



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA EXPRESIÓN DE mRNAs REGULADOS POR

microRNAs EN RETRASO MENTAL IDIOPÁTICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

YESSICA GUTIÉRREZ LÓPEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROSA MARÍA ORDOÑEZ RAZO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

DRA. ANNIE PARDO CEMO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015



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.

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de mayo de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GUTIÉRREZ LÓPEZ YESSICA** con número de cuenta **513023730**, con la tesis titulada **"ANÁLISIS IN VITRO DE LA EXPRESIÓN DE mRNAs REGULADOS POR microRNAs EN RETRASO MENTAL IDIOPÁTICO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ROSA MARÍA ORDOÑEZ RAZO**:

Presidente: DR. JUAN MIRANDA RIOS
Vocal: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
Secretario: DRA. ANNIE PARDO CEMO
Suplente: DR. GERARDO BERNABE RAMÍREZ RODRÍGUEZ
Suplente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de junio de 2015

María del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo recibido durante mis estudios de posgrado en la Universidad Nacional Autónoma de México y, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido a través de la Beca CONACYT 288721, para la realización de mis estudios de Maestría.

A los miembros de mi Comité Tutor, el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá y la Dra. Annie Pardo Cemo, por todo el apoyo brindado para la orientación y culminación de este trabajo.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	I
INDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso de Mamíferos	3
1.1.1. Proliferación	7
1.1.2. Migración	8
1.1.3. Diferenciación	10
1.1.4. Moléculas de guía axonal	11
1.1.4.1. Netrinas	11
1.1.4.2. Semaforinas	13
1.1.4.3. Slits	14
1.1.5. Sinaptogénesis	18
1.2. Retraso mental	21
1.2.1. Descripción del Retraso Mental	21
1.2.2. Retraso mental y su relación con microRNAs	27
1.3. Neuroepitelio olfatorio como modelo experimental	34
1.3.1. Células Progenitoras Neurales (CPNs)	37
2. ANTECEDENTES	39
3. OBJETIVOS	42
4. MATERIAL Y MÉTODOS	43
4.1. Materiales	43
4.1.1. Pacientes	43
4.1.2. Controles	43
4.1.3. Muestra Neuroepitelio Olfatorio	44
4.2. Métodos	44
4.2.1. Cultivo de Células Progenitoras Neurales (CPNs)	44

4.2.2.	Extracción de RNA	44
4.2.3.	Obtención del perfil de expresión de mRNAs	45
4.2.4.	Selección de genes con expresión diferencial	45
4.2.5.	Selección de genes por función en el SNC y neurodesarrollo	46
4.2.6.	Predicción <i>in silico</i> de genes diana de miR-25	46
4.2.7.	Validación de la expresión de ROBO2	46
4.2.8.	Ensayo de sobre-expresión de miR-25	48
4.2.9.	Obtención del plásmido	49
4.2.10.	Expresión relativa de miR-25	52
4.2.11.	Expresión relativa de ROBO2	53
5.	RESULTADOS	55
6.	DISCUSIÓN	64
7.	CONCLUSIONES	67
8.	LITERATURA CITADA	68

NDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fases del neurodesarrollo y afecciones asociadas	3
Figura 2 Embrión humano de 19 días.	4
Figura 3 Embrión humano de 22 días.	5
Figura 4 Estructura de proteínas Slit y sus receptores Robo.....	15
Figura 5 Vía de señalización Slit/Robo.	17
Figura 6 Clasificación del RM y prevalencia.	22
Figura 7 Biogénesis canónica y no canónica de los miRNAs.....	29
Figura 8 miRNAs destacados en el desarrollo del sistema nervioso central.	31
Figura 9 Epitelio olfatorio.....	37
Figura 10 Neuroesferas observadas en microscopio convencional	40
Figura 11 Inmunofluorescencias de neuroesferas con marcadores para células madre/progenitoras neurales.....	40
Figura 12 Vector pCMV-MIR.....	48
Figura 13 PCR tiempo real en dos pasos para miR-25.....	53
Figura 14 Grafica de dispersión del perfil de expresión de mRNAs de pacientes de RMI.	55
Figura 15 Mapa de calor de mRNAs sub-expresados en pacientes con RMI.	58
Figura 16 Alineamiento de miR-25 con región 3'UTR de ROBO2.....	60
Figura 17 Validación de expresión de <i>ROBO2</i> en pacientes con RMI.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Resumen de las características funcionales que pueden distinguir las CMNs de las CPNs.....	38
Tabla 2 miRNAs sobre-expresados significativamente en pacientes con RMI .	41
Tabla 3 IDs de los ensayos de expresión génica TaqMan® utilizados	47
Tabla 4 Buffer de transformación 1.....	50
Tabla 5 Buffer de transformacion 2.....	50
Tabla 6 Solución 1 para mini-prep.....	51
Tabla 7 Solución 2 para mini-prep.....	51
Tabla 8 Solución 3 para mini-prep.....	51
Tabla 9 Genes sub-expresados significativamente en pacientes con RMI.....	56
Tabla 10 Genes con cambios en expresión estadísticamente significativa en pacientes con RMI relacionados a SNC y Neurodesarrollo.	57
Tabla 11 Alineamiento de genes sub-expresados con microRNAs sobre-expresados.	59

ABREVIATURAS

RM: Retraso mental
RMI: Retraso Mental Idiopático
miRNAs: microRNAs
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleósidos trifosfatados
mL: mililitro
mM: concentración milimolar
xg: fuerza centrífuga (gravedad)
X: Veces la concentración
nm: nanómetros
mg: miligramos
M: concentración molar
ng: nanogramos
pb: pares de bases
DEPC: agua tratada con pirocarbonato de dietilo
PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
qPCR: Quantitative PCR (Tiempo Real)
RNA: Ácido Ribonucleico
mRNA: RNA mensajero
RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa
Taq: *Thermus aquaticus* (DNA polimerasa)
µg: microgramos
µl: microlitros
°C: grados centígrados
CMNs: Células Madre Neurales
CPNs: Células Progenitoras Neurales
SNC: Sistema Nervioso Central
NEO: Neuroepitelio olfatorio
CI: Coeficiente intelectual
ZSV: Zona sub-ventricular
ZSG: Zona sub-granular

RESUMEN

La condición de salud comúnmente conocida como “Retraso Mental” (RM) es definida como una discapacidad caracterizada por limitaciones significativas tanto en el funcionamiento intelectual como en la conducta adaptativa que se presenta en el 1-3% de la población general¹. A pesar de que el RM ha sido bastante estudiado, todavía se desconoce la etiología de aproximadamente el 50% de los casos, los cuales son catalogados como retraso mental idiopático (RMI)². Según datos previos de nuestro grupo de trabajo, a partir de cultivos de células progenitoras neurales (CPNs) de neuroepitelio olfatorio de pacientes con RMI, se determinó que 20 microRNAs presentan un cambio significativo en su expresión, donde miR-25 tiene el valor de expresión más alto, estando 140 veces más expresado en comparación con los controles.

En este trabajo se analizó en perfil de expresión de mRNAs a partir de muestras de los mismos pacientes y se encontró que 19 genes se encuentran sub-expresados, dentro de estos, *ROBO2* alinea en cuatro regiones a lo largo de su región 3' UTR con miR-25 y, después de un ensayo funcional de sobre-expresión de miR-25 en la línea celular A549, se observó que los niveles de mRNA de *ROBO2* se encuentran disminuidos más de la mitad de los niveles basales. El gen *ROBO2* produce una proteína que tiene como principal función actuar como señal de orientación molecular en la migración celular, incluyendo la navegación axonal del tubo neural y la proyección de los axones a diferentes regiones durante el desarrollo neuronal, por lo que el presente trabajo aporta las primeras evidencias de que miR-25 puede estar involucrado en estos procesos fundamentales en las primeras etapas del neurodesarrollo y que contribuyen al establecimiento de conexiones sinápticas.

En suma, los resultados obtenidos constituyen avances originales sobre el papel de miR-25 y su correlación con modificaciones en la expresión de *ROBO2* en pacientes con RMI.

ABSTRACT

The health condition commonly known as "Mental Retardation" (RM) is defined as a disability characterized by significant limitations both in intellectual functioning and in adaptive behavior that occurs in 1-3% of the general population¹. Although the RM has been widely studied, the etiology of approximately 50% of cases, which are classified as idiopathic mental retardation (RMI) is still unknown². According to previous data from our group work from cultures of neural progenitor cells (NPCs) cells olfactory neuroepithelium of patients with RMI, it was determined that 20 microRNAs showed a significant change in expression, where miR-25 had the highest value expression, being expressed 140 times higher than controls.

In this paper we analyzed the expression profile of mRNAs from samples from the same patients and found that 19 genes are under-expressed, within these, *ROBO2* aligned in four regions along its 3'UTR with miR-25 and, after a functional test of over-expression of miR-25 in the A549 cell line, it was observed that *ROBO2* mRNA levels were decreased over half of baseline. The *ROBO2* gene produces a protein whose main function is to act as a sign of molecular orientation in cell migration, axonal navigation including neural tube and projection of axons to different regions during neuronal development, so this study provides the first evidence that miR-25 may be involved in these fundamental processes in the early stages of neurodevelopment and contribute to the establishment of synaptic connections.

In sum, the results are original developments on the role of miR-25 and its correlation with changes in the expression of *ROBO2* in patients with RMI.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo del Sistema Nervioso de Mamíferos

El desarrollo del sistema nervioso es un proceso muy complejo, orquestado por eventos moleculares y celulares sincronizados. Cada una de las fases que lo conforman requiere una gran precisión, por lo que cualquier complicación en los estadios iniciales del desarrollo puede generar enormes anomalías en estadios posteriores y dar como consecuencia afecciones, tales como el autismo, retraso mental, epilepsia, etc³⁻⁵ (Figura 1).

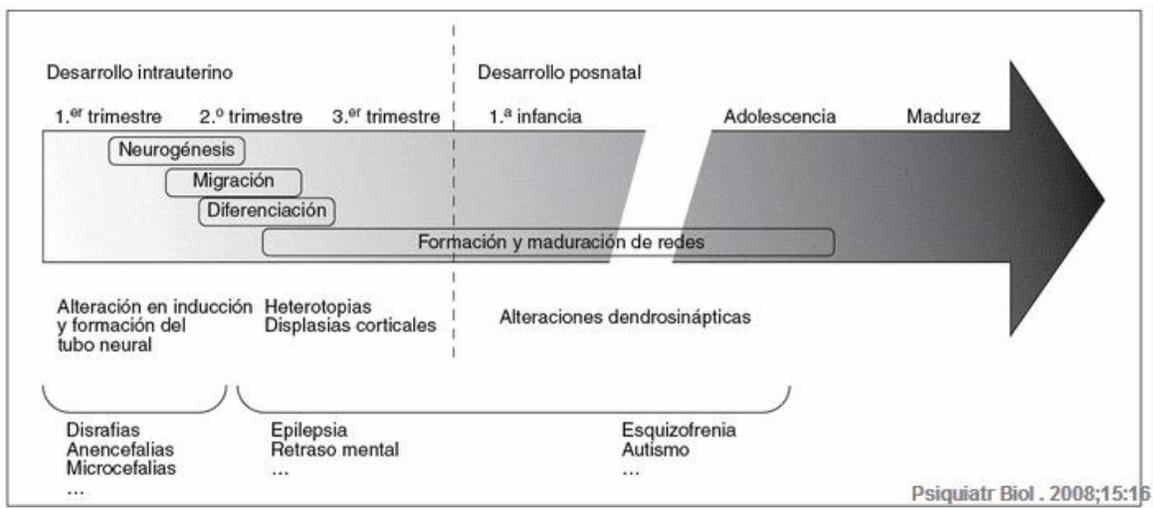


Figura 1. Fases del neurodesarrollo y afecciones asociadas. El momento temporal en el que se altera el neurodesarrollo es determinante para el tipo de afectación citoarquitectónica que se producirá. Cada una de estas alteraciones morfológicas resultantes está asociada a su vez a distintos grupos de enfermedades. La esquizofrenia y el autismo se encuentran probablemente en el grupo más tardío y sutil de las alteraciones del neurodesarrollo. Tomado de *Urgelés D., et al, 2008*.

La formación del sistema nervioso en los seres humanos inicia durante la tercera semana del desarrollo embrionario, día 19 de gestación, cuando la notocorda y el mesodermo estimulan al ectodermo (Figura 2). Este complejo proceso de inducción notocordal hace que el tejido ectodérmico se engruese, formándose así la **placa neural**⁶. Es posible que el engrosamiento del neuroectodermo tenga relación con la polimerización de microtúbulos en el citoplasma de las células nerviosas en formación. Actualmente se han identificado varios tipos de moléculas que actúan como señales en procesos inductivos del SNC, algunas de ellas pertenecen a la familia del factor transformador del crecimiento β (TGF- β)⁷. Existen otras moléculas como el

ácido retinoico o algunos neurotransmisores que al encontrarse en gradientes de concentración producen respuestas celulares importantes. La inducción neural trae como consecuencia una sobreproducción inicial de células nerviosas³.

Una vez que el proceso inductivo ha concluido, la placa neural se alarga desde su sitio de origen craneal al nodo primitivo. Los **pliegues neurales** se forman el día 20 del desarrollo embrionario, a partir de la elevación de los bordes laterales de la placa neural, y la porción media entre los pliegues neurales forman el **surco neural**. Ocurrido esto, los pliegues neurales se elevan más, se acercan y se fusionan en la línea media del embrión formando así el denominado **tubo neural**⁷ (Figura 3).

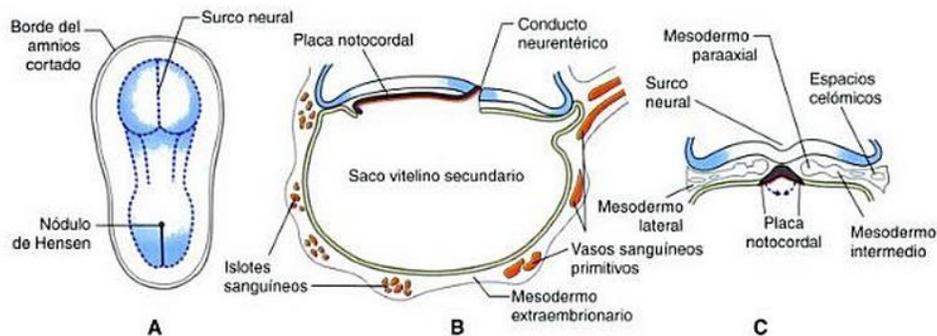


Figura 2. Embrión humano de 19 días. a) Aspecto macroscópico (vista dorsal), b) corte longitudinal y c) corte transversal. Tomado de *Eynard, A. R. 2008*.

Mientras los pliegues neurales se acercan a la línea media para fusionarse, un grupo de células neuroectodérmicas ubicadas en la cresta de cada pliegue, también llamadas crestas neurales, pierden afinidad epitelial con las células adyacentes. Estas células se denominan **células de la cresta neural** (Figura 3). La migración de este tipo celular desde las crestas hacia el mesodermo adyacente transforma al neuroectodermo en una masa aplanada e irregular que rodea al tubo neural. Este grupo celular dará origen a un conjunto heterogéneo de tejidos de gran importancia que formarán la mayor parte del sistema nervioso periférico (SNP) y parte del autónomo (SNA)⁷.

Luego del cierre completo del tubo neural, comienza el desarrollo de la región caudal del tubo. Entre el día 28 y 32, un conjunto de células del tubo neural desarrolla una serie de pequeñas vacuolas, que posteriormente toman contacto con el canal central. Este proceso de canalización prosigue hasta la séptima

semana. En el periodo siguiente ocurre la regresión de muchas células de la masa caudal. El extremo cefálico del tubo neural se dilata y origina 3 **vesículas encefálicas primarias**: Prosencéfalo (cerebro anterior), Mesencéfalo (cerebro medio) y el Rombencéfalo (cerebro posterior)⁸.

Los distintos procesos que ocurren desde la inducción notocordal hasta este punto, se engloban en el concepto de neurulación, y mientras esto ocurre, el embrión suele llamarse **néurula**⁸.

