miR-181a	1.17	2.14±0.17	5.40×10 <sup>-2</sup>
miR-126	0.33	0.06±0.01	2.24×10 <sup>-7</sup>
miR-145	0.33	0.06±0.06	3.25×10 <sup>-7</sup>
miR-143	0.08	0.05±0.01	8.86×10 <sup>-6</sup>

Six candidates were selected for qPCR after MAANOVA. Note that relative enrichment resulted higher in the qPCR assays likely due to the sensitivity of the method. P values represent significant statistical differences calculated by paired Student's t test (n=3).

We used the same microarray loop design model, alternating dye-swapped samples to test for the highest consistency of miRNA expression across biological replicates. Data showed good linearity, with no major sample and labeling bias (Supplemental Figure 6A). miRNAs not detected in the total fraction were excluded from this analysis.

On average, synaptoneurosomal miRNAs from all regions accounted for over 50% of all probed rat miRNAs, as shown for Ce. We found that 140 miRNAs were expressed in Ob, 140 in Cx, 120 in the Hp, 133 in Cb, and 135 in Bs (Fig. 2A), meanwhile their respective SN fractions had 129 miRNAs in SOb, 134 in SCx, 116 in SHp, 120 in SCb, and 106 in SBs (Fig. 2A and Supplemental Table 1). From these, only 104 miRNAs showed common expression across all tissues, while only a reduced number were tissue-specific (Figs. 2B–C). For example miR-183, miR-200, miR-200a, miR-200b, miR-211 and miR-429 were exclusively and strongly expressed in the olfactory bulb (Fig. 2C). Others like miR-206 and miR-378 were selectively and strongly expressed in the cerebellum (Fig. 2C).

In all structures studied, we identified the same two groups of miRNAs based on their distribution between total and SN fractions. A first group of miRNAs with equal expression between total and SN, and a second group with miRNAs that were either more or less abundant in SN when compared to total.

Interestingly, the number and relative abundance of synaptic miRNAs varied according to the tissue type (Fig. 3A). For instance, nearly 97% of miRNAs expressed in the hippocampus were also present in its SN fraction, and their relative expression levels were more prominent in SN as compared to other tissues. For instance, miR-365 was very abundant in SHp, but found in the same proportion between Cx and SCx, and absent in Ob, Cb and Bs (Fig. 3A). On the other hand, miR-152 was present in all total fractions (with the exception of Hp), but almost absent in their SN counterparts (Fig. 3A).

In fact, five miRNAs showed enrichment of more than three-fold in SHp but only two miRNAs were enriched in SOb, as opposed to what it was found in SCe with almost no miRNA expressed more than two-fold in average (Fig. 3B). Finally, only the brain stem displayed the lowest number of synaptically enriched miRNAs (~79%). The functional significance of this interesting observation remains to be explored.

Since precursor miRNAs (pre-miRs) may contain one or two mature miRNAs inside the precursor, and because very

little is known about how precursors are processed in the brain, we decided to conduct experiments to determine if there was selective maturation in the SN fractions reflected as differential amounts of the leader or the star sequences from selected miRNAs. Fig. 3C illustrates the ratio leader/star for several miRNAs previously identified in the five regions of the brain explored. This analysis yielded very interesting results, for instance, miR-151 star was very abundant in SOb but absent in Ob (Fig. 3C). The opposite was observed in the Hp, where the same miR-151 star was very abundant, but absent in SHp. In general, for all miRNAs explored, we observed differential presence of leader and star sequences in total and SN fractions. These results indicate selective processing and maturation of pre-miRNAs. Although with these experiments we cannot determine if the processing is taking place in situ (the synapse), is worth mentioning that recent studies have identified Dicer (the protein responsible for pre-miRNA maturation) enriched at postsynaptic densities (Lugli et al., 2005).

Another interesting observation was that several paralogous miRNAs were differentially expressed throughout the brain. For instance miR-34b and miR-34c were expressed almost exclusively in the cerebellum, although with low levels in its SN fraction (Fig. 3A). In spite of the remarkably high sequence identity with miR-34a (85.1% identity), only the later displayed a wider distribution throughout all tissues, especially in the brain stem where its abundance was almost two-fold as much as in Cb and SCb (Fig. 3A).

This remarkable differential localization for SN-enriched miRNAs across brain regions could not be explained by a consensus signal inside the miRNAs. Sequence alignment of twenty miRNAs from each region, whose SN/Total ratio appeared in the top-most or in the bottom-least list of relative expression in SN, did not return a clearly identifiable consensus signal or tract that may explain its synaptic distribution. This analysis strongly suggest that heterogeneity might be related to other regulatory mechanisms, such as mRNA target association and transport to the synapse (Supplemental Figure 7).

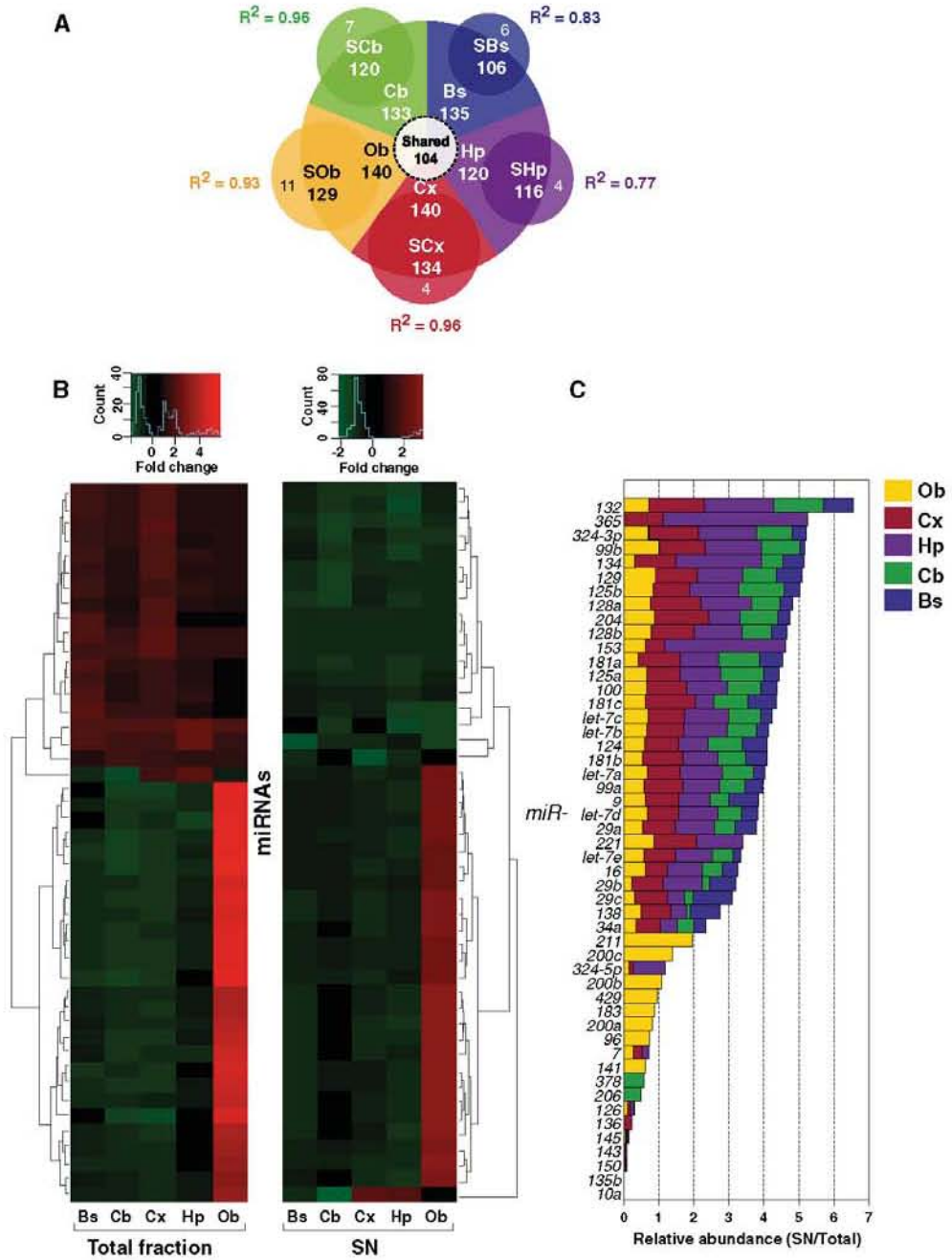
We conducted Northern Blot (NB) analysis of several miRNAs in order to identify the relative abundance of pre-miRNAs and mature miRNAs. NB results showed good correlation with microarray and qPCR data, although not with the same magnitudes (Compare Supplemental Figures 4 and 5). This result was somewhat expected due to differences in sensitivity and selectivity in these methods.

It was remarkable that migrating bands with expected sizes for their pre-miRNAs (between 60 to 150 nt) showed significantly more abundance than the mature fragments when inspecting mature/precursor band density ratios (see pixel intensity plots in Supplemental Figure 4B–D and hairpin structures in the far right side). Moreover, the relative abundance ratios also displayed some degree of heterogeneity between total and SN fractions, suggesting local differential miRNAs processing (see central panels in Supplemental Figure 5B–D). Differential synaptic accumulation of miRNAs in their precursor (pre-miRNAs) and/or mature forms can be explained by the fact that the processing machinery for miRNA maturation has been recently identified in the synapse, and its function is modulated by neuronal activity (Lugli et al., 2005).



To explore whether the synaptic enrichment of selective miRNAs correlates with an increased probability of finding their mRNA targets at that location, we used the miRanda

algorithm (Betel et al., 2008; August 2010 release) to obtain a list of potential miRNAs targets. We filtered genes with known Gene Ontology (GO) tags, including categories of



cellular component (419), biological (628), and molecular function (597), and then compared this list against the rat genome as reference, using the FatGO tool (Al-Shahrour et al., 2004). As expected, enrichment of these genes changed slightly depending upon the tissue analyzed (Supplemental Figure 8A), and the number and type of mRNA-coding genes found were differentially distributed as per neuroanatomical region. We found that most predicted targets belong to genes associated with neuronal function, including proteins located at the post-synaptic level, others involved in processes like synaptic plasticity, learning and memory, and some mediators of short-term adaptive mechanisms (Supplemental Figure 8A–B). This finding suggests that most of the miRNAs found in our SN preparations likely help in the regulation of many specialized local mechanisms, either at the pre- or post-synaptic levels.

In summary, we found that each brain region explored displays a specific pattern of synaptic miRNAs content, distinct from that seen in the forebrain and even in their respective total fractions. Such selective distribution cannot be attributed to a specific sequence inside the miRNA, but may be explained by other mechanisms, such as the association of the miRNA to its mRNA target and subsequent selective transport of both to the synapse, among other possibilities.

### 2.3. Synaptic miRNA expression in kainic acid treated animals

Given the differential distribution of many miRNAs in all brain regions explored, and in particular the enrichment of some miRNAs in our SN preparations, we wanted to explore if such relative accumulation was constant or could be modulated by neuronal activity.

Since it is known that neuronal activity may alter the translational rate especially in dendrites (reviewed in Schratt, 2009; Steward and Reeves, 1988), we explored if neuronal stimulation might elicit changes in the abundance of synaptic miRNAs as well. To test this hypothesis we used systemic kainic acid (KA) to induce seizure activity in the brain of living animals for two hours (Fig. 4A) as model for sustained neuronal depolarization *in vivo*, especially in the hippocampus and cortex given the high abundance of high affinity KA ionotropic receptors. After treatment, total RNA prepared from total homogenate and SN fractions from Cx and Hp was used for NB and qPCR analysis. Based on the level of expression previously observed for several miRNAs, we selected six candidates with robust expression in SN from those two areas (miR-9, miR-125a-5p, miR-128, and miR-138), and two others that were significantly depleted (miR-145 and miR-

150) to assess the effect of exacerbated neuronal activity on the relative distribution of each miRNA.

The qPCR analysis demonstrated that seizure-induced animals showed no significant change in expression in both Cx and Hp (Fig. 4B), except for miR-9, which was down regulated nearly 50% and miR-145 which showed a small but significant reduction in Hp (Fig. 4E).

When analyzing the SCx fraction we observed an average 5 fold increment for all miRNAs tested, with the exception of miR-138, which remained unaltered after the treatment (Fig. 4C). Most surprisingly all miRNAs but miR-9 and miR-138, were reduced in SHp (Fig. 4F). In particular, miR-150 was reduced almost 5 fold when compared to control (saline) treatment (Fig. 4F).

Since most miRNAs explored were unaltered in the total (Cx and Hp) fractions (Figs. 4B–E). This result suggests a selective modulation of their relative concentrations at the synapse upon exacerbated neuronal activity *in vivo*. This observation was more evident when analyzing the SN/Total ratio for the miRNAs explored (Figs. 4D–G).

These findings were confirmed by NB analysis for miR-128 and miR-125a-5p, although changes in the mature sequence (~21 nt) showed different magnitudes (Supplemental Figure 9A–E). However, a close look at the precursors bands of miR-9, miR-125a-5p and miR-150 indicated that the relative abundance of each changed proportionally as well (Supplemental Figure 9B–J), suggesting that sustained electric depolarization *in vivo* might also affect pre-miRNA processing within the synapse.

We concluded that the short-term effect of KA treatment on miRNA expression in this model is highly selective and tissue-specific. Most importantly, it seems that this treatment predominantly induces changes in miRNAs selectively at the synapse, rather than altering their abundance in the rest of the neuron. Most interestingly, only a handful of miRNAs changed their local concentration, with others showing no change with KA treatment.

## 3. Discussion

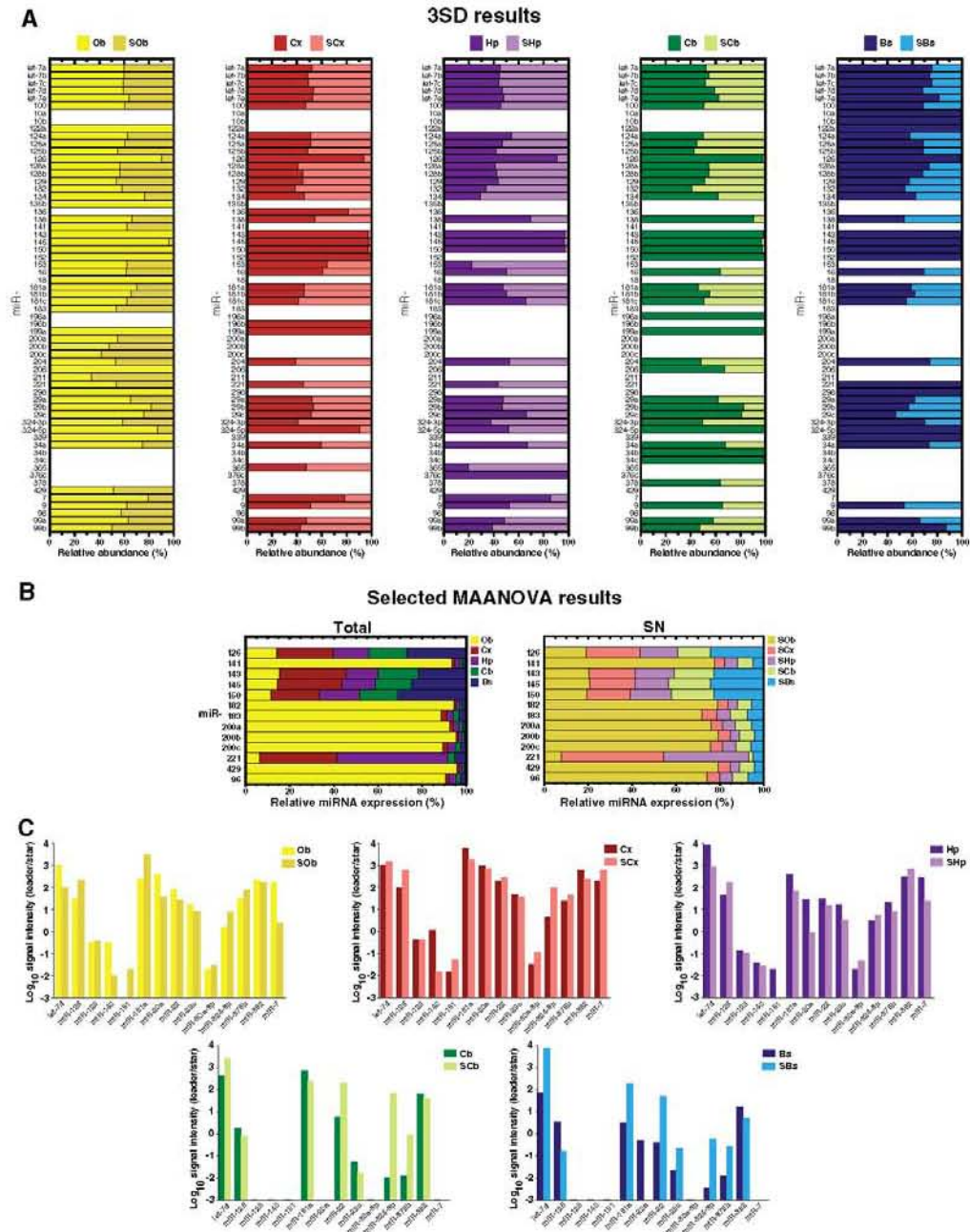
In the present study we carried out an extensive characterization of the miRNAs present in five regions of the mammalian brain. We attempted also to determine the relative concentration of such miRNAs between total and SN fractions for each of the regions explored. The method we utilized allowed us to enrich the SN fraction with post-synaptic densities (PSDs), as confirmed by the TEM analysis (Supplemental Figure 1B).