Luego de ocurridos los procesos de neurulación, inicia el desarrollo de estructuras específicas como la médula espinal, las placas basales, alares, del techo y de piso, meninges espinales y encéfalo⁶.

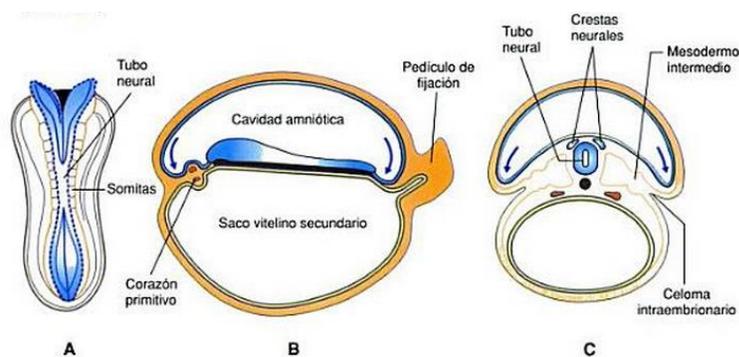


Figura 3. Embrión humano de 22 días. Las líneas indican el plegamiento del embrión. a) aspecto macroscópico (vista dorsal). B) corte longitudinal y c corte transversal. Tomado de *Eynard, A. R. 2008*.

Durante la cuarta semana, después del cierre de los neuroporos, el extremo cefálico del tubo neural craneal al cuarto par de somitas se dilata considerablemente y aparecen las 3 vesículas encefálicas primarias: **Prosencéfalo** (cerebro anterior), **Mesencéfalo** (cerebro medio) y **Rombencéfalo** (cerebro posterior)⁸. Simultáneamente se están formando dos plegamientos: el pliegue cervical, en unión del rombencéfalo y médula espinal y el pliegue cefálico en el mesencéfalo. El mesencéfalo se separa del rombencéfalo por el surco llamado el istmo del rombencéfalo⁷.

Durante la cuarta semana tanto el prosencéfalo como el rombencéfalo se dividen en dos vesículas secundarias: el prosencéfalo origina el **Telencéfalo** (cerebro terminal) que consta de una parte media y dos evaginaciones laterales (hemisferios cerebrales primitivos), y el **Dicencéfalo**, que presenta una evaginación de las vesículas ópticas. El rombencéfalo formara finalmente el

Mesencéfalo, que constituirá la protuberancia y el cerebelo, y el **Mielencéfalo** (el futuro bulbo raquídeo).

El telencéfalo es la vesícula encefálica más rostral. Entre la semana 5 y 12, las evaginaciones de la pared lateral del telencéfalo originan los hemisferios cerebrales. La expansión anterior forma los lóbulos frontales mientras la superolateral origina los lóbulos parietales; finalmente, la expansión posteroinferior forma los lóbulos temporales y occipitales. El proceso continúa con un aplanamiento medial de los hemisferios cerebrales⁷.

Durante la semana 6, la parte basal de los hemisferios aumenta de tamaño y sobresale hacia el ventrículo lateral dando origen al **cuerpo estriado**. Esta región de la pared hemisférica se expande en dirección posterior y se divide en dos partes: el núcleo caudado, dorsomedialmente, y el núcleo lenticular, ventrolateralmente⁷. La fusión de la pared medial del hemisferio y la pared del dicencéfalo permite el contacto entre el núcleo caudado y tálamo. Tractos ascendentes y descendentes de la corteza cerebral pasan entre el tálamo y núcleo caudado medialmente y núcleo lentiforme formando la cápsula interna. La pared del prosencéfalo se engrosa formando una estructura longitudinal que protruye al ventrículo lateral: el **hipocampo**⁶.

Al final de la vida fetal, la superficie hemisférica crece tan rápido que se forman los giros (circunvoluciones) separados por surcos y hendiduras. Estos surcos y giros permiten un aumento considerable de la superficie cerebral y, como consecuencia, un aumento de la superficie cortical sin sobrepasar el volumen del cráneo⁶.

En cuanto a la corteza cerebral, se desarrolla a partir del palio, que consta de tres regiones: Paleopalio, Arquipalio y Neopalio. Estas originan la **Paleocorteza**, la **Arquicorteza** y la **Neocorteza** respectivamente. En cualquier región de la corteza, las paredes de los hemisferios cerebrales presentan tres zonas: ventricular, intermedia y marginal. Las neuronas que migran desde la zona intermedia hacia la zona marginal originarán la **corteza cerebral**⁶. De esta manera, la sustancia gris queda ubicada superficialmente y los axones y fibras nerviosas quedan ubicados en la profundidad del cerebro. La primera masa de neuroblastos que emigran en el neopalio se dirige a una zona inmediatamente debajo de la piamadre (membrana de tejido conectivo que protege al SNC) para diferenciarse en neuronas maduras. Los siguientes grupos de neuroblastos van

ubicándose entre la piamadre y la capa anteriormente formada. De esta manera, los primeros neuroblastos formados quedan en la porción profunda de la corteza mientras que los formados posteriormente originan las capas superficiales de la corteza. La diferenciación neuronal en las diferentes capas da un aspecto estratificado a la corteza cerebral y origina zonas con una composición celular específica⁶.

Para la formación de estas estructuras complejas específicas del SNC, como el telencéfalo (región más conocida como cerebro) y la corteza cerebral, tienen que ocurrir cuatro procesos básicos celulares y moleculares: proliferación neuronal, migración, guía axonal y sinaptogénesis.

1.1.1. Proliferación

Alrededor de la semana 4 del desarrollo embrionario en humanos, se forma una delgada capa de tejido que forma la pared del tubo neural denominada **Neuroepitelio**. Está formado por células germinales embrionarias llamadas Células Madre Neurales (CMN), que a partir del cierre del neuroporo rostral del tubo neural comienzan la fase de proliferación celular. Durante la mitosis las células madre se sitúan en la zona ventricular mientras que en el periodo intermitótico ocupan la zona marginal. Esta distribución aporta al neuroepitelio una apariencia de estar formando capas (pseudoestratificada)⁶.

De las divisiones rápidas de las células madre nacen las Células Progenitoras Neurales (CPNs), que también se dividen con gran rapidez. Estas divisiones se producen en la zona ventricular del neuroepitelio. La zona marginal está formada por células en periodo de interfase⁶. Las divisiones mitóticas de las células progenitoras originan en principio otras células progenitoras y, tras varias divisiones, estas realizan una última división que produce neuronas inmaduras (que no se dividen más) y glioblastos (se pueden dividir toda la vida)⁷. Muchos de los glioblastos que se originan en la zona ventricular se diferencian en un tipo de glía llamada glía radial durante el periodo embrionario⁶.

Gran parte de la proliferación celular se produce en la zona ventricular de las diferentes regiones del tubo neural⁴:

- Zona ventricular: las células se dividen sucesivamente hasta que han proliferado una gran cantidad de las neuronas inmaduras que formarán las diferentes estructuras del SNC y muchos glioblastos⁴.
- Zona subventricular: es la segunda zona proliferativa en el neuroepitelio del telencéfalo. Se forma sobre la zona subventricular con células progenitoras y glioblastos que se desplazan a ella en un periodo temprano del desarrollo y en ella nacen neuronas inmaduras de pequeño y mediano tamaño y la gran mayoría de las células gliales. Esta zona es además fundamental porque se mantiene como nicho neurogénico durante toda la vida⁴.
- Capa granular externa: segunda zona proliferativa del cerebelo. Se forma en la zona externa del neuroepitelio del cerebelo. En ella proliferan las neuronas inmaduras que se diferenciarán en células granulares y el resto de interneuronas del cerebelo. La primera zona proliferativa del cerebelo es la típica zona ventricular del neuroepitelio en la que proliferan las neuronas que se diferenciarán en células de Purkinje, células de Golgi y células de los núcleos profundos.

La diferenciación a neuronas maduras ocurre en la última división de las células progenitoras. Este evento no ocurre simultáneamente en las distintas zonas del tubo neural, de manera que cada una tiene su propio periodo de neurogénesis, y en todas las regiones del tubo neural nacen antes las neuronas de proyección (neuronas que envían su axón fuera del propio núcleo de origen para conectar con otros centros tras un recorrido de longitud variable) que las interneuronas (son neuronas de axón corto, que se ramifica y termina en el interior del propio centro de origen) ⁴.

Como consecuencia a la proliferación, la pared del tubo neural se irá engrosando y se formarán secuencialmente las distintas estructuras que componen el SNC.

1.1.2. Migración

Las neuronas inmaduras se desplazan desde la zona en la que han nacido hasta su zona de destino. Al iniciar esta fase de migración, las neuronas se sitúan entre la zona ventricular y la zona marginal del neuroepitelio y forman la **zona**

intermedia o capa del manto. Su ubicación en esta zona es transitoria porque prosiguen su desplazamiento hasta alcanzar su destino definitivo⁴.

En el tubo neural la mayoría de las neuronas inmaduras migran guiadas por las células de la glía radial que nacen en la zona ventricular al mismo tiempo que nacen las neuronas inmaduras. La glía radial es fundamental ya que sirve como soporte mecánico a las neuronas inmaduras para su desplazamiento a través del neuroepitelio. Las neuronas en migración se desplazan por las prolongaciones gliales con un movimiento ameboide⁴. Este mecanismo de migración está controlado por moléculas de la membrana celular como las moléculas de adhesión neurona-glía (MAC-Ng): estas moléculas realizan el reconocimiento de las prolongaciones de la glía radial para iniciar la migración y controlan la adhesividad de las neuronas migratorias para permitir su desplazamiento⁴.

Una vez terminada la migración, la principal función de las células de la glía radial es el soporte de las neuronas, además de controlar el microambiente de las células en cuanto a composición iónica, niveles de neurotransmisores y otros factores de crecimiento⁸.

El mecanismo de migración guiada desde la zona ventricular por la glía radial se considera universal para todas las células del SNC en desarrollo.

En la corteza cerebral, las neuronas migratorias se establecen en las capas siguiendo un patrón de *dentro hacia afuera* en relación con la región de la que se originaron, con la excepción de la capa I (de seis), aunque es la más superficial, se instalan las primeras neuronas que nacen en el neuroepitelio telencefálico. Todas las neuronas de la placa cortical ascienden por las capas formadas antes, hasta alcanzar la capa I, y luego descienden hasta ocupar su capa⁴.

Con el fin de conformar las diferentes regiones del sistema nervioso las neuronas inmaduras deben migrar desde el lugar de nacimiento (generalmente cerca de las regiones más internas del tubo neural) hasta su localización definitiva en el sistema nervioso, y una vez allí unirse con otras neuronas para formar unidades funcionales (núcleos y capas corticales).

Una vez que la neurona termina su migración, comienza a *madurar*. Este proceso incluye su diferenciación y la formación de vías de conexión⁴.

1.1.3. Diferenciación

En esta fase la neurona adquiere las características morfológicas y fisiológicas de una neurona adulta. La diferenciación morfológica básica de una neurona está programada antes de que alcance su destino, pero, el pleno desarrollo de su arborización depende del entorno de las neuronas y las interacciones que se establecen entre ellas⁴. A partir de la semana 15 y después del nacimiento hay un segundo periodo de maduración que está relacionada con la formación de las vías de conexión y el periodo de establecimiento de conexiones que son fundamentales para la completa diferenciación neuronal⁸. La maduración de la neurona implica, además de las características morfológicas, como la expresión de organelos típicos de neuronas y la formación de sinapsis, la adquisición de propiedades fisiológicas específicas (denominada también diferenciación bioquímica), que comprende el desarrollo de la maquinaria para la síntesis de los neurotransmisores y la expresión de los receptores⁴.

El complejo proceso de crecimiento de la neurona inmadura depende de los **conos de crecimiento** descrito por Santiago Ramón y Cajal⁹. Éstos existen en todos los extremos de las prolongaciones neuríticas (axones y dendritas inmaduras) que están desarrollándose, se localiza en la parte más externa de la neurita, tiene una región periférica constituida por lamelipodios o delgadas extensiones membranales, y por filopodios o pequeñas espículas que sobresalen de los lamelipodios. Cada una de estas regiones tiene una distribución característica de filamentos de actina y microtúbulos. En los lamelipodios se encuentran numerosas fibras cortas de actina que forman una red, y en ocasiones se encuentran también microtúbulos; mientras que en los filopodios se encuentran generalmente fibras de actina. La parte central del cono de crecimiento está formado principalmente por microtúbulos y se caracteriza por la presencia de gran cantidad de organelos celulares. En la zona de transición, que se localiza entre la zona central y periférica, se encuentra la parte más distal de los microtúbulos en interacción con las fibras de actina de la zona periférica¹⁰.

La proyección de las neuritas comprende tres pasos principales que se suceden de manera continua y ordenada: 1) el avance de la zona periférica del cono de crecimiento, 2) el “llenado” de la zona periférica con organelos, 3) la consolidación, mediante la “invasión” del citoesqueleto en la zona central, y la constricción y formación de una estructura cilíndrica que formará el nuevo

segmente del axón. Cuando no existe movimiento de las neuritas se dice que el cono de crecimiento está en un estado estático-dinámico en donde hay una exploración continua del medio y los lamelipodios y filopodios están en constante extensión-retracción. La activación de receptores membranales por señales guía converge en la modulación del citoesqueleto a través de diversas vías de transducción de señales. La familia de las GTPasas pequeñas, y en especial la familia de las GTPasas Ras y Rho tiene un papel fundamental modulando la polimerización y despolarización de los filamentos y activando vías de transducción de señales como las ERK o MAP cinasas¹¹.

Los axones siguen trayectos específicos que son delimitados mediante señales de naturaleza química y mecánica, y que pueden actuar como señales atrayentes o permisivas, y repelentes o no permisivas. Una señal atrayente induce el crecimiento y atrae las proyecciones, pero también una señal repelente delimita el sitio por el cual las neuritas deben avanzar contribuyendo a la proyección correcta¹². Las señales repelentes pueden causar la disminución en la adición de monómeros de actina y la pérdida o disminución de los filamentos en la zona más externa del cono de crecimiento induciendo su colapso¹³; mientras que las señales atrayentes favorecen la adición de nuevos monómeros de actina y el desplazamiento retrógrado de los filamentos por interacción con miosina tipo II, que produce una fuerza que impulsa al cono de crecimiento hacia adelante, a través de la extensión de la membrana celular y la extensión de los filopodios¹⁴.

Los factores que contribuyen a guiar los axones hacia sus destinos implican tanto procesos de reconocimiento molecular como de afinidad química⁴. Este proceso es crucial en la definición de conexiones entre las neuronas cerebrales especialmente durante el desarrollo. Algunas patologías, entre ellas la esquizofrenia, epilepsia, problemas de aprendizaje y enfermedad de Parkinson, se han relacionado con defectos en este proceso ¹⁵⁻¹⁸.

1.1.4. Moléculas de guía axonal

1.1.4.1. Netrinas

La familia de las Netrinas (del sánscrito *netr*, “el que guía”) está compuesta por un conjunto de proteínas secretables tradicionalmente relacionadas con la guía

de axones y células durante el desarrollo del sistema nervioso. El miembro que da nombre a la familia, Netrina1, fue identificado en cerebro de pollo como la molécula responsable de la actividad quimiotáctica y promotora del crecimiento axonal que posee la placa del suelo de la médula espinal^{19; 20}. Esta proteína de 78 kDa muestra afinidad por las membranas, y su estructura es similar a la de la proteína Unc6, implicada en la guía circunferencial de axones y células y descrita como uno de los varios mutantes de *C. elegans* con distintos fenotipos de descoordinación²⁰. Netrina1 y Unc6 presentan en su extremo N-terminal una secuencia señal, seguida de una región de elevada similitud con las tres cadenas de Laminina. Esta región homóloga a la de Laminina está formada por el dominio VI o dominio globular, y el dominio V, una región lineal compuesta de tres repeticiones tipo EGF ricas en cisteína, también llamadas V1-3, y que forman parte de numerosas moléculas de matriz extracelular. El extremo C-terminal contiene el dominio C (llamado así por su parecido a la región C-terminal de proteínas del complemento), una región rica en residuos básicos (lo que explica la elevada afinidad de Netrina1 por la heparina) que además presenta un motivo RGD, una secuencia señal para receptores de la familia de las integrinas²¹.

En vertebrados, la Netrina1 expresada en la placa del suelo de la médula espinal atrae axones comisurales y repele axones trocleares¹⁹. En el ratón mutante de Netrina1 se observan defectos en la trayectoria de axones comisurales espinales, así como en otras comisuras del encéfalo, como el cuerpo calloso, la comisura ventral anterior y la hipocampal²².

Estas proteínas se pueden distinguir en tres familias:

-Netrinas clásicas: incluyen a Unc6, Netrina1 y otras.

-Subfamilia de Netrina4/ β -Netrina. Los 2 tercios N-terminales muestran similitud con las subunidades β y γ de la Laminina- β , además no poseen las dos cisteínas adicionales que sí presenta la anterior familia. Se expresa tanto en tejido nervioso, donde se ha demostrado que promueve el crecimiento axonal en determinados tipos neuronales, como en otros órganos como hígado, corazón, ovario y vasculatura, donde se localiza en membrana basal²¹.

Estas moléculas tienen diferentes receptores entre los que se encuentran: Dcc (Deleted In Colorectal Carcinoma), Unc5 (uncoordinated locomotion-5), y la familia de las Integrinas.

1.1.4.2. Semaforinas

La superfamilia de las Semaforinas está formada por tres subfamilias: Semaforinas, Plexinas (ambas presentes tanto en invertebrados como en vertebrados) y los receptores tirosina-quinasa Met y Ron (específicas de vertebrados). Las proteínas que forman parte de dicha superfamilia tienen una estructura similar, caracterizada por la presencia en el extremo N-terminal del dominio sema, y por una o más copias del dominio rico en cisteínas CDR, también denominado MRS (*Met-Related sequence*) o PSI (*Plexin-Semaphorin-integrin domain*), adyacente al dominio Sema en su lado C-terminal²³. El dominio Sema equivalente estructuralmente a una variante del pliegue tipo hélice- β , un tipo de topología proteica muy común tanto en proteínas extracelulares como citosólicas, y junto con el dominio CDR constituyen el dominio semaforina original, que Kolodkin y colaboradores en 1993 definieron como rasgo característico de la familia de las semaforinas²⁴.

Las semaforinas, cuyo nombre hace referencia al sistema de banderas y luces de la comunicación y ferroviaria²⁵, se agrupan según similitudes estructurales en ocho clases, todas ellas de origen animal excepto la clase V, formada por proteínas víricas. Las semaforinas de clase 2 y 3 son solubles, mientras que el resto de clases contienen semaforinas ancladas a la membrana plasmática; entre ellas, las clases 1, 4, 5, y 6 las componen proteínas transmembranales de tipo I (con su extremo N-terminal en el medio extracelular, y su extremo C-terminal en el citosol), y las semaforinas de clase 7 presentan un dominio GPI de unión a membrana. Las clases 1 y 2 contienen semaforinas de origen invertebrado, y las clases 3, 4, 5, 6 y 7 con de origen vertebrado²⁶.

La repulsión del axón es uno de los principales aspectos de acción de las semaforinas. Sin embargo, algunas pueden atraer o repeler a los conos de crecimiento; la acción que llevarán a cabo dependerá de la naturaleza de la neurona y de los receptores presentes en la membrana neuronal⁸. Existen varias proteínas que pueden actuar como receptores o parte de complejos receptores de semaforinas. Entre ellas las más importantes son las Plexinas y Neuropilinas, aunque también²⁶:

- Otk, una proteína similar en estructura a un receptor tirosina-quinasa, pero con un dominio catalítico inactivo; en *Drosophila*, interacciona con PlexA y actúa como receptor de Sema1a.

- Moléculas de adhesión celular (CAM) pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. L1 forma parte junto con neuropilinas y plexinas del complejo receptor de Sema3A, mientras que NrCAM se asocia con Np2 y forma parte del complejo receptor de Sema3F y sema3B²⁷
- Integrinas como $\beta 1$ integrin, considerada como un receptor de Sema7a anclada a membrana²⁸.
- Met o factor de crecimiento hepático, un miembro de la superfamilia de las Semaforinas que, asociado a PlexB1, transduce la señal de Sema4D.
- CD72, una proteína que forma parte de la superfamilia de las Lectinas, actúa como receptor de Sema4D específicamente en sistema inmune.
- Tim2, perteneciente a la familia de proteínas TIM, es un receptor de Sema4A que actúa como regulador de la función de las células T.

1.1.4.3. Slits

La familia Slit de proteínas solubles fueron descubiertas a finales de la década de los años 90 según dos aproximaciones distintas: se identificó a Slit como el ligando del receptor Robo y factor responsable de la actividad repulsiva axonal presente en la línea media de *Drosophila*²⁹, y como factor derivado de extractos cerebelares que estimulaba la elongación y ramificación de axones sensoriales espinales³⁰. La familia Slit incluye miembros en *Drosophila*, en mamíferos y el pollo³¹, que se expresan en la línea media del SNC y están asociados a la matriz extracelular. Contienen una secuencia señal seguida de cuatro repeticiones ricas en leucina, siete repeticiones tipo EGF (Factor de crecimiento epidermal), y un dominio LNS típico de otras proteínas de matriz extracelular, situado en el sexto y séptimo dominio EGF. Algunos miembros de la familia presentan un dominio de proteólisis entre la quinta y la sexta repetición EGF que genera un fragmento N-terminal y otro fragmento C-terminal más pequeño²⁹ (Figura 4).

Sus receptores, la familia de proteínas *Roundabout* (Robo), forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y presentan cinco dominios IG, seguidos de tres dominios Fibronectina tipo III, un dominio transmembranal y una región intracelular que interacciona directamente con varios elementos

reguladores del estado del citoesqueleto celular: con la proteína tirosina-quinasa Abelson, con su sustrato Enabled, o con proteínas GAP inactivadoras de la GTPasa Rac^{32; 33} (Figura 5).

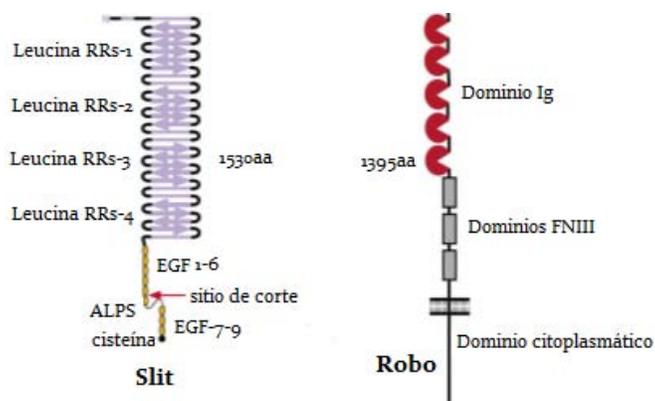


Figura 4. Estructura de proteínas Slit y sus receptores Robo. Tomada y modificada de *Nguyen-Ba-Charvet, K. T y Chedotal, A. 2002.*

Junto con Netrina1, las proteínas Slit están tradicionalmente ligadas al proceso de guía de axones de la línea media, función descrita directamente en *Drosophila*, aunque conservada a lo largo de la evolución y presente también en vertebrados³¹. Generalmente, Slit interviene como factor repulsivo no solamente en la proyección de axones en la línea media, sino también el desarrollo de conexiones de la formación hipocampal³⁴.

Un análisis de la región LRR de Slit ha demostrado que los receptores Robo se unen a un sitio común localizado en la región D2 de Slit³⁵. Por otro lado, Robo se une a Slit en sus dominios Ig1 e Ig2³⁶.

Slit también actúa como factor quimiotáctico en la migración de distintos tipos celulares durante el desarrollo: Slit repele células mesodérmicas precursoras de fibras musculares desde la línea media en *Drosophila*, que más tarde son atraídas por Slit presente en los puntos de anclaje musculares³⁷. Slit repele neuronas de la zona subventricular pertenecientes a la corriente rostral migratoria (RMS), que aporta células al bulbo olfatorio³⁸, y desde la zona ventricular de la eminencia ganglionar, Slit repele las interneuronas del subpallio y las dirige hacia la neocorteza³⁹; Slit silencia la señal atractiva de Netrina1 sobre las células de la oliva inferior, impidiendo que sus somas atraviesen la línea media⁴⁰.

Slit estimula la ramificación de axones sensoriales y GABAérgicos *in vitro*⁴¹, efecto que resulta contrario a la función de repeler axones y células durante el desarrollo. Parece ser que el fragmento N-terminal de Slit generado tras su proteólisis acapara la función de ramificación, mientras que la proteína completa antagoniza la actividad de ramificación y es responsable, a su vez, de la repulsión celular; por lo tanto, pueden existir diferencias en la señalización de Slit que dan lugar a funciones contrapuestas³¹.

En *Drosophila*, la mutación nula del gen *Slit* genera un fenotipo de “línea media colapsada”, en el que los axones comisurales alcanzan la línea media, pero en vez de atravesarla, permanecen en ella formando un único tracto ascendente⁴². Contrariamente a lo esperado, la deficiencia génica de sus receptores, las proteínas Robo, producían fenotipos distintos: en el mutante Robo los axones comisurales cruzan una y otra vez la línea media⁴³, mientras que en el mutante Robo2 se observan alteraciones en los tractos axonales longitudinales, pero las comisuras aparecen normales; el doble mutante Robo/Robo2, en cambio, si muestra un fenotipo similar al del mutante Slit⁴⁴. Por lo tanto, Robo y Robo2 son responsables de todas las acciones de Slit en la guía de axones comisurales en la línea media, respondiendo ambos receptores ante Slit con repulsión, aunque de forma distinta tanto cuantitativa como cualitativamente⁴⁴. *Robo* y *Robo2* se expresan en el SNC desde estadios tempranos, y sus respectivas proteínas están presentes en los axones que proyectan ipsilateralmente desde el principio de su trayectoria⁴⁴, sin embargo, la proteína Robo presenta elevados niveles en los axones comisurales únicamente cuando estos ya han cruzado la línea media⁴⁵. Este hecho es debido a la expresión de la familia de genes *Comm* específicamente en axones comisurales, y momentáneamente cuando estos cruzan la línea media⁴⁶. Los genes *Comm* codifican proteínas transmembranales presentes mayoritariamente en el compartimento intracelular de Golgi y endosomal, y que actúan como receptores de clasificación, desviando a Robo hacia endosomas tardíos y lisosomas⁴⁷, y produciendo en última instancia la disminución del nivel de proteína Robo y Robo2 solamente en axones comisurales en tránsito por la línea media de *Drosophila*⁴⁸. La función atribuida a las proteínas Comm en la guía de los axones comisurales concuerda con el fenotipo de mutaciones nulas, caracterizado por la falta de comisuras en el SNC⁴³.

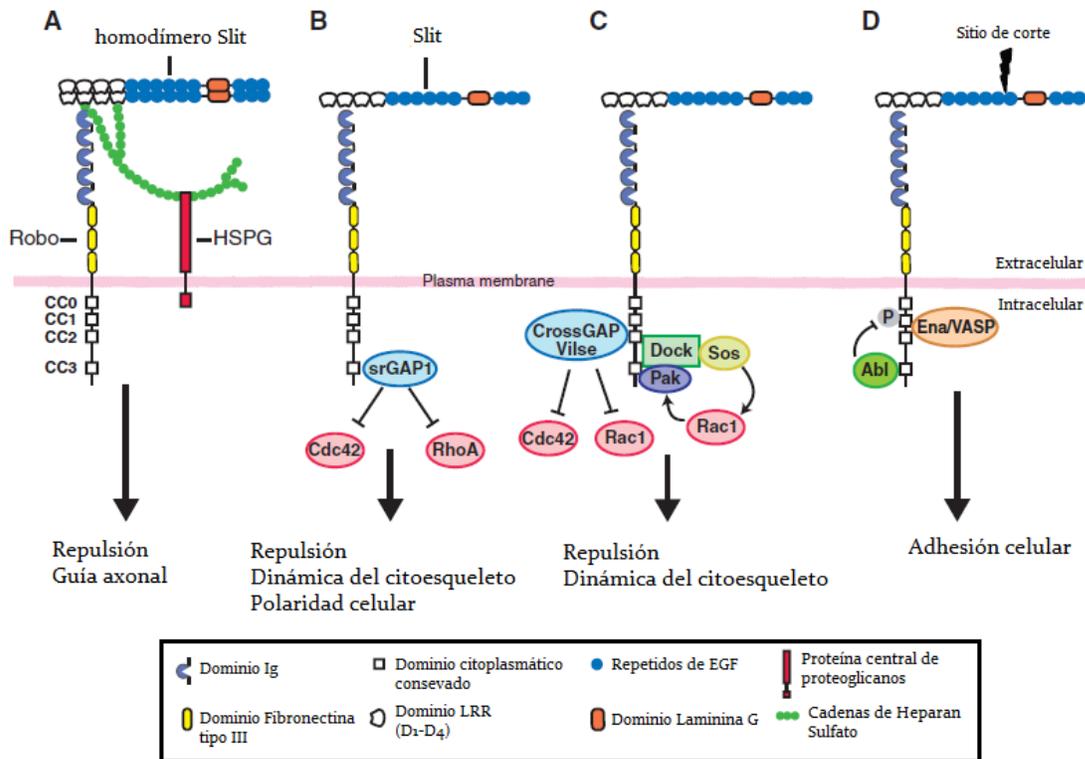


Figura 5. Vía de señalización Slit/Robo. (A) Slit se une al dominio Ig1 de los receptores Robo a través de su segundo dominio (D2), que contiene repetidos ricos en leucina (LRRs). Los proteoglicanos de Heparan Sulfato (HSPGs) tales como sindecano (Sdc), que consisten en una proteína central de proteoglicano y cadenas de Heparan Sulfato (HS), son co-receptores para Robo y Slit. HSPGs estabilizan la unión de Robo y Slit por la formación de un complejo ternario con el dominio Ig1 del receptor Robo y el dominio D2 de Slit a través del polímero de HS. (B) Las GTPasas Rho y sus reguladores (GAPs y GEFs) son componentes de la vía de señalización Slit/Robo. En presencia de Slit, Slit-RoboGAP1 (srGAP1) se une al dominio CC3 de Robo e inactiva RhoA y Cdc42. Estas proteínas receptoras son capaces de mediar, entre otros procesos, la repulsión, el control de la dinámica del citoesqueleto y la polaridad celular. (C) en presencia de Slit, Vilse/CrossGAP también puede unirse al dominio CC2 de Robo e inhibir Rac1 y Cdc42. Rac1 también se activa mediante el reclutamiento del GEF (proteína intercambiadora de guanina) de la vía de la proteína Sos con la proteína adaptadora Dreadlocks (Dock), que se une al dominio CC2-3 de Robo. Esto activa la cinasa diana rio abajo de Rac1 y p21 activada (Pak), que también se une al dominio CC2-3 de Robo. Estas señales asociadas más debajo del receptor Robo controlan la repulsión y la dinámica del citoesqueleto. (D) la tirosina cinasa Abelson (Abl) se une al dominio CC3 de Robo y antagoniza la señalización de Robo a través de la fosforilación de del dominio CC1 y media la adhesión celular. Enabled (Ena) es un sustrato de Abl que también se une a los dominios CC1 y CC2 de Robo. El sitio de corte en Slit también se muestra. Tomada y modificada de *Ypsilanti, A et al., 2010*.