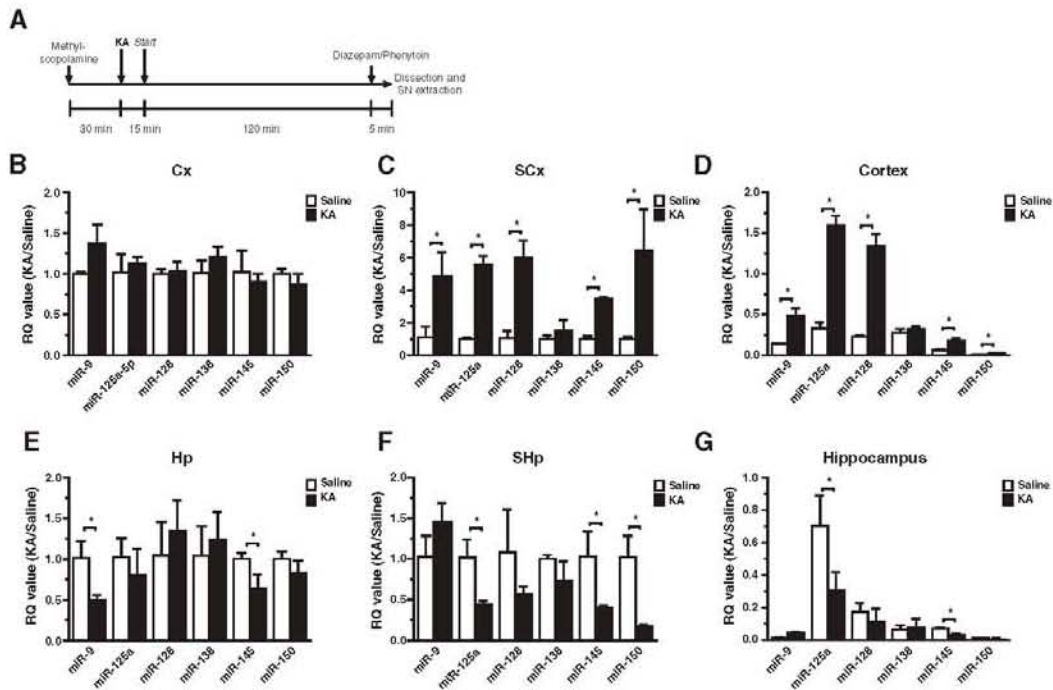
**Fig. 2 – Differential expression patterns of synaptoneurosomal microRNAs derived from five neuroanatomical regions of the brain. (A) Pie diagram illustrating the exclusively expressed and shared microRNAs in the five different areas of the brain explored. Areas are: Olfactory bulb (Ob), Cerebellum (Cb), Hippocampus (Hp), Cortex (Cx) and Brain stem (Bs). In all cases the capital S before the names indicate the respective synaptoneurosomal fraction. The Pearson's coefficients ( $R^2$ ) for the number of miRNAs expressed by fraction are indicated for each brain region. (B) Heatmap plotting of the 49 microRNAs selected by MAANOVA ( $P \leq 0.1$ ) 54 miRNAs with consistent expression across all samples from the different regions explored in the rat brain. MiRNAs were hierarchically clustered and plotted as a heatmap. (C) Plotting of the same miRNAs by relative abundance (SN/Total) separated by areas of the brain. Notice that some miRNAs are selective for the olfactory bulb (Ob, in yellow) such as miR-211 and 200c, while others are exclusive for the cerebellum (Cb, in green) such as miR-378 and 206.**



Nevertheless, we acknowledge that 100% pure SN fractions are extremely difficult to obtain, since several contaminants may co-sediment (cytosol from the cell-body, mitochondria,

or glia). However, the lack of glial markers (GFAP or MBP proteins; Supplemental Figure 1C–E), or the significant reduction (~85%) of nuclear- and soma-restricted mRNA and ncRNA





**Fig. 4 – KA treatment modifies the synaptoneurosomal expression of cortical and hippocampal miRNAs in vivo. (A)** Schematized protocol of KA treatment used for seizure induction. Cortical (Cx) and hippocampal (Hp) miRNA expression was assessed by qPCR on either (panels B–E) the total homogenate, or (panels C–F) the SN fractions. As input, 200 ng of total RNA from three animals from each group was used as template for reverse transcription. The SN/Total ratio of miRNA expression in Cx (D) and Hp (G) reflect variable abundances of the measured miRNAs. Significant differences were calculated by a two-tailed Student's t-test analysis for paired samples (asterisks;  $P \leq 0.01$ ).

markers (snoRNA U43, NeuN, ArhGEF5, ArhGEF11, Tub $\alpha$ 1, or Tub $\alpha$ 3; Supplemental Figure 2B–D), indicates that that we have a reasonably pure SN preparation from which conclusions about relative miRNAs distribution can be drawn. Moreover, expression of several miRNAs previously identified in mitochondria (Kren et al., 2009; Li et al., 2011) was very low in our preparations, as determined by the microarray data. Unlike previous reports (Schratt, 2009), we still detected a small contribution of U6 snoRNA in SN (Supplemental Figure 2B); however we believe that this does not necessarily reflect nuclear contamination, but rather it may support the

observation of spliceosomal activity in dendrites (Glanzer et al., 2005) or another function specific to this ncRNA, although this deserves further scrutiny.

As for the relative abundance of synaptic miRNAs it was interesting to find that many of them did not depict a significant enrichment in SN (>2-fold), in contrast to former observations (Lugli et al., 2008; Siegel et al., 2009). We believe that this does not necessarily correspond to suboptimal SN isolation but rather to actual properties of components more tightly associated to the post-synaptic densities, considering the abundance of several synaptic protein and mRNA markers,

**Fig. 3 – Relative expression and differential processing of miRNAs derived from distinct areas of the brain and their synaptoneurosomal fractions. (A)** Normalized expression of total homogenate SN fraction of 62 miRNAs (3SD results) arbitrarily selected by relevance with previously published data for comparison purposes. Data was computed taking as 100% the total sum of normalized fluorescence intensity mean for SN and total. (B) Normalized expression of miRNAs selected by MAANOVA analysis. Length of the bar is calibrated to 100% after summation of miRNA expression values observed by tissue sample. These miRNAs showed consistent expression across all tissues analyzed, for both SN and total fractions. (C) Differential processing of leader and star strands of miRNAs whose precursor gives rise to stable mature sequences (~21 nt), which have different abundances according to the tissue of origin. Bars represent the ratio leader/star of signal intensity observed in the microarray data in both fractions. All values were expressed in Log<sub>10</sub> scale.



like NMDAR1, PSD-95 and the ncRNA BC1, whose abundance was approximately 90% the one seen in the total fraction (see Supplemental Figures 2C–4B).

Furthermore, the relative abundance of sixteen miRNAs observed in our SN fractions are also comparable to those described in laser-excised dendrites of cultured hippocampal neurons or by ISH (Kye et al., 2007; Pena et al., 2009), supporting that these miRNAs also display a similar somato-dendritic expression in the adult rat brain as well.

The relative enrichment of miRNAs in our SN preparation, cannot be explained by simple diffusion from the soma, and may be the result of active transport. In this regard, some authors have proposed that somato-dendritic translocation of miRNAs may comprise several hypotheses, all-non mutually exclusive (Kosik, 2006; Schrott, 2009). Some include the co-transport of mature miRNAs along with their mRNA targets as part of neuronal granules cargo and the selective pre-miRNA translocation by attachment to tagged dendritic proteins that are actively translocated to the synaptic contacts vicinity (i.e. FMRP family).

In the present study we did not attempt to demonstrate a particular mechanism, but our data do not support the simple diffusion hypothesis as a main source for synaptic localization, given that several miRNAs with elevated expression values in the total fraction were not found among the most highly expressed miRNAs in the SN.

Our *in silico* analysis did not find any consensus sequence or signal that may explain synaptic enrichment of miRNAs (Supplemental Figure 7), thus suggesting that the mechanism may not involve a targeting sequence.

A feasible mechanism for synaptic translocation may involve association of the miRNAs to their mRNA targets, functioning as passive cargo of dendritically localized mRNAs. The latter idea might be supported by the finding that i) the sequence analysis of the most abundant miRNAs in SN lacked an obvious consensus signal that could describe a dendritic localization motif (Supplemental Figure 7), and ii) our analysis to identify putative mRNA targets shows that such possible targets produce proteins with functions tightly associated with synapse activity (Supplemental Figure 8), and in fact, many of them have already been found in isolated PSD-rich SN in the rodent brain (Suzuki et al., 2007).

One interesting aspect of current research is the question of whether miRNAs we detected in SN belong to the pre- or the post-synaptic compartments. It is now becomingly accepted that in the adult CNS axons may display protein synthesis activity, independently from the cell soma (Giuditta et al., 2008), which also appear to co-exist with RNAi activity, as documented in several systems, including the adult peripheral nerve endings (Murashov et al., 2007), and in the developing growth cones of cultured hippocampal neurons, where RISC proteins Ago2, FMRP, Gemin3 helicase and p100 nuclease had been identified as well (Hengst et al., 2006).