En vertebrados, Slit y sus receptores Robo parecen funcionar de forma similar en la guía de axones comisurales de la médula espinal: tres miembros de la familia *Slit* se expresan en la línea media, y en el ratón triple deficiente de axones comisurales no abandonan la línea media⁴⁹. Además, las proteínas Robo y Robo2 se localizan mayoritariamente en axones comisurales que ya han cruzado la línea media, precisamente cuando se vuelven sensibles al efecto

repulsivo de Slit e insensibles a la actividad quimioattractiva de la línea media⁵⁰. Sin embargo, existen ciertas diferencias entre el modelo de guía axonal en la línea media de *Drosophila* y vertebrados: en éstos aún no se ha identificado un homólogo de Comm, mientras que, a diferencia de *Drosophila*, Rig/Robo3 expresado en axones comisurales espinales previamente al cruce de la línea media anula la sensibilidad de dichos axones hacia el quimiorrepelente Slit, posiblemente interfiriendo con receptores Robo en su unión a Slit o en la cascada de señalización intracelular. Además, en vertebrados se ha demostrado que los axones comisurales espinales pierden su sensibilidad ante el efecto atractivo de Netrina1 presente en la línea media una vez que la han cruzado, debido a que la interacción entre Robo y Dcc a nivel intracelular produce la inactivación de Dcc y, por consiguiente, el silenciamiento de la señal de Netrina1⁵¹.

1.1.5. Sinaptogénesis

Cuando los axones en crecimiento llegan a su diana, establecen contactos con las neuronas del mismo. Es estos puntos de contacto entre los axones aferentes y las neuronas de destino, se forman estructuras especializadas en la transmisión de señales neurales, denominadas **Sinapsis**. Este proceso comienza a ocurrir cuando algunas otras células neurales siguen proliferando. Se lleva a cabo en dos fases:

1. Fase de sobreproducción en la que se forman numerosas sinapsis provisionales
2. Fase en que se eliminan muchas de las que se realizaron inicialmente y se reorganizan las restantes.

Se ha demostrado que las terminales presinápticas (aferentes) son muy importantes para la supervivencia de las neuronas postsinápticas (diana), ya que si se elimina se produce un gran aumento de muerte neuronal en las diana; la magnitud del efecto es diferente dependiendo del periodo en que se eliminen las aferencias.

Después de que se han ajustado las poblaciones neuronales, el SNC experimenta un remodelado durante el periodo postnatal que es fundamental para su funcionamiento, que incluye en primer lugar, una gran eliminación de

sinapsis establecidas previamente (por falta de precisión en la innervación o porque la célula diana recibía un número erróneo de aferentes); y en segundo lugar, una reorganización de los contactos que establecen los terminales que permanecen.

El proceso de remodelación sináptica coincide con el comienzo de la actividad neuronal y se ha comprobado que la actividad sináptica es fundamental para que se mantengan las conexiones neurales ya que las que no se usan o se usan a destiempo se eliminan.

En general, en el encéfalo humano durante los primeros cuatro años después del nacimiento aumenta progresivamente el número de contactos sinápticos en respuesta a la actividad neuronal, y a partir de ese periodo y hasta la pubertad se produce una reorganización sináptica, pero los periodos concretos de remodelación son propios de cada región.

La reorganización sináptica aporta precisión y eficiencia de los contactos sinápticos porque eliminan muchos de los que no se han utilizado, y se preservan solo los que han demostrado su eficiencia en la actividad neural. También reduce su gasto energético general, permitiendo que pueda disponer de más energía para la actividad de los circuitos neurales que son esenciales.

Cuando los axones han terminado su periodo de crecimiento, han emitido sus colaterales y han consolidado sus conexiones comienza el proceso de **mielinización**⁴. Ésta se da desde el periodo prenatal, y se mantiene hasta los 25 años a un ritmo más lento⁵². Ocurre en ciclos, con una secuencia ordenada predeterminada, en dirección caudo-rostral. La mielinización es un proceso fundamental del desarrollo del SNC porque la mielina aumenta la velocidad de conducción de las señales neurales por el axón. Sin embargo, también aporta cierta rigidez a los circuitos neuronales, lo que limita la formación masiva de sinapsis. La mielina contiene una proteína que impide que los axones ramifiquen y establezcan nuevas conexiones⁴.

Sin embargo, el SNC adulto sigue manteniendo su capacidad de producir sinaptogénesis, aunque en niveles bajos, ocurriendo reorganización sináptica. Esta capacidad de cambio en los contactos sinápticos que refleja aprendizajes adquiridos o respuestas a cambios ambientales (como algún traumatismo) se denomina **plasticidad neural**, y aunque es mayor en la infancia, se mantiene durante toda la vida.

De modo general se puede decir que los factores genéticos establecen una organización básica, que dirige el desarrollo del SNC basándose en la superabundancia. En el periodo perinatal y la primera infancia, la interacción con el ambiente interno del organismo y las experiencias que afronta el SNC producirán cambios en la estructura inicial, que serán fundamentales para configurar la organización anatomo-funcional de cada individuo. Su organización madura, no obstante, seguirá conservando su capacidad de cambio durante el resto de la vida, lo que permitirá aprender, recordar o recuperar funciones tras lesiones o accidentes.

1.2. Retraso mental

1.2.1. Descripción del Retraso Mental

El Retraso Mental (RM), considerado en la actualidad también como discapacidad intelectual, es una discapacidad caracterizada por limitaciones significativas en el funcionamiento intelectual (razonamiento, aprendizaje, resolución de problemas) y en la conducta adaptativa, que abarca una serie de habilidades sociales y prácticas cotidianas⁵³. Afecta 1-3% de la población general^{1; 53}. Según la AAIDD se define de la siguiente manera:

“El retraso mental es una capacidad intelectual general significativamente inferior al promedio que se acompaña de limitaciones significativas de la actividad adaptativa propia de por lo menos dos de las siguientes áreas de habilidades: comunicación, cuidado de sí mismo, vida doméstica, habilidades sociales/interpersonales, utilización de recursos comunitarios, autocontrol, habilidades académicas funcionales, trabajo, ocio, salud y seguridad. Su inicio debe ser inferior a los 18 años de edad”⁵⁴

El diagnóstico de RM se realiza mediante el cumplimiento de tres criterios⁵³. El primero se refiere a la *capacidad intelectual general* inferior al promedio. La capacidad intelectual se cuantifica mediante el Coeficiente Intelectual (CI) obtenido por evaluación mediante uno o más test estándar de inteligencia (WISC-R, Terman, K-ABC), administrados individualmente. La capacidad intelectual significativamente por debajo del promedio (CI menor de 70) lo que equivale a puntuar aproximadamente dos desviaciones típicas por debajo de la media (CI=90). Sin embargo, al evaluar un CI hay que tener en cuenta que se produce un error de media de aproximadamente 5 puntos, por lo que se puede diagnosticar a un sujeto con RM cuando su CI está situado entre 70-75 siempre que exista déficit o insuficiencias significativas en su capacidad adaptativa. Por el contrario no se diagnosticaría con RM a un sujeto que obtuviera un CI inferior a 70 que no presentara déficit en su capacidad adaptativa.

El segundo criterio es la *capacidad adaptativa* que se refiere a la eficacia con que los sujetos afrontan las exigencias de la vida cotidiana y cómo cumplen las normas de autonomía personal esperadas para su edad, grupo sociocultural y ubicación comunitaria. Las personas con retraso mental suelen presentar más discapacidades adaptativas cuando tienen un CI bajo. La capacidad adaptativa puede estar influenciada por factores escolares, motivacionales, de personalidad, oportunidades sociales, laborales o enfermedades médicas que

pueden coexistir con el retraso mental. Para medir la capacidad adaptativa se pueden utilizar escalas como la *Vineland Adaptive Behavior Scales*⁵⁵ o la *AAMR Adaptive Behavior Scales*. Al igual que en la evaluación de la capacidad intelectual, debe tenerse en cuenta los factores que pueden limitar el rendimiento del sujeto como su motivación, nivel educativo y sociocultural, discapacidades asociadas, etc.

El tercer criterio establece que el déficit de la capacidad intelectual y adaptativa, tienen que manifestarse durante el periodo de desarrollo *antes de cumplir los 18 años*. Se establece este límite de edad debido a que es considerado como un desorden del neurodesarrollo que se manifiesta como disfunción del SNC^{56; 57}. Si un sujeto llega a la edad adulta después de un desarrollo normal, nunca podrá ser diagnosticado con RM.

La APA (American Psychiatric Association) ha desarrollado un sistema de clasificación diagnóstica basado en el nivel de insuficiencia intelectual.

- RM leve: para referirse a personas con CI entre 50 y 55 y aproximadamente 70
- RM moderado: para CI entre 35-40 y 50-55
- RM grave: para CI entre 20-25 y 35-40
- RM profundo: para CI inferior a 20-25

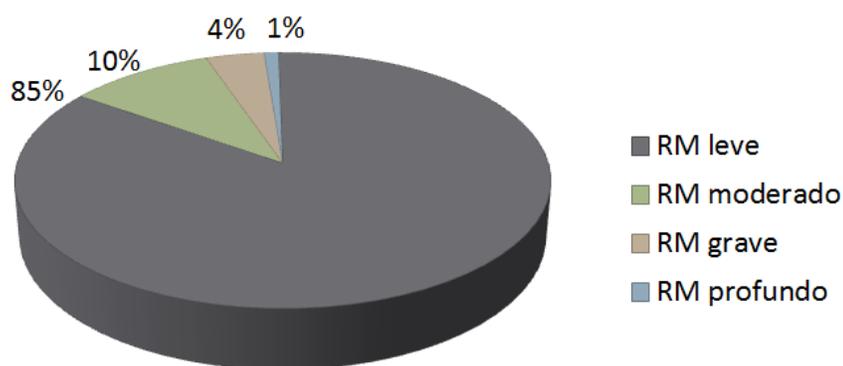


Figura 6. Clasificación del RM y prevalencia. *American Psychiatric Association, 2013.*

El **retraso mental leve** constituye el grupo más numeroso con el 85% de las personas afectadas por esta discapacidad⁵⁸. La mayoría suele desarrollar habilidades sociales y de comunicación durante la etapa de educación infantil (0-6 años) y tienen insuficiencias mínimas en el ámbito sensoriomotor. Con frecuencia no se distinguen de otros niños sin retraso mental hasta edades posteriores. En los últimos años de la adolescencia suelen adquirir los conocimientos académicos propios de un nivel último grado de educación primaria. Comparados con el desarrollo típico de compañeros de la misma edad, los individuos son inmaduros en interacciones sociales. Comunicación, conversación, y el lenguaje son más concretos o inmaduros que lo esperado para su edad. Durante la vida adulta llegan a adquirir habilidades sociales y laborales para una autonomía mínima. Pueden necesitar orientación, supervisión o asistencia en situaciones de estrés social y en materia económica. Pueden vivir en la comunidad satisfactoriamente contando con apoyos adecuados^{53; 58}.

El **retraso mental moderado** está constituido por aproximadamente el 10% de toda la población con retraso mental⁵⁸. A lo largo del desarrollo, las habilidades conceptuales de los individuos quedan notablemente inferiores a las de sus compañeros de la misma edad. En general las personas con este nivel, adquieren habilidades de comunicación durante los primeros años de niñez. Pueden atender su propio cuidado personal y pueden aprender habilidades académicas funcionales si se les presta la atención adecuada, pero es improbable que superen el primer ciclo de la educación primaria. Tiene un buen desarrollo motor y aprenden a desplazarse independientemente por lugares que les son familiares. Durante la adolescencia pueden tener problemas en las relaciones interpersonales por la dificultad de reconocer los convencionalismos sociales. En la edad adulta son capaces de realizar trabajos de baja dificultad con supervisión constante. Se adaptan bien a la vida en comunidad^{53; 58}.

El **retraso mental grave** incluye el 3-4% de la población con RM⁵⁸. Durante los primeros años de la niñez, adquieren un lenguaje escaso o nulo y en la edad escolar pueden aprender a hablar y adquirir habilidades relacionadas con los hábitos de salud, higiene, autoprotección e independencia personal. Apenas pueden aprender materias pre-académicas, aunque pueden llegar a dominar ciertas habilidades como el aprendizaje de la lectura global de algunas palabras imprescindibles para su "supervivencia". En la edad adulta pueden trabajar en

tareas simples con una supervisión estrecha. En su mayoría, salvo que presenten alguna discapacidad asociada, se adaptan bien a la vida en comunidad^{53; 58}.

El **retraso mental profundo** representa aproximadamente el 1-2% del total de las personas con RM⁵⁸. La mayoría presentan una enfermedad neurológica identificada que explica su retraso mental. Durante los primeros años de la niñez presentan graves alteraciones en su desarrollo sensoriomotor. Para alcanzar un desarrollo adecuado, necesitan un ambiente muy estructurado con ayudas y supervisión constante. En los años escolares, con la enseñanza adecuada, pueden mejorar su desarrollo motor, las habilidades de comunicación y el cuidado personal. En la edad adulta pueden realizar tareas simples en centros protegidos y con estrecha supervisión^{53; 58}.

El diagnóstico temprano del retraso mental facilita la intervención precoz y permite la mejor aceptación del niño por parte del medio social. La mayoría de los niños llegan a centros de atención en salud por dismorfías, disfunciones asociadas o que no se hayan cumplido las expectativas propias de su edad. No hay características físicas específicas del retraso mental, pero las dismorfías son los primeros signos que llevan al niño a la consulta pediátrica. Los primeros problemas detectables son la falta de respuesta visual o auditiva, tono muscular o postura inusual y problemas con la alimentación. Entre los 6 y 18 meses de edad, el retraso motor (incapacidad para sentarse, gatear o caminar) es el problema más frecuente. El retraso en el lenguaje y los problemas de conducta son preocupaciones habituales pasados los 18 meses. Es más probable que la detección precoz de un desarrollo anormal suceda cuando hay alteraciones graves, y el retraso mental suele detectarse alrededor los 3 años de edad⁵⁹.

Varios síndromes (como síndrome de Down, síndrome de Rett y otras condiciones bien conocidas) son fácilmente reconocidos debido a su asociación con alteraciones morfológicas específicas (dismorfismos), comportamientos peculiares y múltiples anomalías congénitas. Sin embargo, un porcentaje consistente (50%) de niños con RM no presentan un fenotipo llamativo de un síndrome bien conocido¹.

Diversos factores ambientales, genéticos o demás pueden causar RM. También se cree que factores conductuales o sociales, como la pobreza, la desnutrición,

el consumo de drogas y alcohol por parte de la madre, así como la privación de estímulos pueden contribuir⁵⁸.

Probablemente ninguna otra área ha contribuido tanto a la comprensión del RM como la genética. Sin embargo esta contribución ha traído un laberinto de opciones de diagnóstico. Las etiologías genéticas constituyen la causa más frecuente y es demostrable en más de del 50% de individuos con RM. En estos casos la etiología ha sido atribuida a anomalías cromosómicas numéricas y estructurales^{56; 60}, o bien, a la organización cromosómica⁶¹⁻⁶³ donde se han encontrado alteraciones en prácticamente todos los cromosomas. Estas alteraciones cromosómicas, además de originar el RM, se asocian a otros síntomas clínicos, mayoritariamente a problemas del crecimiento, y a una gama de anomalías menores, como lo son los rasgos dismórficos faciales, y a otras malformaciones estructurales de diferentes sistemas: cardíaco, urogenital y extremidades; al conjunto de estas características se les denomina fenotipo cromosómico^{57; 60}.

Cuando el genoma se analiza mediante la citogenética estándar, se encuentran anomalías en un 40% de los pacientes con RM grave y en 10% de los casos con RM leve. Estas anomalías pueden ser, entre otras, ganancias de cromosomas enteros (trisomía), pérdidas o ganancias de cromosomas parciales o de solo una banda cromosómica (delección o duplicación), así como intercambios de fragmentos de un cromosoma con otro (translocaciones) de forma equilibrada⁶⁰. Las anomalías numéricas y estructurales de los cromosomas son responsables de aproximadamente 4-28% de los casos de RM⁶⁴.

Las causas exógenas (perinatales, exposición a teratógenos, etc) explican un 18.6-44.5% de los RM y las de etiología genética un 17.4-47.1%⁶⁵. De los RM moderados y graves un 8 al 10% serían de etiología ligada al cromosoma X, lo que explicaría en parte la mayor proporción de varones con RM y, de ellos, el más frecuente sería el síndrome de X frágil.

Para el RM leve se estima un 30% de los casos con anomalías cromosómicas o factores ambientales asociados; cuando es moderado a grave, el 30-40% de ellos tienen anomalía cromosómica o monogénica. En aproximadamente la mitad de los casos con retraso grave y hasta en el 70% de casos leves no se tiene un factor etológico identificado⁶⁶.

Es importante resaltar que el RM de etiología multifactorial, por combinación de poligenes situados en diferentes cromosomas y factores medioambientales, es la causa mayoritaria de los RM leves⁶⁷. Algunos investigadores han mencionado como posible causa a las mutaciones de un solo gen, estas pueden llevar a la desregulación epigenética, influyendo en la transcripción o silenciamiento de otros genes¹. Por otro lado, los mecanismos epigenéticos juegan un papel central en el orden de las funciones del cerebro, influyendo en la capacidad para modificar, reorganizar y remodelar la plasticidad celular durante la formación de memoria y aprendizaje. Varios síndromes bien conocidos son causados por mecanismos epigenéticos tales como Rett y X-frágil. En estas y otras condiciones genéticas, así como en RM asociado a condiciones ambientales (por ejemplo, desorden del espectro de alcohol fetal, FASD, o exposición al plomo) se reduce la complejidad dendrítica, y se pueden observar diferencias significativas en el número y tipo de morfología de espinas dendríticas⁶⁸. Otros factores ambientales pueden causar RM, entre estos se encuentran el parto prematuro y las infecciones prenatales⁶⁴.

Con la aparición de técnicas genéticas novedosas, varias aberraciones cromosómicas crípticas nuevas se han descubierto en años recientes⁶⁹, y un número consistente de casos con RM, considerados anteriormente como de causa desconocida, ahora son clasificados como condiciones sindrómicas con fenotipos clínicos reconocibles⁷⁰. Las técnicas de microarreglos de CGH (hibridación genómica comparativa) han revelado aberraciones submicroscópicas, entre los que se encuentran los reordenamientos crípticos, en 5-17% de los pacientes con RM con resultados normales por evaluación citogenética convencional⁷¹⁻⁷³. Las plataformas de mayor densidad, tales como arreglos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), proporcionan un aumento en el diagnóstico de 6% de los casos evaluados⁷⁴.

Varios ejemplos de síndromes identificados por estas técnicas son¹:

- a. Síndromes de microdeleciones; 1p36, 2q23.1, 15q13.3, 16p11.2
- b. Síndromes de deleciones: 2q37, 17q21.31
- c. Síndromes de microduplicaciones: 7q11.3, 22q11.2

En los últimos 15 años se han identificado muchos genes individuales que causan RM, muchos de estos también causan autismo y otros fenotipos

relacionados con el neurodesarrollo, sin embargo, estos no explican el total de casos presentes, ya que aproximadamente el 50% de ellos siguen siendo de causa desconocida por lo tanto son denominados como retraso mental idiopático (RMI). En estos casos, se presupone que pueden ser el resultado de la combinación de factores multigénicos y ambientales¹, por lo que es necesario realizar estudios para buscar cuales son las posibles alteraciones a nivel molecular.

Las alteraciones en el procesamiento, transporte y regulación de RNAs mensajeros (mRNAs) durante el neurodesarrollo se han asociado con el desarrollo de diversas patologías, incluyendo el RM. Dichas alteraciones pueden afectar entre otras cosas al crecimiento y maduración de las conexiones intraneuronales^{58,75; 76}. Por lo tanto, las moléculas relacionadas con la regulación de la expresión de los mRNAs a su vez pueden representar un factor etiológico. Dentro de las moléculas que regulan la expresión de genes se encuentran los microRNAs (miRNAs).

Son muchos los estudios que se han enfocado al análisis del efecto de los miRNAs sobre la expresión de los mRNAs en patologías que cursan con RM. Sin embargo, hasta el momento no había estudios en donde se analizara el papel de los miRNAs en RMI.

1.2.2. Retraso mental y su relación con microRNAs

Los miRNAs son moléculas pequeñas, de aproximadamente 17-25 nucleótidos, y evolutivamente conservadas que forman parte de una clase de RNAs pequeños no codificantes. El primer microRNA descrito fue lin-4 que regula los diferentes estadios del desarrollo de la larva *C. elegans*⁷⁷. Desde entonces un gran número de microRNAs han sido identificados en el genoma de varias especies incluyendo la humana, y el número de microRNAs sigue incrementando debido a los esfuerzos proporcionados por la biología molecular y la predicción bioinformática⁷⁸. Estas moléculas se producen a partir de un transcrito primario (pri-microRNA) y, una vez que se procesan se produce un microRNA maduro (Figura 7), y actúan como potentes silenciadores de la expresión de genes. Debido a que se unen por apareamiento de su secuencia “semilla” (secuencia de 2-8 nucleótidos) a sus RNA mensajeros

blanco, generalmente en la región 3' no traducible, se bloquea la síntesis de proteínas por desestabilización del mRNA y represión traduccional.^{60; 79; 80.}

Varios trabajos independientes predicen que 20-30% de los genes humanos son regulados por microRNAs⁸¹, pero una predicción de blancos basada en algoritmos aumenta esta estimación considerablemente a 74-92%⁸². La capacidad de los microRNAs para influir en complejas redes y vías genéticas básicas del neurodesarrollo, sugiere que su desregulación puede contribuir a la base genética del RM.

Teniendo en cuenta que 70% de los miRNAs se expresan en cerebro⁸³, y que tienen funciones en el desarrollo neurológico, neurotransmisión, plasticidad sináptica y crecimiento de neuritas, seguramente son moléculas que podrían representar un factor etiológico en común de los casos de RM.

Los microRNAs están involucrados en todas las etapas del neurodesarrollo (figura 8) y su importancia se hizo evidente desde que la eliminación de la maquinaria esencial para su procesamiento y maduración, la proteína **Dicer**, que tuvo como consecuencia defectos críticos en la morfología general del SNC como SNP y un deterioro en la diferenciación neuronal en pez cebra⁸⁴. Posteriormente, De Pietri Tonelli y colaboradores evaluaron la ausencia de esta proteína en el neocortex murino durante el desarrollo, y encontraron que el cortex postnatal disminuyó en tamaño debido al incremento de la apoptosis neuronal y un déficit en la estratificación cortical asociado con un deterioro en la diferenciación neuronal, aunque no se observó influencia en procesos como diferenciación temprana, proliferación o progresión del ciclo celular⁸⁵. También se ha visto que la eliminación de Dicer influye negativamente en la sobrevivencia de CMNs corticales de ratón en varias etapas tempranas del desarrollo, además de defectos en el proceso de diferenciación⁸⁶. También la eliminación de **DGCR8**, que participa en el procesamiento del pri-microRNA para pasar a pre-microRNA, tiene consecuencias negativas como anormalidades morfológicas en el SNC y déficits en el aprendizaje dependiente de la memoria espacial en ratones. A nivel celular, se observaron alteraciones en el desarrollo dendrítico con una deficiencia en la complejidad final de la arborización⁸⁷. En modelos animales de Knockout en ratón y *Drosophila melanogaster* del gen **FMR1**, que se relaciona directamente con RM en el síndrome de X-frágil, se ha observado un aberrante desarrollo del sistema

nervioso a nivel sináptico⁸⁸, y se ha propuesto que este efecto es debido a la interacción de este gen con Dicer y con componentes del complejo RISC⁸⁹.

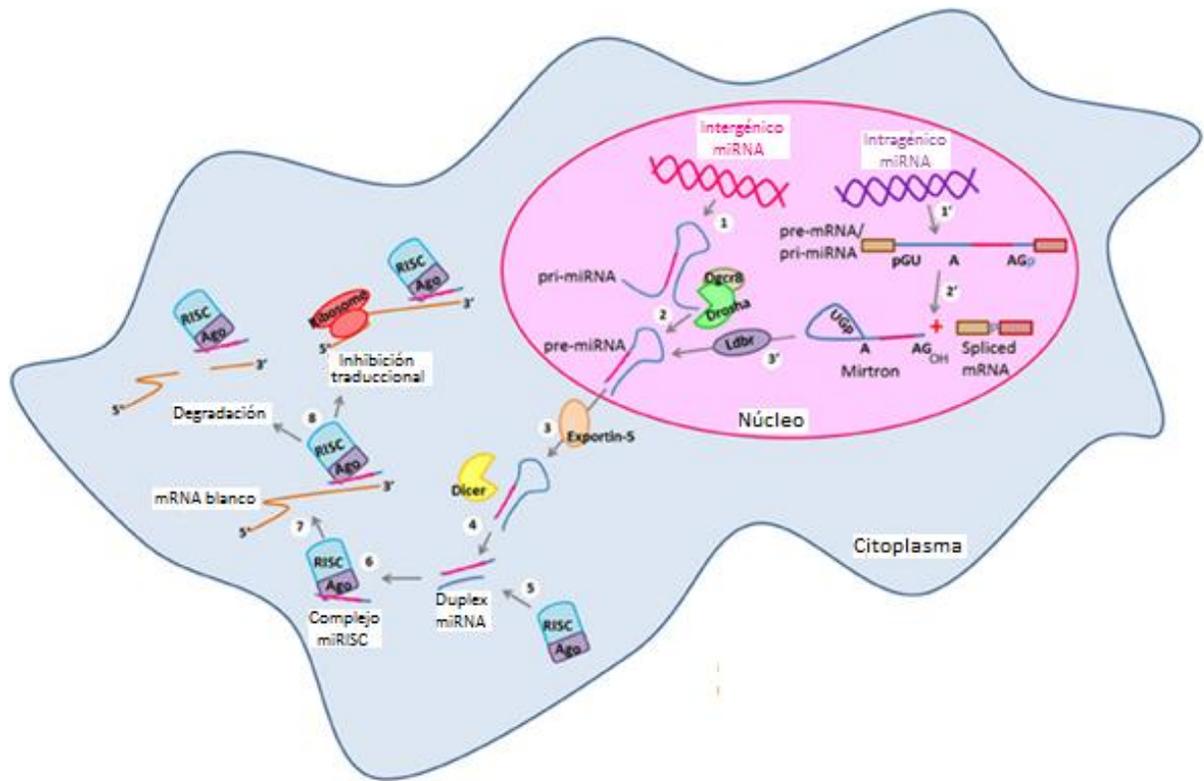


Figura 7. Biogénesis canónica y no canónica de los miRNAs. La biogénesis de miRNAs intergénicos (1) inicia con la transcripción de genes de miRNAs por la RNA polimerasa II para generar transcritos largos conocidos como micro-RNAs primarios (pri-miRNAs) que son procesados (2) por el complejo microprocesador formado por Drosha y DGCR8 en el núcleo y de esta manera es generado el miRNA precursor (pre-miRNA). Por otro lado, los miRNAs intragénicos son (1) transcritos como parte de los mRNAs de sus genes de codificación que son sometidos a splicing y se produce un mirtron que contiene la secuencia madura del miRNA. Después de eso, gracias a la proteína LDBR se genera el pre-miRNA. En este punto ambas vías toman un curso en común en la que (3) los pre-miRNAs son transportados al citosol por exportina-5, y son procesados por la RNasa tipo III Dicer (4). A continuación, se genera un dúplex de miRNA, de los cuales el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) solo recluta a una de las cadenas, el miRNA maduro y se forma el miRISC (6). El miRNA se guía por RISC a su mRNA diana y se une a su extremo 3' UTR por complementariedad de secuencia (7). Por último, el miRNA maduro regula negativamente la expresión de sus genes diana ya sea por la degradación del mRNA o por la inhibición de la traducción (8). Tomada de *Meza-Sosa K, et al. 2014*.

Los problemas en el neurodesarrollo desde la inducción neural pueden llevar a la formación de conexiones sinápticas deficientes o aberrantes. En vertebrados, la proteína morfogénica ósea (BMP) actúa como señal para la adquisición de la epidermis, y la inhibición de la vía de señalización de BMP en el ectodermo confiere la inducción neural⁹⁰. ZEB (factor de transcripción de dedos de zinc y unión a cajas E) es una familia de factores de transcripción que reprime la

expresión de BMP, facilitando la inducción de la placa neural⁹¹. En ese contexto, se han identificado dos familias de miRNAs, **miR-200** y **miR-96**, en la inducción neural de células madre embrionarias humanas. Se ha identificado y comprobado experimentalmente que *ZEB* es blanco de miR-200, y *PAX6* (otro factor de transcripción clave para la especificación del ectodermo humano) es blanco de miR-96⁹². Por otro lado, la familia de **let-7**, que se compone de 8 miembros en humanos, se caracteriza por la regulación negativa que ejerce sobre diferentes genes diana implicados en el control del ciclo celular como la ciclina D1 y el receptor nuclear *TLX* en CMNs⁹³. **miR-124** también es uno de los miRNAs más enriquecidos en el SNC, su expresión inicia durante la transición de CMNs a CPNs⁹⁴, tiene como blanco a *Sox9*, *Scp1*, *Ptbp1* y *Jag1* en ratón, todos estos mRNAs blanco implicados en inducción neural⁹⁵⁻⁹⁸.

Por otro lado, **miR-9** es un microRNA específico de cerebro en roedores, con una expresión importante en precursores neurales. Es uno de los miRNAs con más funciones dentro de las etapas del desarrollo del SNC. Su sobre-expresión en el cerebro murino en desarrollo altera la migración y proliferación de precursores neurales, induciendo una diferenciación prematura⁹⁹. Este miRNA tiene 3 diferentes isoformas miR-9 (1, 2 y 3) en diferentes regiones durante el desarrollo. La sobre-expresión de miR-9-2 en el cortex cerebral induce una prematura diferenciación neural. Los investigadores sugieren que la regulación transcripcional mediada por miR-9-2 y 9-3 involucra la sub-expresión de varios factores de transcripción, tales como *FoxG1*, *Elavl2*, *Gsh2*, *Nr2e1* y *Pax6*, y la utilización de varios mecanismos⁸⁹. En otro estudio se observó que la sobre-expresión de **miR-9** y **miR-124** en fibroblastos humanos resulta en la transformación a un fenotipo neuronal, en conjunto con factores de transcripción neurogénicos, como *NeuroD2*, *ASCL1* o *MYT1L*, con los que se potencia la transformación, pero la sobre-expresión de los factores de transcripción solos no induce el fenotipo neural¹⁰⁰.

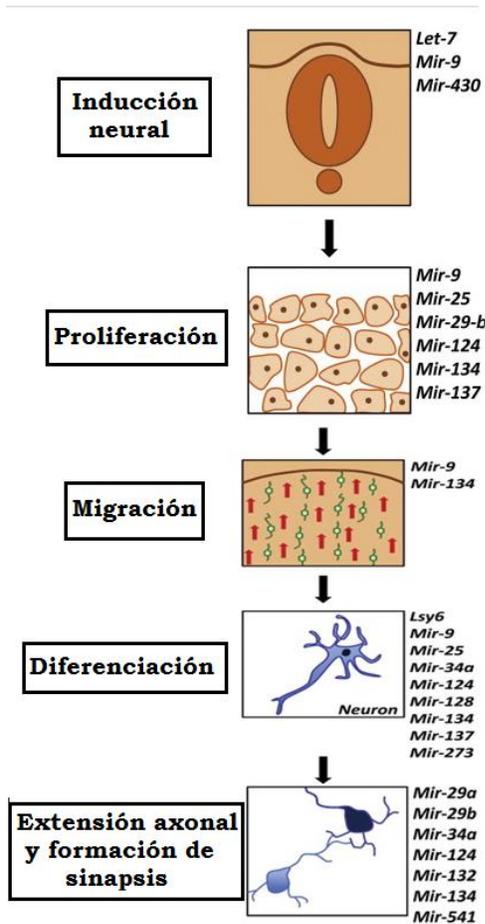


Figura 8. miRNAs destacados en el desarrollo del sistema nervioso central. Tomada y adaptada de Motti, D., et al. 2012.