Even though the expression of miRNAs showed neuroanatomical specificity, as previously documented (Bak et al., 2008; Lugli et al., 2008; Olsen et al., 2009), we found that not all miRNAs obeyed the same distribution in their SN fractions. For instance, the hippocampus and cortex displayed more miRNAs with higher abundance in SN than any other region analyzed here (Fig. 2A), even more than the cerebellum, which has

significantly higher number of synapses per neuron than any other brain structure.

Interestingly, we found that several pre-miRNAs were highly enriched in the SN fraction as well, as it was the case for miR-9, miR-125a-5p and miR-150. Since recent studies have identified the presence of Dicer and RISC members at the synapse (Lugli et al., 2005, 2008), it is feasible that some local miRNA processing may take place. This hypothesis deserves future studies.

Summarizing, in the present work we demonstrated not only that mammalian miRNAs are synaptic constituents, but also that they have a differential distribution across the brain regions explored. Moreover, some of these miRNAs undergo local regulation of their abundance within the synapse, following exacerbated neuronal activity *in vivo*. These findings show for the first time local modulation of the concentration of selective miRNAs by *in vivo* epileptogenic activity, indicating that the relative miRNA abundance at the synapse may be dynamically modulated.

## 4. Experimental procedures

### 4.1. Animals

Three months-old adult male Long-Evans (LE) rats weighing ~200 g were anesthetized with isoflurane (5% v/v) and sacrificed by decapitation, following protocols for animal care approved by the Animal Care Committee from Rutgers University. Brains were washed in ice-cold, nuclease-free PBS, and dissected on ice with RNase Zap-treated tools (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX USA). On average, hippocampi and cortices from each hemisphere were obtained in less than six minutes per animal to minimize RNA degradation.

### 4.2. Synaptoneurosomes isolation

Pure synaptoneurosomal fractions were obtained by differential isopycnic centrifugation (modified from Carlin et al., 1980) through sucrose gradients. Approximately 1 g of tissue from three animals (either forebrain, olfactory bulb, cortex, hippocampus, cerebellum or brain stem) was placed in a motorized Teflon/glass homogenizer (0.25 mm clearance space) and samples were processed by giving twelve strokes at medium speed in ice-cold Solution A (0.32 M sucrose plus 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 U/mL RNase OUT (Invitrogen, Carlsbad, CA USA)), and 1% Halt proteinase inhibitor cocktail (Pierce-ThermoScientific, Waltham, MA USA). At this stage one aliquot was removed (named Total Fraction) for protein and RNA analysis. The homogenate was centrifuged twice for 10 min at 1400×g in a JA-17 rotor (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA USA) to separate cell nuclei and debris (fraction P1), and the supernatant (S1) was further centrifuged for 10 min at 13, 800×g. The resulting pellet was resuspended (S2) in 2 mL of Solution B (0.32 M sucrose plus 1 mM NaHCO<sub>3</sub>) and poured onto a buffered discontinuous sucrose gradient (from top to bottom, 0.32 M/0.85 M/1 M/1.2 M), containing 1 mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 7.2), and ultra-centrifuged at 82,500×g in a SW40-Ti rotor (Beckman). The interface band



between layers 1 M and 1.2 M (synaptoneurosomal fraction) was removed and adjusted to 3–4 mL with Solution B, then layered onto a 1 M sucrose cushion, and centrifuged again at  $82,500\times g$  for 1 h. Samples from the upper interfacial bands, namely myelin and microsomes, were analyzed for protein content as well. Pellets from this step were re-suspended in nuclease-free ice-cold PBS. All steps were carried out at 4 °C.

#### 4.3. RNA extraction and quantification

RNA from both total and synaptoneurosomal fractions were extracted using Trizol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's guidelines, except that at least 2/3 volumes of isopropanol and 10–15  $\mu\text{g}$  of linear acrylamide were used for precipitating RNA, and 80% ethanol was used for washing the resulting pellet. Resulting samples were re-suspended in nuclease-free water and quantified in a Nanodrop spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA USA). Quality of RNA was assessed by using a Bioanalyzer (Agilent Labs, Santa Clara, CA USA).

#### 4.4. Microarray labeling and hybridization

The multi-species NCode™ microarray platform chip v2.0 from Invitrogen, containing all miRNA probes released in miRBase v9.0, was used for this study. For the total brain (Ce) and its synaptoneurosomal fraction (SCe) experiment, 2  $\mu\text{g}$  of total RNA from three different animals was labeled either with Cy3 or Cy5 fluorophores with a FlashTag™ T4 RNA ligase-based method (Genisphere, Hatfield, PA USA). To compensate for dye labeling efficiency and sample bias, six chips were used. We applied loop design on two-channel arrays, dye-swapping biological replicates. For the brain regions array analysis, both total and synaptoneurosomal RNA samples from olfactory bulb (OB), cortex (Cx), hippocampus (Hp), cerebellum (Cb), and brain stem (BS) were taken from three animals, and samples from the same tissue were pooled together. For this analysis we applied the same design as above, using ten chips.

#### 4.5. Microarray statistical analysis

The Bioconductor limma and MAANOVA packages from R/Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) was used for linear fitting and statistical comparisons, respectively. Data were analyzed by bootstrapping F-statistics (Altman and Hua, 2006; Kerr and Churchill, 2001a, 2001b), re-fit with or without VG effects and new F-values were calculated and compared to original calculation. P-values represent the probability of obtaining higher F-statistics values after comparing data against 10,000 random permutations. Results were adjusted for multiple testing using the Benjamini–Hochberg correction. Significant miRNAs were selected on a P-value threshold of  $P < 0.01$  for F1 tests, and  $P < 0.05$  for F3 and F5 tests for Ce vs. SCe study and  $P < 0.1$  for F1 tests, and  $P < 0.05$  for F3 and F5 tests for multiple brain regions analysis.

#### 4.6. mRNA and miRNA quantitative real-time PCR (qPCR)

For mRNA expression assessment we designed primers using Primer Express™ software (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA.) to obtain 100-mer amplicons for each gene. Reverse transcription was carried out by using random hexamer primers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). For qPCR we used SyBR Green™ buffer (Applied Biosystems). For miRNA expression measurements, we used either Taqman™ miRNA qPCR assays (Applied Biosystems) or NCode™ miRNA first strand cDNA synthesis and qPCR kits (Invitrogen) for miRNA reverse transcription and PCR amplification, following manufacturer's guidelines. All oligonucleotides used with the method from Invitrogen were custom-made and their sequence corresponded to the exact mature miRNA sense sequence. All assays were quantified in either an ABI 7500 Fast model or in an ABI 7900HT real-time PCR thermal cycler (Applied Biosystems). Data were analyzed with SDS v2.3 and RQ manager v1.2 software (Applied Biosystems). Averaged Delta Cycle threshold values ( $\Delta\text{Ct}$ ) from three to six animals were independently compared between paired samples (Total vs. SN), and differences were analyzed by using the two-tailed Student's t-test for statistical validation. We computed the percentage of SN/Total value (PS/T) as the ratio  $[(2^{\Delta\text{Ct of SN fraction}}/2^{\Delta\text{Ct of Total fraction}})(100)]$  to express of the amount of template retained in the SN fraction after isolation.

#### 4.7. Seizure induction by kainic acid (KA) treatment

Male Long-Evans rats with the same age and weight as described before were pre-treated with methyl-scopolamine (1 mg/kg, s.c.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to inhibit peripheral convulsions, according to the animal care guidelines of the NIH and the local ethics committee. After 30 min, animals were injected with KA (10 mg/kg, i.p.) or saline as a control. No noxious generalized myotonic-clonic events were observed after treatment with KA. After two hours, 10 mg/kg diazepam (Henry Schein, Melville, NY) and phenytoin (50 mg/kg, i.p., Sigma) were injected to stop seizure activity, and animals were immediately sacrificed by decapitation.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.brainres.2011.12.001.

#### Authors' contributions

IPC carried out all experiments, except those on the microarrays, performed all subsequent analyses, and prepared the manuscript draft and the figures contained therein. LAG performed the microarray experimental design, data acquisition and post hoc statistical analyses, and prepared some related figures. MRS carried out RNA labeling and hybridization on microarray experiments. MRB and JD made important observations on the manuscript draft. AA participated in the GO-enrichment analysis. WJF and MLV provided materials and expertise with the KA model. RPH made critical contributions to the project, critical reviews to the manuscript, provided materials and expertise with the qPCR and microarray platforms and on the public release of experimental results on the NIH GEO database. LV provided materials, participated in the design, discussion and general coordination of the experiments and wrote the manuscript in its final form. All authors read and approved the final manuscript.



## Acknowledgments

We thank all members of the Hart lab for helpful discussions, technical assistance, and comments to the manuscript. Also, we thank Dr. Bonnie Firestein for help on SN preparations, Dr. Valentin Starovoytov for support on TEM studies, and the staff of the W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience at Rutgers University, NJ, USA. Support was provided by the New Jersey Stem Cell Commission, and Life Technologies Corp., USA. From the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), we thank Dr. Luis Padilla and Dr. Enrique Reynaud for valuable observations to the project. Also to Dr. Maria Sitges and Dr. Clorinda Arias for supplying pharmaceuticals, Dr. Rodolfo Paredes for TEM assistance, Alicia Sampieri, M.S. for technical support, and the staff of the animal care facility at the Instituto de Fisiología Celular (IFC). This project was supported in part by the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB, UNAM), Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) to LV. Authors declare no competing interests.