En cuanto al proceso de proliferación de células madre neurales y células progenitoras neurales, tres miRNAs se han relacionado directamente, **miR-134**, **miR-25** y **miR-137**. El primero pertenece a la familia miR-379-410 y es un potente inductor de la diferenciación de células madre embrionarias¹⁰¹, su expresión aumenta en células embrionarias de ratón tratadas con ácido retinoico, a favor de la diferenciación a linajes ectodérmicos incluyendo células neuronales regulando directamente la expresión de factores de pluripotencia como *NANOG*, *SOX2* y *OCT4* en combinación con miR-296 y miR-470¹⁰². **miR-137** también promueve la proliferación de células madre neurales *in vivo* e *in vitro*¹⁰³. Varios estudios han identificado a *CDC42* y *CDK6* como genes diana directos de miR-137, y su silenciamiento post-transcripcional se asocia con la inducción de la detención del ciclo celular en G1 que resulta en la diferenciación neuronal de las células madre neurales¹⁰⁴. Por otro lado, **miR-25** forma parte del cluster miR-106-24 que se encuentra en el intrón trece del gen codificante

de la proteína Mcm7, miembro de una familia de helicasas de DNA requerido para el proceso de replicación. Se ha visto que la sobre-expresión de **miR-25** promueve la proliferación de las células madre neurales y progenitores neurales en ratones adultos¹⁰⁵. Este efecto puede ser por la regulación directa del inhibidor del ciclo celular p57¹⁰⁶.

Adicionalmente, **miR-9** participa de varios procesos del desarrollo del SNC, incluido el proceso de migración de células neurales. La inhibición de la expresión de este miRNA suprime la proliferación pero promueve la migración de células progenitoras neurales humanas. Se demostró experimentalmente que el blanco clave de miR-9 en este mecanismo produce la proteína histamina, que incrementa la inestabilidad de los microtúbulos¹⁰⁷. Por otro lado, **miR-134** también participa en la migración, reduciéndola *in vitro* e *in vivo* dependiente de Doblecortina (Dcx)¹⁰¹. También los miembros del cluster miR-379-410 (miR-369-3p, miR-496 y miR-543) participan tanto en el control de la proliferación y diferenciación de las células de la glía radial, y la migración de las neuronas corticales por reducir los niveles de N-cadherina en el neocortex en desarrollo¹⁰⁸. Otro cluster que participa en la diferenciación es el miR-106b-25 (incluye miR-106b, miR-93 y miR-25)¹⁰⁵. Este efecto es por su unión a *FOXO3*, un miembro de la familia de factores de transcripción *FOXO*, regulando parte de la vía insulina/IGF-FoxO que tiene importantes implicaciones en la homeostasis del reservorio de células madre neurales durante la vida¹⁰⁵.

En cuanto al proceso de diferenciación específicamente, **miR-128** se ha visto fuertemente expresado en neuronas maduras y es difícilmente detectado en células madre embrionarias, lo que sugiere una participación importante en dicho proceso¹⁰⁹. **miR-9** al inhibir la proliferación de CMNs promueve la diferenciación a través de la regulación del receptor nuclear *TLX*⁹⁹.

Una vez que las neuronas se han diferenciado inicia el proceso de guía axonal para establecer conexiones sinápticas, y ya se han reportado miRNAs implicados en dicho proceso^{110; 111}. Está bien documentado que **miR-9** regula la guía de axones en el tracto talamocortical y el corticofugal¹¹². Presuntivamente es debido a la regulación sobre *islet-1* y *Meis2* (blancos predichos para miR-9) que se sobre-expresan cuando miR-9 se encuentra ausente. El mecanismo implicado aún no está claro¹¹². Baudet y colaboradores encontraron que **miR-124** afecta las proyecciones axonales de RGCs (células ganglionares de la retina, usadas como modelo para estudiar la navegación axonal) de *Xenopus laevis* y

propusieron que regula la repulsión por Sema3A. miR-124 indirectamente promueve la expresión de Neuropilina-1, un receptor de Sema3A, en el cono de crecimiento¹¹³. *lin-4* ejerciendo su función de represión post-transcripcional sobre el factor de transcripción LIN-14 elimina por completo la sensibilidad del cono de crecimiento a Netrina¹¹⁴.

miR-134 también se ha relacionado con el desarrollo de los espinas dendríticas¹¹⁵. Este miRNA se localizó en el compartimento sinapto-dendrítico de neuronas hipocampales de rata y se observó que regula negativamente el tamaño de las espinas dendríticas en la transmisión sináptica excitatoria. Este efecto es mediado por la inhibición de la traducción de Limk1, una proteína cinasa que controla el desarrollo de las espinas dendríticas.

Existen algunos miRNAs característicos que se han identificado en síndromes relacionados al neurodesarrollo y retraso mental¹¹⁶. En el síndrome de Williams, que tiene un perfil neurocognitivo que incluye retraso mental, se identificaron catorce miRNAs con expresión diferencial, y tres sin expresión en pacientes (let-7f-2*, let-7g* y miR-206). De los miRNAs con expresión diferencial destacan miR-125b, let-7c y miR-200c, que se encuentran sobre-expresados y tienen relación con el proceso de diferenciación neural¹¹⁷. El primero, se ha asociado con el desarrollo y regulación del crecimiento de extensiones neurales, se ha asociado también con síndrome de Down y síndrome de X-frágil, ambos tienen como característica en común el retraso mental. miR-132 ha sido identificado como característico del síndrome de X-frágil, asociado a la proteína Fmrp, afectando la morfología neuronal y afectando la fuerza sináptica¹¹⁸. También miR-19b, miR-302b* y miR-323-3p se han asociado a este síndrome por represión de la expresión de la proteína Fmr1¹¹⁹.

En síndrome de Down, causado por una trisomía del cromosoma 21, se han implicado 5 miRNAs hasta el momento (miR-155, miR-802, miR-125, let-7c y miR-99a)¹²⁰. Todos estos miRNAs provienen del cromosoma 21, lo que causa su sobre-expresión y puede contribuir al desarrollo neurológico defectuoso de individuos con este síndrome. Se ha demostrado experimentalmente que *MeCP2*, *CFH* y *PICALM* son blanco de miR-155¹²¹, *TLP7* de let-7c, *TGF-B* de miR-99a¹²² y *MeCP2* también es blanco de miR-802.

1.3. Neuroepitelio olfatorio como modelo experimental

Uno de los dogmas fundamentales mantenido en las neurociencias hasta el siglo pasado sostenía que la regeneración del sistema nervioso no puede ocurrir en etapas de la vida adulta. Sin embargo, a partir de los trabajos de Joseph Altman en la década de los sesenta utilizando técnicas para marcar células en división, se demostró claramente que la neurogénesis no se limita al desarrollo embrionario y que continua en regiones específicas con una tasa elevada en la vida adulta¹²³. En la actualidad esas regiones son consideradas como “nichos neurogénicos” y se conocen tres: la zona subventricular (ZSV) del ventrículo lateral, la zona subgranular (ZSG) del giro de dentado del hipocampo y el Neuroepitelio olfatorio (NEO)¹²⁴. Estos nichos neurogénicos poseen características anatómicas e histológicas que son esenciales, tanto para el mantenimiento como para la regulación de la neurogénesis. Entre estas cabe destacar el hecho de que las CPNs estén próximas a los capilares y los astrocitos, los que les proporciona características especiales que permiten la generación de nuevas células¹²⁵. Los capilares sanguíneos aportan un soporte nutritivo y metabólico, por lo que se cree que existe una estrecha relación entre la regulación de los procesos de neurogénesis y de angiogénesis¹²⁶. Por otro lado, los astrocitos cumplen un papel esencial para la formación del nicho neurogénico, de modo que se ha comprobado que son capaces de controlar múltiples pasos de la neurogénesis adulta¹²⁷

La zona ventricular (SVZ) y la capa subgranular (ZSG) del giro dentado de hipocampo son las áreas que poseen actividad neurogénica en el cerebro adulto¹²⁸. La primera representa un remanente del neuroepitelio germinal embrionario, que persiste a través de la vida como una capa mitótica activa en la pared del ventrículo lateral telencefálico y a lo largo de la extensión rostral hacia el bulbo olfatorio; estas nuevas neuronas generadas migran a través de la vía rostral migratoria hacia el bulbo olfatorio, donde se diferencian a dos tipos de interneuronas: las células granulares y las células periglomerulares. Un cambio completo de población de células progenitoras neurales se produce cada 12 a 28 días en la SVZ¹²⁸. Por otro lado, las CPNs producidas en la ZSG dan origen a células gliales y neuronas en la capa granular del giro dentado. Las células troncales de esta zona son un tipo específico de astrocitos denominados astrocitos radiales, y darán origen a los primeros precursores intermedios, que a su vez, originan las nuevas neuronas granulares. Contrariamente a lo que

sucede con las neuronas generadas en la ZSV, las nuevas neuronas de la ZSG se desplazan en distancias cortas dentro de la capa de células granulares¹²⁸.

Después del conocimiento de estas dos regiones, se encontró el tercer nicho neurogénico, el neuroepitelio olfatorio (NEO), es la placa más superficial de la mucosa olfatoria¹²⁹⁻¹³¹. Se caracteriza por generar neuronas activamente a lo largo de la edad adulta, en una tasa que excede con mucho la neurogénesis de la ZSV y la de la ZSG del giro dentado¹²⁹. Está situado en la cavidad nasal en la placa cribiforme, y en las regiones media y superior del cornete. Es un epitelio sencillo pseudoestratificado que consta principalmente de neuronas sensoriales olfatorias, células sustentaculares apicales, glándulas de secreción mucosa especializadas (“glándulas de Bowman”), células de microvillosas y CMNs¹³². Las células basales horizontales (CBHs) y células globosas basales (CGBs) son consideradas como CMNs en el compartimento basal de del epitelio olfatorio^{132; 133}. En condiciones definidas, CBHs pueden generar múltiples células de linaje neural y glial *in vitro*¹³³. Las células CGBs están situadas en el epitelio olfatorio basal entre las CBHs y las neuronas sensoriales olfatoria inmaduras¹³⁴ (Figura 9).

Por mucho tiempo se había propuesto solo la plácoda olfatoria como fuente de las CPNs del epitelio olfatorio. Se sabe que esta estructura embrionaria derivada del ectodermo da origen a todas las células del epitelio olfatorio junto con las células de la cresta neural craneal. La plácoda olfatoria produce neuronas sensoriales olfatorias y células de soporte del epitelio olfatorio, mientras que las células de la cresta neural producen elementos estructurales de la nariz¹³⁵. La plácoda olfatoria ha sido descrita como una de las plácodas más versátiles, siendo única en su capacidad para originar células gliales y CPNs capaces de generar todo tipo de células diferenciadas del NEO a lo largo de la vida. Sin embargo, recientemente se reportó que las CPNs tienen un origen dual, tanto de la plácoda olfatoria como de las células de la cresta neural.¹³⁵

En la mayoría de los trabajos donde se usan CPNs de epitelio olfatorio, las muestras son obtenidas por biopsias post mortem o bajo anestesia en humanos. Sin embargo, Benítez King y colaboradores recientemente reportaron que las CPNs del NEO se pueden obtener también por un método semi-invasivo gracias a su accesibilidad desde su localización en la cavidad nasal. Este método consiste en la exfoliación de la zona media y superior del

cornete nasal, y debido a su capacidad de regeneración, se permite la toma de muestra sin daño duradero en el individuo¹³⁶. Jiménez-Vaca y colaboradores, mostraron que las células extraídas por este método, al ponerse en un medio selectivo que incluya factores mitogénicos como EGF y FGF, generan colonias esféricas de células altamente proliferativas que contienen proporciones variables de CPNs denominadas **neuroesferas**¹³⁶⁻¹³⁸. Estas células se pueden mantener por semanas con características de CPNs, demostrado por seguir siendo positivas para marcadores como Nestina, Musashi, Sox2 y GFAP y β -TubulinaIII. Las neuroesferas también conservan su capacidad de sufrir procesos propios de las etapas iniciales del neurodesarrollo, como la neuritogénesis, induciendo la diferenciación en un cultivo sin factores de crecimiento¹³⁸.

En estudios de enfermedades como síndrome de X-frágil, síndrome de Rett, Alzheimer y esquizofrenia se han observado que las neuroesferas derivadas del NEO presentan alteraciones específicas de la enfermedad^{136; 139; 140}, e incluso ya se ha propuesto como método para el diagnóstico definitivo de enfermedades como Alzheimer¹⁴¹.

Debido que los precursores neurales del NEO conservan su capacidad de proliferar, y que poseen la información genética y epigenética necesaria para generar células neurales, representan un modelo ideal para conocer ciertos aspectos del neurodesarrollo humano tanto en condiciones normales como patológicas, como el RM.

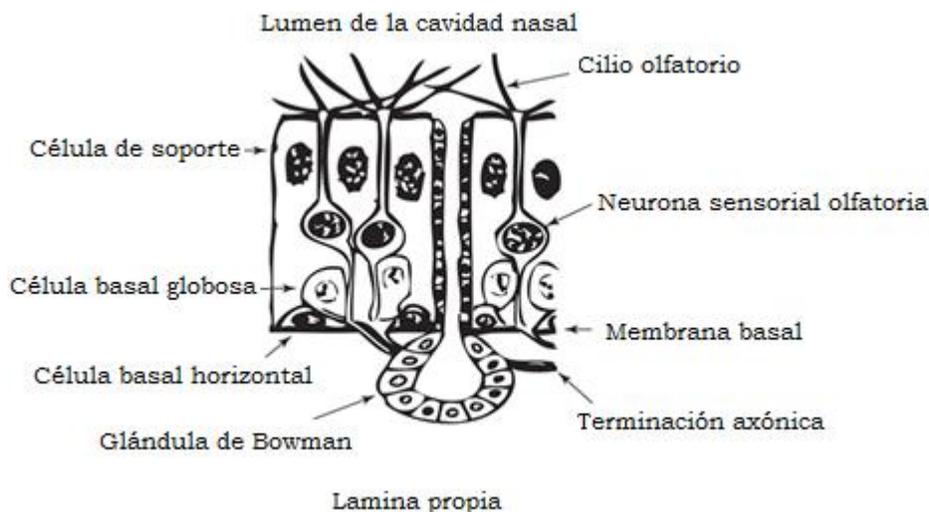


Figura 9. Epitelio olfatorio. La mucosa olfativa está dividida en epitelio y lámina propia, separadas por una membrana basal. Las neuronas sensoriales en el epitelio envían una dendrita a la superficie apical donde sus cilios se extienden hacia el moco alineando el lumen de la cavidad nasal. Los axones sensoriales entran en la lámina propia, donde se reúnen en conjunto rodeadas de células olfatorias. Las glándulas de Bowman son glándulas especializadas de la mucosa olfativa situadas en la lámina propia. La mayor parte de la superficie luminal está compuesta por células de soporte, cubiertas por microvellosidades, cuyos extremos se extienden a la membrana basal. Las células basales horizontales, las células madre neurales, se encuentran adyacentes a la membrana basal. Las células globosas basales, un precursor multipotente, migran fuera de la membrana basal y da lugar a la neurona sensorial. Tomado y modificado de *Mackay-Sim, A., 2010.*

1.3.1. Células Progenitoras Neurales (CPNs)

Las células madre o “stem” neurales (CMNs) se definen como células con capacidad de autorrenovarse indefinidamente (aunque en sentido absoluto no pueda ser probado) y multipotentes, con el potencial de diferenciarse a fenotipos celulares maduros, neuronas y dos tipos de células gliales, astrocitos y oligodendrocitos¹³⁴. A diferencia de éstas, las células progenitoras neurales (CPNs) tienen la capacidad de autorrenovación y expansión más limitada, y tienen potencialidad para diferenciarse a pocos tipos neurales, a veces unipotentes (Tabla 1)¹⁴². El estado que permite a las NCS en los tejidos adultos mantener el potencial de autorrenovarse constantemente, aunque no sean células proliferativas *in vivo*, es en cierto modo un estado de “resistencia” a progresar a células diferenciadas¹⁴². Además de sus características intrínsecas, serían las características del nicho en el que residen, las que hacen a las células madre mantener accesibilidad transcripcional a una batería de genes; ello permite a las NCS retener su potencialidad de generar progenie con características diferenciadas¹⁴³. En el proceso de diferenciación progresiva hay

una reprogramación de múltiples genes que se reprimen, en tanto que muchos otros se activan¹⁴².