## Additional methods

### Transmission electron microscopy (TEM)

Synaptoneurosomal pellets were resuspended in PBS and fixed for 2 h in Karnovsky's Fixative (combination of low concentration of both formaldehyde and glutaraldehyde in 0.1 M Millonig's Phosphate buffer pH 7.3). Post-fixation was carried out in 1% Osmium Tetroxide buffer for 1 h, followed by dehydration in graded ethanol series and embedded in Epon-Araldite cocktail. Sections were done using a diamond knife by LKB-2088 Ultramicrotome (LKB – Produkter AB, S-161 25 Bromma 1, Sweden). Thin sections were stained with 5% (w/v) uranyl acetate saturated solution in 50% ethanol for 15 min at room temperature, and then with 0.5% lead citrate solution in CO<sub>2</sub>-free double-distilled water (Reynold's Lead Citrate Stain) for 2 min. Observation and micrographs were made with a JEM-100CXII Electron Microscope. (JEOL LTD. Tokyo, Japan).

### Western blot

Samples from all fractionation steps were collected and mixed with ice-cold lysis buffer (pH 7.5) containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% SDS, and 1% Halt protease inhibitor cocktail (ThermoScientific). Protein concentration was determined by the BCA method (Pierce-ThermoScientific). 10–25 mg of protein were used and analyzed by PAGE (4:12%) and proteins transferred to a PDVF membrane. All membranes were blocked with 1X PBS, containing 1% (v/v) Tween-20, and 10% non-fat milk for at least 2 h at 4 °C. Monoclonal antibodies used in this study were mouse anti-SV2 (clone SP2/0; 1:1000) developed by Dr. Kathleen M. Buckley, Harvard Medical School, MA; rat anti-FMRP (clone 7G1-1; 1:500) developed by Dr. Stephen T. Warren, Emory University School of Medicine, GA; mouse anti-Tubulin- $\alpha$ 1 (clone AA4.3; 1:1000) developed by Dr. Charles Walsh, University of Pittsburgh, PA; mouse anti-Synaptotagmin

(clone asv48; 1:500) developed by Dr. Louis Reichardt, UCSF, CA, all from the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, IA; rabbit anti-TuJ1/ tubulin- $\beta$ 3 (clone TUJ1 1:15-79;1:1000) was obtained from Covance Inc.; mouse anti-Ago1-4 (clone 4F9; 1:1000) was from Santa Cruz Biotechnology, Inc., (Santa Cruz, CA USA); mouse anti- $\beta$ -actin (clone mAbcam 8226; 1:10,000) was from Abcam (Cambridge, MA USA.); mouse anti-NeuN (1:500) was from Chemicon (Millipore, Billerica, MA USA.); mouse anti-PSD-95 (clone 7E3-1B8; 1:2000) was from Affinity Bioreagents Inc. (Rockford, IL USA.); and polyclonal antibodies were rabbit anti-NMDAR1 (1:1000) was from Chemicon (cat. # ab5046p, Millipore); and rabbit anti-Ago2 (1:1000) was from Upstate (cat. # 04-642, Millipore). All primary antibodies were diluted in 1X PBS (containing 1% (v/v) of Tween-20 plus 0.02% of NaN<sub>3</sub>), and incubated for 8–16 h at 4 °C. Bands were revealed by ECL Plus chemiluminescent detection kit (Amersham-GE) using either anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies coupled to HRP (Amersham-GE, Piscataway, NJ, USA). Images were acquired on film (Hyperfilm ECL Amersham-GE), or by CCD camera (Gel Logic 2200 Image Station, Kodak Inc.).

### Northern blot

Total RNA from all samples was column-purified and size-fractionated (<200 nt) by partial precipitation according to guidelines of the miRvana miRNA isolation kit (Ambion-Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Denatured 0.5 to 1  $\mu$ g of purified RNA (92 °C, 2 min) was resolved by PAGE (15%; 19:1; 8 M Urea), samples were then transferred onto a positively charged nylon membrane (Amersham-GE, Buckinghamshire, England) on a semi-dry apparatus (Biorad, Hercules, CA, USA), UV-crosslinked, and pre-hybridized with 6X SSC, 10X Denhardt's buffer and 0.2% SDS (pH 7.2). Approximately 25–50 pmol of DNA (Sigma-Aldrich) or LNA probes complementary to the mature miRNA sequences (Exiqon, Vedbaek, Denmark) were labeled with T4 polynucleotide kinase (Invitrogen), using <sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATP as donor (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA.), followed by sepharose G-25 or G-50 column purification (Amersham-GE Life Sciences). Hybridization was carried out for at least 8 h at 37–45 °C (in average 12 °C below the T<sub>m</sub> of DNA probes, or T<sub>m</sub> minus 25 °C for LNA probes). All membranes were washed twice with 6X SSC/0.2% SDS, and exposed (3 to 8 h) to an intensifying Phosphorimager screen and scanned on a Typhoon device (Amersham-GE Life Sciences). Most membranes were re-blotted up to five times following stripping (2X in 1% SDS at 95 °C for 30 min) with no significant loss of signal between blots. Densitometric analysis was carried out with NIH's ImageJ software (Rasband, W.S., 1997–2009).

## REFERENCES

- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Dopazo, J., 2004. FatGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20, 578–580.
- Altman, N.S., Hua, J., 2006. Extending the loop design for two-channel microarray experiments. *Genet. Res.* 88, 153–163.
- 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., Slihtaroglu, 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.
- Bassell, G.J., Warren, S.T., 2008. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* 60, 201–214.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., Sander, C., 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36, D149–D153.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martini, U., Gross, E.I., Filipowicz, W., 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124.
- Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S., Siekevitz, P., 1980. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.* 86, 831–845.
- Chandrasekar, V., Dreyer, J.L., 2011. Regulation of MiR-124, Let-7d, and MiR-181a in the accumbens affects the expression, extinction, and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology* 36, 1149–1164.
- 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.
- Farh, K.K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B.P., Johnston, W.K., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817–1821.
- 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.
- Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S.W., Kim, T.K., Greenberg, M.E., Schratt, 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.
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., Schier, A.F., 2005. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833–838.
- Giuditta, A., Chun, J.T., Eymann, M., Cefalillo, C., Bruno, A.P., Crispino, M., 2008. Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit. *Physiol. Rev.* 88, 515–555.
- Glanzer, J., Miyashiro, K.Y., Sul, J.Y., Barrett, L., Belt, B., Haydon, P., Eberwine, J., 2005. RNA splicing capability of live neuronal dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16859–16864.
- Griffiths-Jones, S., 2006. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol. Biol.* 342, 129–138.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–D144.
- 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.
- Jin, P., Zarnescu, D.G., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K., Warren, S.T., 2004. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 7, 113–117.
- Kerr, M.K., Churchill, G.A., 2001a. Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* 2, 183–201.
- Kerr, M.K., Churchill, G.A., 2001b. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet. Res.* 77, 123–128.
- 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.
- Kosik, K.S., 2006. The neuronal microRNA system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 911–920.
- Kren, B.T., Wong, P.Y., Sarver, A., Zhang, X., Zeng, Y., Steer, C.J., 2009. MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol.* 6, 65–72.
- 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.
- Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isacson, O., Kosik, K.S., 2006. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24, 857–864.
- 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.
- 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, G., Socci, N.D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, 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.
- Li, N., Bates, D.J., An, J., Terry, D.A., Wang, E., 2011. Up-regulation of key microRNAs, and inverse down-regulation of their predicted oxidative phosphorylation target genes, during aging in mouse brain. *Neurobiol. Aging* 32, 944–955.
- 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.L., Larson, J., Smalheiser, N.R., 2008. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J. Neurochem.* 106, 650–661.
- Martin, K.G., Zukin, R.S., 2006. RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J. Neurosci.* 26, 7131–7134.
- 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.
- 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.
- Park, C.S., Tang, S.J., 2009. Regulation of microRNA expression by induction of bidirectional synaptic plasticity. *J. Mol. Neurosci.* 38, 50–56.
- Pena, J.T., Sohn-Lee, C., Rouhanifard, S.H., Ludwig, J., Hafner, M., Mihailovic, A., Lim, C., Holloch, D., Berminger, P., Zavolan, M., Tuschl, T., 2009. miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC-fixed tissues. *Nat. Methods* 6, 139–141.
- 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.
- Schratt, G., 2009. microRNAs at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 842–849.

- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., 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.
- Siegel, G., Obemosterer, 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.
- Skup, M., 2008. Dendrites as separate compartment — local protein synthesis. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 68, 305–321.
- Steward, O., Reeves, T.M., 1988. Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *J. Neurosci.* 8, 176–184.
- Sutton, M.A., Schuman, E.M., 2006. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 127, 49–58.
- Suzuki, T., Tian, Q.B., Kuromitsu, J., Kawai, T., Endo, S., 2007. Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci. Res.* 57, 61–85.
- Vincent, P., Mulle, C., 2009. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158, 309–323.
- 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.
- Wibbrand, 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.
- Wu, G.W., Zeng, F., Eberwine, J., 2007. mRNA transport to and translation in neuronal dendrites. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 59–62.

# Bibliografía

1. Pichardo-Casas, I. et al. Expression profiling of synaptic microRNAs from the adult rat brain identifies regional differences and seizure-induced dynamic modulation. *Brain Res* **1436**, 20-33 (2012).
2. Schrott, G.M. et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**, 283-9 (2006).
3. Jin, P. et al. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* **7**, 113-7 (2004).
4. Jin, P., Alisch, R.S. & Warren, S.T. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* **6**, 1048-53 (2004).
5. Garber, K., Smith, K.T., Reines, D. & Warren, S.T. Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 270-5 (2006).
6. Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B. & Moine, H. The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell* **95**, 221-8 (2003).
7. Murashov, A.K. et al. RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *FASEB J* **21**, 656-70 (2007).
8. Lugli, G., Larson, J., Martone, M.E., Jones, Y. & Smalheiser, N.R. 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 (2005).
9. Fischbach, S.J. & Carew, T.J. MicroRNAs in memory processing. *Neuron* **63**, 714-6 (2009).
10. Ashraf, S.I. & Kunes, S. A trace of silence: memory and microRNA at the synapse. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 535-9 (2006).
11. Kosik, K.S. MicroRNAs tell an evo-devo story. *Nat Rev Neurosci* **10**, 754-9 (2009).
12. Meza-Sosa, K.F., Valle-Garcia, D., Pedraza-Alva, G. & Perez-Martinez, L. Role of microRNAs in central nervous system development and pathology. *J Neurosci Res* **90**, 1-12 (2012).
13. Barbato, C., Ruberti, F. & Cogoni, C. Searching for MIND: microRNAs in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* **2009**, 871313 (2009).
14. Lugli, G., Torvik, V.I., Larson, J. & Smalheiser, N.R. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J Neurochem* **106**, 650-61 (2008).
15. Siegel, G. et al. A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol* **11**, 705-16 (2009).
16. Siegel, G., Saba, R. & Schrott, G. microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Curr Opin Genet Dev* **21**, 491-7 (2011).
17. Kosik, K.S. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 911-20 (2006).
18. Landgraf, P. et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401-14 (2007).
19. Lagos-Quintana, M. et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* **12**, 735-9 (2002).
20. Kim, J. et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 360-5 (2004).
21. Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A. & Dreyfuss, G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* **9**, 180-6 (2003).
22. Miska, E.A. et al. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* **5**, R68 (2004).
23. Sempere, L.F. et al. 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 (2004).
24. Bak, M. et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* **14**, 432-44 (2008).
25. Podolska, A. et al. MicroRNA expression profiling of the porcine developing brain. *PLoS One* **6**, e14494 (2011).
26. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. Principles of neural science (McGraw-Hill, Health Professions Division, New York, 2000).
27. Brown, T.H., Kairiss, E.W. & Keenan, C.L. Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. *Annu Rev Neurosci* **13**, 475-511 (1990).
28. Berlocchi, G. & Buchtel, H.A. Neuronal plasticity: historical roots and evolution of meaning. *Exp Brain Res* **192**, 307-19 (2009).
29. Seung, H.S. Neuroscience: Towards functional connectomics. *Nature* **471**, 170-2 (2011).
30. Nicholls, J.G. From neuron to brain (Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2012).
31. Purves, D. & Williams, S.M. Neuroscience (Sinauer Associates, Sunderland, Mass., 2001).



32. Ryan, T.J. & Grant, S.G. The origin and evolution of synapses. *Nat Rev Neurosci* **10**, 701-12 (2009).
33. Wu, C.W., Zeng, F. & Eberwine, J. mRNA transport to and translation in neuronal dendrites. *Anal Bioanal Chem* **387**, 59-62 (2007).
34. Stuart, G., Spruston, N. & Häusser, M. *Dendrites* (Oxford University Press, Oxford ; New York, 1999).
35. Sakamoto, K., Karelina, K. & Obrietan, K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* **116**, 1-9 (2011).
36. Bermudez-Rattoni, F. Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat Rev Neurosci* **5**, 209-17 (2004).
37. Steward, O. & Schuman, E.M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24**, 299-325 (2001).
38. Costa-Mattioli, M., Sonenberg, N. & Richter, J.D. Translational regulatory mechanisms in synaptic plasticity and memory storage. *Prog Mol Biol Transl Sci* **90**, 293-311 (2009).
39. Palay, S.L. Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 193-202 (1956).
40. Stuart, G., Spruston, N. & Häusser, M. *Dendrites* (Oxford University Press, Oxford ; New York, 2008).
41. Steward, O. & Fass, B. Polyribosomes associated with dendritic spines in the denervated dentate gyrus: evidence for local regulation of protein synthesis during reinnervation. *Prog Brain Res* **58**, 131-6 (1983).
42. Torre, E.R. & Steward, O. Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J Neurosci* **12**, 762-72 (1992).
43. Steward, O., Falk, P.M. & Torre, E.R. Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes. *J Neurocytol* **25**, 717-34 (1996).
44. Job, C. & Eberwine, J. Identification of sites for exponential translation in living dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13037-42 (2001).
45. Job, C. & Eberwine, J. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat Rev Neurosci* **2**, 889-98 (2001).
46. Chicurel, M.E., Terrian, D.M. & Potter, H. mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines. *J Neurosci* **13**, 4054-63 (1993).
47. Tian, Q.B., Nakayama, K., Okano, A. & Suzuki, T. Identification of mRNAs localizing in the postsynaptic region. *Brain Res Mol Brain Res* **72**, 147-57 (1999).
48. Kindler, S. & Kreienkamp, H.J. Dendritic mRNA targeting and translation. *Adv Exp Med Biol* **970**, 285-305 (2012).
49. Sinnamon, J.R. & Czaplinski, K. mRNA trafficking and local translation: the Yin and Yang of regulating mRNA localization in neurons. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**, 663-70 (2011).
50. Cajigas, I.J. et al. The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* **74**, 453-66 (2012).
51. Suzuki, T., Tian, Q.B., Kuromitsu, J., Kawai, T. & Endo, S. Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res* **57**, 61-85 (2007).
52. Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T. & Tohyama, M. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* **3**, 1079-84 (2000).
53. Blichenberg, A. et al. Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Neurosci* **13**, 1881-8 (2001).
54. Khandjian, E.W. et al. Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13357-62 (2004).
55. Davidovic, L. et al. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet* **16**, 3047-58 (2007).
56. Eom, T., Antar, L.N., Singer, R.H. & Bassell, G.J. Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J Neurosci* **23**, 10433-44 (2003).
57. Rehbein, M., Kindler, S., Horke, S. & Richter, D. Two trans-acting rat-brain proteins, MARTA1 and MARTA2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *Brain Res Mol Brain Res* **79**, 192-201 (2000).
58. Tang, S.J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N. & Schuman, E. A role for a rat homolog of stau68 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**, 463-75 (2001).
59. Zalfa, F., Achsel, T. & Bagni, C. mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 265-9 (2006).
60. Batish, M., van den Bogaard, P., Kramer, F.R. & Tyagi, S. Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 4645-50 (2012).
61. Hirokawa, N. mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* **26**, 7139-42 (2006).
62. Muddashetty, R.S., Kelic, S., Gross, C., Xu, M. & Bassell, G.J. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* **27**, 5338-48 (2007).
63. Bramham, C.R. Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 524-31 (2008).