Entre las NCS y CPN hay solapamiento de expresión de genes, como ocurre con la nestina (proteína del filamento que se ha identificado por ser un marcador de células “stem” del SNC)¹⁴⁴, pero pueden ser distinguidos por la diferente señalización en la ruta de Notch (ruta de señalización durante la diferenciación celular) y, como se ha mencionado, por algunas características funcionales¹⁴² (Tabla 1). Los marcadores universales de células consideradas como CMNs incluyen un número de factores de transcripción miembros de las familias de genes *SOX*, *PAX*, *HES* y *FABP*, que a su vez son miembros de las vías de señalización Notch y Wnt, proteínas de unión a RNA como Musashi1 y Musashi2, la proteína de filamentos intermedios Nestina y otros. La expresión de la mayoría de estos marcadores es activada durante las fases iniciales de la inducción neural y mantienen las poblaciones celulares como células madre/progenitoras a lo largo del desarrollo¹⁴⁵. Por otra parte, las poblaciones de células que tienen la capacidad de proliferar en el SNC adulto comparte la expresión de varios de estos marcadores universales, incluyendo Nestina, Notch1, Sox1-3, y Musashi, elevando la posibilidad de que las moléculas involucradas en la consolidación del destino neural durante la inducción primaria neural también juega un papel importante en la neurogénesis adulta¹⁴⁶.

Tabla 1. Resumen de las características funcionales que distinguen a las CMNs de las CPNs.
Tomada de *Real Academia Nacional de Farmacia, 2009*.

Característica	Células Madre Neurales	Células Progenitoras Neurales
Autorrenovación <i>in vivo</i>	Ilimitada: durante toda la vida del organismo	Limitada; transitoria
Autorrenovación <i>in vitro</i>	Ilimitada; máximo número de duplicaciones	No llega al número máximo de duplicaciones celulares antes de transformarse.
Potencialidad	Multipotentes para generar neuronas, astrocitos y oligodendrocitos	Generalmente bi o unipotentes
Mantenimiento de la Autorrenovación y la Multipotencialidad	Sí	No

2. ANTECEDENTES

A pesar de todos los estudios realizados hasta la fecha para tratar de explicar la etiología del retraso mental, un gran porcentaje de casos sigue siendo de causas desconocidas (aproximadamente un 50%), por lo que es necesario encontrar alteraciones que tengan en común estos pacientes a nivel molecular. Dentro de los factores biológicos que se relacionan con el RM están las alteraciones en el procesamiento, transporte y regulación de RNAs mensajeros (mRNAs) durante el neurodesarrollo. Dichas alteraciones pueden afectar entre otras cosas al crecimiento y maduración de las conexiones intraneuronales^{58,75; 76}. Por lo tanto, las moléculas relacionadas con la regulación de los mRNAs a su vez pueden representar un factor etiológico. Dentro de las moléculas que regulan la expresión de genes se encuentran los microRNAs (miRNAs).

Por otro lado, los cultivos de células progenitoras neurales (CPNs) representan un modelo ideal para conocer aspectos del neurodesarrollo en condiciones normales y patológicas, y un nicho accesible para su obtención es el neuroepitelio olfatorio (NEO). En nuestro grupo de trabajo se obtuvieron muestras de CNPs de NEO de pacientes con retraso mental idiopático (RMI) y se mantuvieron en cultivos en suspensión en forma de neuroesferas (Figura 10). Se realizó su caracterización por medio de inmunofluorescencia con marcadores para células madre/progenitoras neurales entre ellos, Nestina (una clase de proteínas de filamentos intermedios que se expresa en CMNs pero no en células maduras del SNC), SOX2 (factor de transcripción expresado en células inmaduras e indiferenciadas del epitelio neural de todo el SNC), B-Tubulina III (se ha sugerido como uno de los primeros marcadores para indicar el compromiso neural en neuroepitelio primitivo) y Musashi 1 (proteína de unión a RNA altamente expresada en células progenitoras neurales multipotentes y disminuye durante la diferenciación) (Figura 11). A partir de estos cultivos celulares se determinó el perfil de expresión de microRNAs, indicando que 20 microRNAs presentan un cambio significativo en su expresión (Tabla 2), donde miR-25 presentó el valor de expresión más alto, estando 140 veces más expresado en comparación con los controles.



Figura 10. Neuroesferas observadas en microscopio convencional

miR-25 forma parte del clúster miR-106~25, que incluye a miR-106b, miR-93 y miR-25. Los tres miembros del clúster surgen a partir del intrón número 13 del gen MCM7, gen que juega un papel fundamental en la transición de la fase G1/S del ciclo celular, orquestando el correcto montaje de las horquillas de replicación de ADN cromosómico y asegurando que todo el cromosoma se replique una vez y no más en cada ciclo celular. Petrocca y colaboradores encontraron que el cluster se activa por E2F1 y se encuentra sobre-expresado en adenocarcinomas humanos, altera la respuesta de células de cáncer gástrico a TGF- β por interferir con la síntesis de p21 y BIM, lo que afecta tanto la detención del ciclo celular como la apoptosis¹⁴⁷.

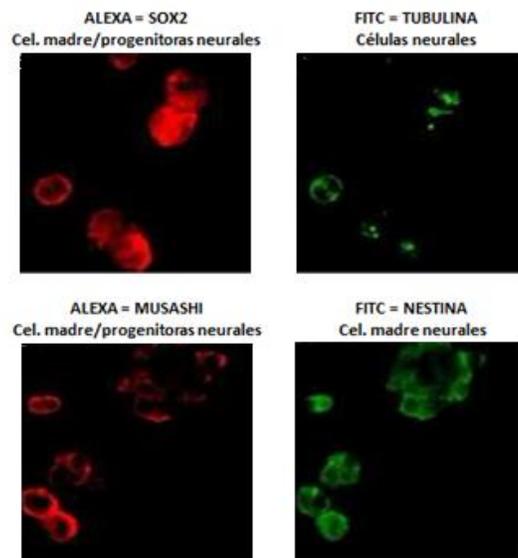


Figura 11. Inmunofluorescencias de neuroesferas con marcadores para células madre/progenitoras neurales.

Dentro del neurodesarrollo, miR-25 se encuentra asociado a los procesos de proliferación y diferenciación de células madre/progenitoras neurales⁸⁹. Se ha visto que en cultivos primarios de células madre/progenitoras neurales de ratones adultos, el clúster miR-106~25 promueve su proliferación, y su sobre-expresión en estas células induce la diferenciación, dirigiéndola principalmente hacia el linaje neuronal. Este efecto puede ser por la regulación directa de FoxO3, proteína importante para la auto-renovación de CMNs, proliferación y diferenciación¹⁰⁵, o de p57¹⁴⁸.

Tabla 2. microRNAs sobre-expresados significativamente en pacientes con RMI

MicroRNA	Expresión Relativa (método $2^{-\Delta\Delta CT}$)	Valor P
hsa-miR-135a*	4.1224	0.0427
hsa-miR-31	11.8506	0.0021
hsa-miR-29a	12.6953	0.0496
hsa-miR-24	12.7907	0.0232
hsa-miR-28-3p	12.8147	0.033
hsa-miR-597	13.6504	0.0104
hsa-let-7d	16.504	0.0479
hsa-miR-324-5p	16.5526	0.0305
hsa-miR-138-1*	19.3793	0.0019
hsa-miR-17	33.4562	0.0439
hsa-miR-27b	36.0434	0.0055
hsa-miR-93	39.4052	0.0303
hsa-miR-19b	39.7081	0.037
hsa-miR-27a	52.7797	0.0035
hsa-miR-30c	57.4483	0.019
hsa-miR-9	57.7667	0.0239
hsa-miR-32	66.4765	0.0365
hsa-let-7c	71.6983	0.0383
hsa-miR-15b	72.1725	0.0402
hsa-miR-25	140.393	0.0378

En base a lo anterior, resulta de suma importancia realizar un estudio en el cual se analicen las modificaciones en la expresión de los mRNAs blanco de miR-25 a fin de realizar la correlación entre ambos y definir el posible efecto de estas variaciones en el retraso mental idiopático.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido determinar el perfil de expresión de los mRNAs blanco de miR-25, y analizar sus alteraciones en células progenitoras neurales derivadas de neuroepitelio olfatorio de pacientes con retraso mental idiopático.

Para lograrlo se cumplieron los siguientes objetivos específicos:

- Obtener el perfil de expresión de mRNAs de células progenitoras neurales derivadas del neuroepitelio olfatorio de controles y pacientes con retraso mental idiopático.
- Analizar y correlacionar las alteraciones en el perfil de expresión de los controles y de los pacientes con retraso mental idiopático para seleccionar aquellos que presenten variaciones significativas.
- Validar las variaciones en la expresión del mRNA seleccionado mediante ensayos de PCR en tiempo real.
- Validar la correlación expresión específica entre miR-25 y el mRNA seleccionado mediante ensayos funcionales de sobre-expresión.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Pacientes

Individuos diagnosticados con retraso mental idiopático por la unidad médica de genética del hospital de pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI según el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).

Criterios de inclusión

- Tener entre 6 y 15 años de edad
- Haber obtenido un puntaje menor de 70 en las pruebas de coeficiente intelectual (test de inteligencia de Wechsler).
- Que los padres o tutores firmen la carta de consentimiento informado para participar en el estudio.
- Que el cultivo de CPNs haya sido suficiente para los ensayos

4.1.2. Controles

Criterios de inclusión

- Individuos sanos de entre 6 y 15 años de edad
- Haber obtenido un puntaje mayor de 70 en las pruebas de coeficiente intelectual (test de inteligencia de Wechsler)
- Que los padres o tutores firmen la carta de consentimiento informado para participar en el estudio.
- Que el cultivo de CPNs haya sido suficiente para los ensayos

4.1.3. Muestra Neuroepitelio Olfatorio

Se obtuvo muestra de Neuroepitelio Olfatorio por exfoliación de la región lateral anterior media del cornete nasal según método reportado por Benitez-King¹³⁶ de 8 pacientes diagnosticados con Retraso Mental Idiopático y 8 controles sanos.

4.2. Métodos

4.2.1. Cultivo de Células Progenitoras Neurales (CPNs)

Las células obtenidas por el exfoliado nasal fueron colocadas en un medio DMEMF/12 suplementado con 30% de Glucosa, 0.1% de 1,4-Diaminobutane dihydro-chloride, 1X de Progesterona, 1.0M HEPES Buffer, 1% de suplemento B27, 0.5 mg de Factor de Crecimiento de Fibroblastos, 0.5mg de Factor de Crecimiento Epidermal, 0.1mg de Insulin-Transferrin-Suplemento de Selenito de Sodio y 25 mg de Heparina) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. A las neuroesferas obtenidas se les hizo cambio de medio cada tercer día y se cultivaron por dos semanas.

4.2.2. Extracción de RNA

La obtención del RNA total se realizó a partir de 2.0×10^6 células y mediante el método de Trizol. Al tubo se le agregaron 500µl de Trizol, se agitó y se incubó por 5 minutos. Se agregaron 200µl de cloroformo y se incubó por 5 minutos. Se centrifugó a 12000 xg por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa y se agregaron 500µl de isopropanol, se incubó por 10 minutos y se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con 1ml de etanol al 75%, centrifugando a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. La pastilla se reconstituyó en 40µl de agua DEPC.

Una vez obtenido el RNA se cuantificó y se determinó su pureza por medio de espectrómetro (nanodrop), realizando la lectura de absorbancia de 260nm y 280nm.

4.2.3. Obtención del perfil de expresión de mRNAs

El perfil de expresión se obtuvo mediante microarreglos de expresión usando el GeneChip® Human Genome U133A 2.0 Array de Affymetrix. Pertenecen a la generación de chips 3'IVT (In Vitro Transcription), designados con este nombre porque el ensayo empleado en el marcaje de la muestra previo a su hibridación en el chip, se basa en la transcripción *in vitro* que utiliza un cebador que aparea con la cola Poly-A, ubicada en el extremo 3'UTR del mRNA. Este ensayo proporciona finalmente un cRNA con orientación antisentido (secuencia complementaria al mRNA). La cadena de 25 nucleótidos sintetizada *in situ* (probe) posteriormente serán hibridados con diversos fragmentos de cDNA marcados. Es posible analizar el nivel de expresión de 18 400 transcritos y sus variantes, incluyendo 14 500 genes humanos bien caracterizados, utilizando para ello más de 28 867 grupos de sondas y 500 000 oligonucleótidos distintos.

La preparación, marcaje, hibridación del RNA, lavados, revelado y escaneado de la señal se realizó según las especificaciones del fabricante. Para cada muestra se marcaron 2 µg de RNA con biotina-dUTP mediante el kit de marcaje en un ciclo de Affymetrix. El cRNA biotinilado se hibridó en el chip. Las imágenes crudas fueron capturadas y el procesamiento de los resultados se realizó utilizando el software Expression Console®, los datos de los microarreglos fueron normalizados y se procedió a la detección de los genes diferencialmente expresados mediante el uso de diferentes paquetes contenidos en el programa Bioconductor de R (análisis secundario). Los genes que presentaron expresión diferencial fueron filtrados de acuerdo con valores $p \leq 0.05$.

4.2.4. Selección de genes con expresión diferencial

La selección de genes diferencialmente expresados se hizo tomando en cuenta tanto el valor de p ($p \leq 0.05$, para la significancia estadística) y el *fold-change* que se define como un cociente entre el nivel de expresión de una muestra objeto, respecto al valor de expresión en una muestra tomada como referencia (numero de veces en que se incrementa o disminuye la expresión). Con respecto al valor de fold change solo se tomaron en cuenta genes que tuvieran valores mayores de 0.26 o menores a -0.26, para los genes sobre y sub-

expresados respectivamente con respecto a los controles, esto con el fin de que dicha expresión se pueda validar por qRT-PCR.

4.2.5. Selección de genes por función en el SNC y neurodesarrollo

Se realizó la búsqueda de alguna relación de los genes con expresión diferencial y alguna función en el SNC mediante el empleo de la base de datos DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) que permite realizar la anotación, clasificación y agrupación funcional de cada gen, además de determinar las rutas de señalización y regulación en las que están involucrados.

4.2.6. Predicción *in silico* de genes diana de miR-25

Para identificar si alguno de estos genes es blanco de miR-25, se hizo la búsqueda de un posible alineamiento *in silico* de la secuencia de cada uno de los genes con la del miRNA maduro en la página www.microrna.org. Esta herramienta bioinformática nos permite ver el alineamiento de la region 3' UTR de los genes con los microRNAs que pudieran alinear y el número de nucleótidos con los que alinea. Así mismo, se realizó el alineamiento de cada uno de estos genes con los demás microRNAs que habían mostrado cambios en su expresión para hacer una correlación completa *in silico* de los miRNAs sobre-expresados con los mRNAs sub-expresados, aunque en este proyecto, solo se validó experimentalmente la correlación de miR-25 con un mRNA blanco. Se seleccionó el gen blanco que alinee con más nucleótidos y en mayor número de veces con miR-25 a lo largo de su region 3' UTR.

4.2.7. Validación de la expresión de ROBO2

Para corroborar los datos de expresión del microarreglo del gen diana seleccionado como blanco de miR-25 (*ROBO2*) se hizo la validación por qRT-PCR con sondas TaqMan® para las muestras de RNA de los 8 pacientes y 8 controles utilizados en el microarreglo.