64. Bramham, C.R., Worley, P.F., Moore, M.J. & Guzowski, J.F. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* **28**, 11760-7 (2008).
65. Jeong, J.H. et al. The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem* **102**, 2073-84 (2007).
66. Qureshi, I.A. & Mehler, M.F. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* **13**, 528-41 (2012).
67. Jacquier, A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Rev Genet* **10**, 833-44 (2009).
68. Louro, R., Smirnova, A.S. & Verjovski-Almeida, S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* **93**, 291-8 (2009).
69. Mattick, J.S. & Makunin, I.V. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 1**, R17-29 (2006).
70. Gerstein, M.B. et al. What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. *Genome Res* **17**, 669-81 (2007).
71. Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* **10**, 94-108 (2009).
72. Lee, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**, 4051-60 (2004).
73. Kim, Y.K. & Kim, V.N. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* **26**, 775-83 (2007).
74. Baskerville, S. & Bartel, D.P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* **11**, 241-7 (2005).
75. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-54 (1993).
76. Ambros, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* **107**, 823-6 (2001).
77. Lee, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-9 (2003).
78. Hutvagner, G. & Zamore, P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-60 (2002).
79. Meister, G. et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**, 185-97 (2004).
80. Liu, J. et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-41 (2004).
81. Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. & Jewell, D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* **13**, 807-18 (2003).
82. Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-20 (2005).
83. Du, T. & Zamore, P.D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* **132**, 4645-52 (2005).
84. Schwarz, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).
85. Cloonan, N. et al. The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol* **9**, R127 (2008).
86. Cloonan, N. et al. MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol* **12**, R126 (2011).
87. Peng, Z. et al. Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. *Nat Biotechnol* **30**, 253-60 (2012).
88. Bass, B.L. How does RNA editing affect dsRNA-mediated gene silencing? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 285-92 (2006).
89. Heo, I. et al. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**, 696-708 (2009).
90. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-33 (2009).
91. Fiore, R., Siegel, G. & Schratt, G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 471-8 (2008).
92. Fiore, R., Khudayberdiev, S., Saba, R. & Schratt, G. MicroRNA function in the nervous system. *Prog Mol Biol Transl Sci* **102**, 47-100 (2011).
93. Farh, K.K. et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* **310**, 1817-21 (2005).
94. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. & Cohen, S.M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**, e85 (2005).
95. Doench, J.G. & Sharp, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**, 504-11 (2004).
96. Wang, B., Doench, J.G. & Novina, C.D. Analysis of microRNA effector functions in vitro. *Methods* **43**, 91-104 (2007).
97. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**, 597-610 (2010).
98. Fabian, M.R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* **79**, 351-79 (2010).



99. Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N. & Filipowicz, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* **17**, 118-26 (2007).
100. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102-14 (2008).
101. Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-55 (2009).
102. Cai, X., Hagedorn, C.H. & Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-66 (2004).
103. Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E.C. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* **28**, 328-36 (2007).
104. Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. & Lai, E.C. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89-100 (2007).
105. Ruby, J.G., Jan, C.H. & Bartel, D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83-6 (2007).
106. Shirdel, E.A., Xie, W., Mak, T.W. & Jurisica, I. NAViGaTing the microme--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One* **6**, e17429 (2011).
107. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. & Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**, 4663-70 (2002).
108. Han, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**, 3016-27 (2004).
109. Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. & Hannon, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-5 (2004).
110. Gregory, R.I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-40 (2004).
111. Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* **14**, 2162-7 (2004).
112. Liang, X.H. & Crooke, S.T. Depletion of key protein components of the RISC pathway impairs pre-ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* **39**, 4875-89 (2011).
113. Pickering, B.F., Yu, D. & Van Dyke, M.W. Nucleolin protein interacts with microprocessor complex to affect biogenesis of microRNAs 15a and 16. *J Biol Chem* **286**, 44095-103 (2011).
114. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-6 (2003).
115. Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185-91 (2004).
116. Zeng, Y. & Cullen, B.R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* **32**, 4776-85 (2004).
117. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-8 (2004).
118. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6 (2001).
119. Ketting, R.F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**, 2654-9 (2001).
120. Hutvagner, G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-8 (2001).
121. Forstemann, K. et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* **3**, e236 (2005).
122. Chendrimada, T.P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-4 (2005).
123. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-16 (2003).
124. Elkayam, E. et al. The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* **150**, 100-10 (2012).
125. Schirle, N.T. & MacRae, I.J. The crystal structure of human Argonaute2. *Science* **336**, 1037-40 (2012).
126. Song, J.J. et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* **10**, 1026-32 (2003).
127. Su, H., Trombly, M.I., Chen, J. & Wang, X. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev* **23**, 304-17 (2009).
128. Hafner, M. et al. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129-41 (2010).
129. Elbashir, S.M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
130. Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001).
131. Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* **20**, 6877-88 (2001).
132. Wang, Y. et al. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**, 754-61 (2009).

133. Liu, J. et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* **7**, 1261-6 (2005).
134. Kedersha, N. & Anderson, P. Regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Prog Mol Biol Transl Sci* **90**, 155-85 (2009).
135. Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J. & Sharp, P.A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* **21**, 533-42 (2006).
136. Chendrimada, T.P. et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**, 823-8 (2007).
137. Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. & Preiss, T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16961-6 (2005).
138. Beilharz, T.H., Humphreys, D.T. & Preiss, T. miRNA Effects on mRNA closed-loop formation during translation initiation. *Prog Mol Subcell Biol* **50**, 99-112 (2010).
139. Ding, X.C. & Grosshans, H. Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* **28**, 213-22 (2009).
140. Pillai, R.S., Artus, C.G. & Filipowicz, W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* **10**, 1518-25 (2004).
141. Olsen, P.H. & Ambros, V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**, 671-80 (1999).
142. Ambros, V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* **113**, 673-6 (2003).
143. Lim, L.P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769-73 (2005).
144. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. & Bartel, D.P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-40 (2010).
145. Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I. & Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111-24 (2006).
146. Yekta, S., Shih, I.H. & Bartel, D.P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594-6 (2004).
147. Davis, T.H. et al. Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci* **28**, 4322-30 (2008).
148. Giraldez, A.J. et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* **308**, 833-8 (2005).
149. Gao, F.B. Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. *Neural Dev* **5**, 25 (2010).
150. Hu, H.Y. et al. MicroRNA expression and regulation in human, chimpanzee, and macaque brains. *PLoS Genet* **7**, e1002327 (2011).
151. Somel, M. et al. MicroRNA-driven developmental remodeling in the brain distinguishes humans from other primates. *PLoS Biol* **9**, e1001214 (2011).
152. Smibert, P. et al. A *Drosophila* genetic screen yields allelic series of core microRNA biogenesis factors and reveals post-developmental roles for microRNAs. *RNA* **17**, 1997-2010 (2011).
153. Konopka, W. et al. MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci* **30**, 14835-42 (2010).
154. Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. & Hammond, S.M. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16**, 2491-6 (2002).
155. Ishizuka, A., Siomi, M.C. & Siomi, H. A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**, 2497-508 (2002).
156. De Diego Otero, Y. et al. Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **22**, 8332-41 (2002).
157. Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. & Siomi, M.C. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* **18**, 1655-66 (2004).
158. Barbee, S.A. et al. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**, 997-1009 (2006).
159. Qurashi, A., Chang, S. & Peng, J. Role of microRNA pathway in mental retardation. *ScientificWorldJournal* **7**, 146-54 (2007).
160. Miyashiro, K.Y. et al. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *Fmr1* null mice. *Neuron* **37**, 417-31 (2003).
161. Cheever, A. & Ceman, S. Translation regulation of mRNAs by the fragile X family of proteins through the microRNA pathway. *RNA Biol* **6**, 175-8 (2009).
162. Cheever, A., Blackwell, E. & Ceman, S. Fragile X protein family member FXR1P is regulated by microRNAs. *RNA* **16**, 1530-9 (2010).
163. Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M. & Kunes, S. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* **124**, 191-205 (2006).
164. McCann, C. et al. The Ataxin-2 protein is required for microRNA function and synapse-specific long-term olfactory habituation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E655-62 (2011).
165. Banerjee, S., Neveu, P. & Kosik, K.S. A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. *Neuron* **64**, 871-84 (2009).
166. Jarome, T.J., Werner, C.T., Kwapis, J.L. & Helmstetter, F.J. Activity dependent protein degradation is critical for the formation

- and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One* **6**, e24349 (2011).
167. Meister, G. et al. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* **15**, 2149-55 (2005).
168. Park, C.S. & Tang, S.J. Regulation of microRNA expression by induction of bidirectional synaptic plasticity. *J Mol Neurosci* **38**, 50-6 (2009).
169. Wibbrand, K. et al. 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**, 636-45 (2010).
170. Wibbrand, K. et al. MicroRNA regulation of the synaptic plasticity-related gene Arc. *PLoS One* **7**, e41688 (2012).
171. Rajasethupathy, P. et al. Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* **63**, 803-17 (2009).
172. Rajasethupathy, P. et al. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* **149**, 693-707 (2012).
173. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. & Tuschl, T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* **9**, 175-9 (2003).
174. Nelson, P.T. et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* **1**, 155-61 (2004).
175. Herzer, S., Silahatoglu, A. & Meister, B. Locked Nucleic Acid-Based In Situ Hybridization Reveals miR-7a as a Hypothalamus-Enriched MicroRNA with a Distinct Expression Pattern. *J Neuroendocrinol* (2012).
176. Kye, M.J. et al. Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA* **13**, 1224-34 (2007).
177. Lippi, G. et al. Targeting of the Arpc3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *J Cell Biol* **194**, 889-904 (2011).
178. Saba, R. et al. Dopamine-regulated microRNA MiR-181a controls GluA2 surface expression in hippocampal neurons. *Mol Cell Biol* **32**, 619-32 (2012).
179. Vo, N. et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16426-31 (2005).
180. Wayman, G.A. et al. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9093-8 (2008).
181. Hengst, U., Cox, L.J., Macosko, E.Z. & Jaffrey, S.R. Functional and selective RNA interference in developing axons and growth cones. *J Neurosci* **26**, 5727-32 (2006).
182. Cougot, N. et al. Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci* **28**, 13793-804 (2008).
183. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-4 (2007).
184. Vasudevan, S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 311-30 (2012).
185. Carlin, R.K., Grab, D.J., Cohen, R.S. & Siekevitz, P. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* **86**, 831-45 (1980).
186. Villasana, L.E., Klann, E. & Tejada-Simon, M.V. Rapid isolation of synaptoneuroosomes and postsynaptic densities from adult mouse hippocampus. *J Neurosci Methods* **158**, 30-6 (2006).
187. Cikaluk, D.E. et al. GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell* **10**, 3357-72 (1999).
188. Miura, M. & Kameda, Y. Neuronal properties in cultured ultimobranchial C cells of chick embryos: process outgrowth and expression of TuJ1 and enkephalin. *Brain Res* **905**, 1-11 (2001).
189. Olink-Coux, M. & Hollenbeck, P.J. Localization and active transport of mRNA in axons of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci* **16**, 1346-58 (1996).
190. Sung, Y.J., Weiler, I.J., Greenough, W.T. & Denman, R.B. Selectively enriched mRNAs in rat synaptoneuroosomes. *Brain Res Mol Brain Res* **126**, 81-7 (2004).
191. Crispino, M. et al. Messenger RNAs in synaptosomal fractions from rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **97**, 171-6 (2001).
192. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-8 (2001).
193. Mourelatos, Z. et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**, 720-8 (2002).
194. Tiedge, H., Fremeau, R.T., Jr., Weinstock, P.H., Arancio, O. & Brosius, J. Dendritic location of neural BC1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2093-7 (1991).
195. Loscher, W., Vetter, M., Muller, F., Bohme, G. & Stoltenburg-Didinger, G. Development of a synaptosomal model to determine drug-induced in vivo changes in GABA-levels of nerve endings in 11 brain regions of the rat. *Neurochem Int* **6**, 441-51 (1984).
196. Antar, L.N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R.C. & Bassell, G.J. Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol Cell Neurosci* **32**, 37-48 (2006).
197. Schratt, G.M., Nigh, E.A., Chen, W.G., Hu, L. & Greenberg, M.E. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci* **24**, 7366-77 (2004).
198. Cao, X., Pfaff, S.L. & Gage, F.H. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev* **21**, 531-6 (2007).

199. Akerblom, M. et al. MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *J Neurosci* **32**, 8879-89 (2012).
200. Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K. & Kosik, K.S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* **9**, 1274-81 (2003).
201. Yu, J.Y., Chung, K.H., Deo, M., Thompson, R.C. & Turner, D.L. MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp Cell Res* **314**, 2618-33 (2008).
202. Glanzer, J. et al. RNA splicing capability of live neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16859-64 (2005).
203. Megraw, M., Sethupathy, P., Corda, B. & Hatzigeorgiou, A.G. miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* **35**, D149-55 (2007).
204. Kerr, M.K. & Churchill, G.A. Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* **2**, 183-201 (2001).
205. Kerr, M.K. & Churchill, G.A. Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet Res* **77**, 123-8 (2001).
206. Kears, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647-9 (2012).
207. Larkin, M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-8 (2007).
208. Griffiths-Jones, S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* **342**, 129-38 (2006).
209. Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A.J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* **34**, D140-4 (2006).
210. Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. & Enright, A.J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**, D154-8 (2008).
211. Al-Shahrour, F. et al. Fatigo+: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. *Nucleic Acids Res* **35**, W91-6 (2007).
212. Li, H. et al. Functional differentiation of a clone resembling embryonic cortical interneuron progenitors. *Dev Neurobiol* **68**, 1549-64 (2008).
213. Kren, B.T. et al. MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol* **6**, 65-72 (2009).
214. Smirnova, L. et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* **21**, 1469-77 (2005).
215. Linsen, S.E., de Wit, E., de Bruijn, E. & Cuppen, E. Small RNA expression and strain specificity in the rat. *BMC Genomics* **11**, 249 (2010).
216. de Kloet, E.R., Fitzsimons, C.P., Datson, N.A., Meijer, O.C. & Vreugdenhil, E. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res* **1293**, 129-41 (2009).
217. Christoffersen, N.R., Silahatoglu, A., Orom, U.A., Kauppinen, S. & Lund, A.H. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFH1B. *RNA* **13**, 1172-8 (2007).
218. Hurteau, G.J., Spivack, S.D. & Brock, G.J. Potential mRNA degradation targets of hsa-miR-200c, identified using informatics and qRT-PCR. *Cell Cycle* **5**, 1951-6 (2006).
219. Hurteau, G.J., Carlson, J.A., Roos, E. & Brock, G.J. Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. *Cell Cycle* **8**, 2064-9 (2009).
220. Kim, K.C. & Kim, H.K. Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett* **397**, 48-52 (2006).
221. Murphy, D., Dancis, B. & Brown, J.R. The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis. *BMC Evol Biol* **8**, 92 (2008).
222. Pare, J.M. et al. Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell* **20**, 3273-84 (2009).
223. Xu, X.L., Li, Y., Wang, F. & Gao, F.B. The steady-state level of the nervous-system-specific microRNA-124a is regulated by dFMR1 in Drosophila. *J Neurosci* **28**, 11883-9 (2008).
224. Xu, X.L. et al. FXR1P but not FMRP regulates the levels of mammalian brain-specific microRNA-9 and microRNA-124. *J Neurosci* **31**, 13705-9 (2011).
225. Cheever, A. & Ceman, S. Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *RNA* **15**, 362-6 (2009).
226. Bail, S. et al. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* **16**, 1032-9 (2010).
227. Obernosterer, G., Leuschner, P.J., Alenius, M. & Martinez, J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* **12**, 1161-7 (2006).
228. Leuschner, P.J. & Martinez, J. In vitro analysis of microRNA processing using recombinant Dicer and cytoplasmic extracts of HeLa cells. *Methods* **43**, 105-9 (2007).
229. Vincent, P. & Mulle, C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* **158**, 309-23 (2009).
230. Sgobio, C. et al. Hippocampal synaptic plasticity, memory, and epilepsy: effects of long-term valproic acid treatment. *Biol Psychiatry* **67**, 567-74 (2010).
231. Nair, P.P., Kalita, J. & Misra, U.K. Status epilepticus: why, what, and how. *J Postgrad Med* **57**, 242-52 (2011).
232. Mulle, C. et al. Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* **392**, 601-5 (1998).

233. Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G.Y. & Sun, A.Y. Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* **31**, 3-16 (2005).
234. Hu, K. et al. MicroRNA expression profile of the hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy and miR-34a-targeted neuroprotection against hippocampal neurone cell apoptosis post-status epilepticus. *BMC Neurosci* **13**, 115 (2012).
235. McKiernan, R.C. et al. Expression profiling the microRNA response to epileptic preconditioning identifies miR-184 as a modulator of seizure-induced neuronal death. *Exp Neurol* **237**, 346-54 (2012).
236. Sano, T. et al. MicroRNA-34a upregulation during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Dis* **3**, e287 (2012).
237. Morimoto, K., Fahnstock, M. & Racine, R.J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* **73**, 1-60 (2004).
238. Jimenez-Mateos, E.M. et al. miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132. *Am J Pathol* **179**, 2519-32 (2011).
239. Jimenez-Mateos, E.M. et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat Med* **18**, 1087-94 (2012).
240. Nudelman, A.S. et al. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus* **20**, 492-8 (2010).
241. Nomura, T. et al. MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. *Hum Mol Genet* **17**, 1192-9 (2008).
242. Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-9 (2007).
243. Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multi-vesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**, 1143-9 (2009).
244. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D. & Galas, D.J. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **38**, 7248-59 (2010).
245. Arroyo, J.D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5003-8 (2011).
246. Lasser, C., Eldh, M. & Lotvall, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*, e3037 (2012).
247. Stoorvogel, W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* **119**, 646-8 (2012).
248. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C.Y. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* **22**, 125-32 (2012).
249. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C.Y. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* **3**, 28-37 (2012).
250. Smalheiser, N.R. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol Direct* **2**, 35 (2007).
251. Spacek, J. & Harris, K.M. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *J Neurosci* **24**, 4233-41 (2004).
252. Wu, K.Y. et al. Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* **436**, 1020-4 (2005).
253. Hengst, U. & Jaffrey, S.R. Function and translational regulation of mRNA in developing axons. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 209-15 (2007).
254. Cox, L.J., Hengst, U., Gurskaya, N.G., Lukyanov, K.A. & Jaffrey, S.R. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat Cell Biol* **10**, 149-59 (2008).
255. Natera-Naranjo, O., Aschrafi, A., Gioio, A.E. & Kaplan, B.B. Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA* **16**, 1516-29 (2010).
256. Ambros, V. et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277-9 (2003).
257. Nelson, P.T. et al. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA* **12**, 187-91 (2006).
258. Traynelis, S.F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **62**, 405-96 (2010).
259. Jiang, Q. et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* **37**, D98-104 (2009).
260. Buckmaster, P.S. & Dudek, F.E. In vivo intracellular analysis of granule cell axon reorganization in epileptic rats. *J Neurophysiol* **81**, 712-21 (1999).