La síntesis del cDNA se realizó en dos pasos. En el primer paso, se incubó a

65°C durante 5 min, 2 µg de muestra, 250ng de random primers, 1 µL 10mM dNTPs mix y agua libre de RNasa para completar tras la adición de todos los reactivos un volumen total de reacción de 12 µL. Posteriormente la solución se enfrió en hielo. En el segundo paso se incubó la solución anterior a 37°C por 2 minutos después de agregar 4µL del buffer 5X , 2µL 0.1M de DTT y 1µL de RNasaOUT™ Inhibidor de Ribonucleasa recombinante (40 unidades/µL). Se agrega 1µL de la enzima M-MLV RT (200 unidades/µL Invitrogen) y se incubó a 25°C por 10 minutos. Se incubó a 37°C por 50 minutos. Las muestras de retrotranscripción se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Para la qPCR en tiempo real, se utilizó el modelo StepOne™ Real Time System de Applied Biosystems con el software correspondiente y los ensayos de expresión de la misma compañía, que vienen previamente validados, optimizados y de los que existen para prácticamente la totalidad de los genes humanos. Las reacciones se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante. Cada reacción (20 µL) contenía 10 µL TaqMan Universal PCR Master Mix NoAmpErase® UNG (2x), 1 µL TaqMan Gene Expresión Assay Mix (20x), 8 µL de agua libre de RNasas y 1 µL de la muestra de retrotranscripción diluida diez veces. Para cada ensayo se realizó un control negativo con agua libre de RNasas, y se utilizó la subunidad RPB1 de la ARN polimerasa II (*POLR2A*) como control endógeno. La cuantificación de la expresión relativa de los genes se llevó a cabo por el método de la segunda derivada $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los IDs de los ensayos de expresión génica TaqMan® para los genes de interés se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. IDs de los ensayos de expresión génica TaqMan® utilizados

ID	Gen	Símbolo oficial
Hs00326067_m1	Roundabout, receptor de guía axonal, homólogo 2 (<i>Drosophila</i>)	ROBO2
Hs00172187_m1	Polimerasa (RNA) II (DNA directed) polipéptido A	POLR2A

4.2.8. Ensayo de sobre-expresión de miR-25

Para estos ensayos se utilizó la línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano, ya que se sabe que el pulmón es el segundo órgano, después del cerebro, con alta expresión de ROBO2 según el Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/genes>). Por otro lado, también expresa miR-25 pero en niveles bajos (basales) (www.microrna.org).

- Plásmido

Se utilizó el vector pCMV-MIR de citomegalovirus para sobre-expresar a miR-25 que tiene insertada la secuencia del pri-miR25 (84 nucleótidos) más una secuencia de 280 nucleótidos de cada lado flanqueándola en el sitio donde se insertó (entre el sitio SgfI y MluI) (Figura 12). De esta manera, la secuencia insertada en total se compone de 643 nucleótidos. Para fines de este trabajo, este plásmido se denominará **CMV-MIR25**, y su vector vacío se denominará únicamente **CMV**.

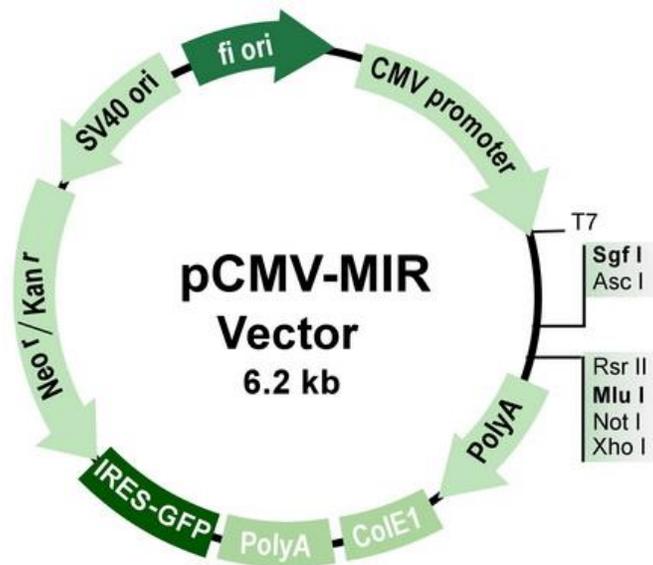


Figura 12. Vector pCMV-MIR (Origene®). Se muestran los diferentes sitios de clonación. La secuencia del pri-miR25 se localiza entre el sitio SgfI y MluI.

4.2.9. Obtencion del plásmido

- Cultivo y almacenamiento de bacterias *E. coli*

Las bacterias utilizadas para la amplificación y purificación de los DNA plasmídicos utilizados en este trabajo fueron *E. coli* de la cepa JM109. El cultivo de estas bacterias se realizó en medio Luria-Broth (LB). Las bacterias se crecieron en matraces de vidrio a 37°C con agitación constante a 225 rpm. El antibiótico Kanamicina se adiciono al medio LB a una concentración de 50µg/mL. El medio se esterilizó mediante calor húmedo a una temperatura de 121°C y a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada durante 20 minutos, posteriormente se adicionó la kanamicina. Una vez obtenidas las colonias, las cajas con agar sólido se mantuvieron a 4°C para su almacenamiento.

- Preparación de bacterias competentes

Para la preparacion de células competentes se utilizó el método de Cloruro de Rubidio. Se inocularon bacterias JM109 en 4 mL de medio LB sin ampicilina. Se incubaron toda la noche en agitacion constantes de 225rpm a 37°C. De 200microl de cultivo líquido se resiembran en 20mL de medio LB sin ampicilina hasta una densidad óptica de 0.4-0.6 a 630nm. Se centrifuga a 3000rpm por 15 min a 4°C y se elimina el sobrenadante. La pastilla se resuspende en 10 mL de buffer de transformación 1 (TFB1, Tabla 4) frío. Se incuba en hielo por 20 minutos y se centrifuga a 8000rpm por 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. El pellet se resuspende en 2.5 mL de buffer de trasformación 2 (TFB2, Tabla 5) y se incuba en hielo por 20 minutos. Alicuotar en tubos fríos y marcados de 0.6 mL 100 µL de las bacterias competentes y almacenar a -70°C.

Tabla 4. Buffer de transformación 1

TFB1 (pH 5.8)	
Reactivo	Concentración
Acetato de potasio	30mM
Cloruro de Rubidio	100mM
Cloruro de Calcio	10mM
Cloruro de Manganeso	50mM
Glicerol	15% v/v

Tabla 5. Buffer de transformación 2

TFB2 (pH 6.5)	
Reactivo	Concentración
MOPS	10mM
Cloruro de Calcio	75mM
Cloruro de Rubidio	10mM
Glicerol	15% v/v

- Transformación de bacterias competentes *E. coli*

Ambos plásmidos se introdujeron en bacterias competentes *E. coli* mediante una reacción de shock térmico. Se prepararon placas con medio LB/Kanamicina se transformaron con 50ng del vector 100 µL de células competentes al tubo 1.5 mL. Se mezcla suavemente y se incuba en hielo por 20 minutos. Se incuba durante 50 segundos a 42°C, posteriormente incubar en hielo por 2 minutos y agregar 400 µL de medio LB sin ampicilina. Se incubar 2 horas a 37°C con agitación. Plaquear 100 µL de cada cultivo liquido de transformacion en cajas con medio LB/ampicilina por duplicado. Incubar toda la noche (16-24 horas) a 37°C.

- Aislamiento y caracterización de DNA plasmídico

Para obtener la producción de los dos DNAs plasmídicos se usó el sistema de purificación de plásmidos mini-prep. Primero se preparó un cultivo de 4 mL de medio LB/Kanamicina en un tubo de vidrio y se incubó toda la noche a 37°C. Se colocó 1.5 mL del cultivo en tubo de 1.5 mL, se centrifugó a 3000 rpm 5 minutos a 4°C. Se remueve el medio por decantación, dejando el pellet bacteriano tan seco como sea posible. El pellet se resuspende en 100 µL de solución 1 (Tabla 6) fría. Cuando esté completamente dispersado, se agregan 200 µL de solución 2 (Tabla 7) y se mezcla por inversión del tubo. Se coloca en hielo y se agregan 150 µL de solución 3 (Tabla 8). Se coloca el tubo en hielo 5 minutos, se centrifuga a 12 000 rpm por 5 minutos a 4°C y se transfiere el sobrenadante a otro tubo. Se agregan 400 µL de fenol:cloroformo, se mezcla y se centrifuga a 12 000 rpm por 2 minutos a 4°C. Nuevamente se transfiere el sobrenadante a otro tubo. El DNA se precipita con 800 µL de etanol absoluto y se mezcla por vortex, dejando la mezcla 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12 000 rpm por 5 minutos a 4°C, se remueve el sobrenadante por

aspiración y se lava con 1 mL de etanol al 70% a 4°C. Se centrifuga de nuevo a 12 000 rpm por 5 minutos a 4°C, se decanta el sobrenadante y se deja secar el pellet. El DNA se resuspende en 50 µL de agua libre de RNasas y se almacena a -20°C.

Tabla 6. Solución 1 para mini-prep

Solución 1	
Reactivos	Concentración
Glucosa	50 mM
Tris-Cl (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

Tabla 7. Solución 2 para mini-prep

Solucion 2	
Reactivos	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	1%

Tabla 8. Solución 3 para mini-prep

Solucion 3	
Reactivos	Concentración
Acetato de Potasio	3 M
Ácido acético glacial	5 M
Agua	-

Para la caracterización, se utilizaron los oligos que incluían los plásmidos (Origene) en una reacción de PCR convencional. Estos oligos amplifican los 643pb para el caso del inserto en el plásmido que contiene el miR-25 (CMV-MIR-25), es decir, los 84pb del pre-miR-25 mas 559pb de la secuencia flanqueante, y en el caso de del CMV solo amplifica 448pb debido a que se le restan los 84pb del pri-miR-25 y una secuencia flanqueante de 111pb. Estas reacciones de 20 µl de volumen final se incubaron en el termociclador a 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 5 minutos y 85°C durante 5 minutos en el termociclador de gradiente de Multigene™.

- Cultivo de células A549

El mantenimiento de la línea celular A549 en el laboratorio se logro manteniendolas en el medio F-12K adicionado con suero fetal bovino a una concentracion de 10% y con antibiótico penicilina-estreptomicina (50 U/mL), bajo una atmosfera de CO2 al 5% y una temperatura de 37°C. Para asegurar su continuidad se realizaron resiembras periodicas al alcanzar un 70-90% de confluencia celular con una solución de tripsina 0.05%/EDTA 0.2%. Se realizó una renovación de medio de cultivo 2 o 3 veces por semana.

- Transfección del plásmido en células A549

La transfección se realizó utilizando Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen) y se realizaron ensayos por triplicado para cada plásmido. Se realizaron en cajas de 10cm a una confluencia del 90%. Un día antes de la transfección, las cajas con cultivo celular se dejaron con medio F-12 sin antibiótico. Primero se diluyen 24 µg de DNA en 1.5 mL de medio F-12 sin suero y se mezcla. Luego, se diluyen 60 µL de Lipofectamina™ 2000 en 1.5 mL de medio F-12 sin suero e incuban 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se combina el DNA diluido con la lipofectamina diluida, se mezcla vigorosamente y se incuban 20 minutos a temperatura ambiente para formar los complejos de transfección. Se agregan 3 mL de complejos a cada caja con cultivo celular e incuban las células a 37°C en una incubadora de 18-48 horas. El medio puede ser cambiado después de 4 horas.

4.2.10. Expresión relativa de miR-25

El RNA de las células transfectadas se extrajo por método de Trizol y posteriormente se sintetizó el cDNA específico para el miR-25 maduro con TaqMan® MicroRNA Assay Protocol de Applied Biosystems. Este sistema permite amplificar miRNAs maduros en dos pasos: 1) síntesis de cDNA de miR-25 usando primers específicos en “stem-loop” y 2) cuantificación por PCR tiempo real gracias al alargamiento de cadena producida por el desplegamiento del primer en stem-loop, que permite la unión de 2 primers y 1 sonda necesarios para la cuantificación (Figura 13).

En la reacción de RT-PCR se utilizaron 10ng de RNA total, 50nM del primer RT en stem-loop, 1X RT buffer, 0.25mM de dNTPs, 3.33U/µl de transcriptasa reversa MuLV y 0.25U/µl de inhibidor de RNasa, todos los reactivos pertenecen al kit TaqMan® MicroRNA Reverse transcription de Applied Biosystems. Estas reacciones de 7.5 µl de volumen final se incubaron a 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 5 minutos y 85°C durante 5 minutos en el termociclador de gradiente de Multigene™.

La PCR tiempo real se llevó a cabo en el StepOne™ Real Time System de Applied Biosystems con el software correspondiente, donde se incubaron 10 µl que incluían 0.67 µl del producto de RT, 1X TaqMan Universal PCR master mix y 1µl

de mezcla de primers y sonda del Kit TaqMan MicroRNAs Assay protocol. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. El Ct se determinó usando la línea base que por defecto designa el sistema. Se usó como gen endógeno RNY3, que es un RNA no codificante citoplasmático pequeño asociado a la proteína Ro. La cuantificación de la expresión relativa de los genes se llevó a cabo por el método de la segunda derivada $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se hizo comparación de medias por t de student como prueba estadística ($p \leq 0.05$).

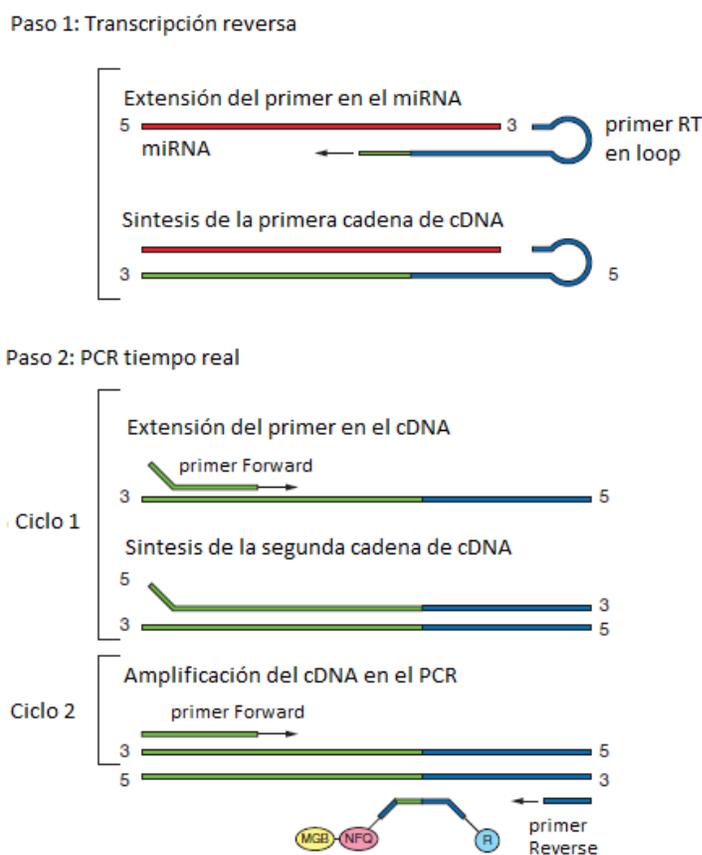


Figura 13 PCR tiempo real en dos pasos para miR-25. La sonda MGB contiene: un reportero FAM™ unido al extremo 5' de la sonda, una región de unión al suero menor (MGB) en el extremo 3' de la sonda y un quencher no fluorescente (NFQ) en el extremo 3' de la sonda. Tomado de *TaqMan® Small RNA Assays Protocol de Applied Biosystems, 2011.*

4.2.11. Expresión relativa de ROB2

El RNA de las células transfectadas se extrajo por método de Trizol y posteriormente se sintetizó el cDNA con la enzima M-MLV RT con el protocolo ya descrito. La PCR tiempo real se realizó con sondas TaqMan® utilizando

modelo StepOne™ Real Time System de Applied Biosystems con el software correspondiente. Las reacciones se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante ya descrito. Se utilizó la subunidad RPB1 de la ARN polimerasa II (POLR2A) como control endógeno. La cuantificación de la expresión relativa de los genes se llevó a cabo por el método de la segunda derivada $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y se hizo comparación de medias por t de Student como prueba estadística ($p \leq 0.05$).

5. RESULTADOS

En todas las etapas del neurodesarrollo, el procesamiento, transporte y regulación de mRNAs son procesos altamente controlados y cualquier modificación en los mismos se relaciona con alteraciones en la función neural, por lo que es importante obtener el perfil de expresión en pacientes con RMI para conocer las modificaciones en la expresión de genes en común en estos casos.

Por lo anterior, la primera parte de este trabajo fue obtener el perfil de expresión mediante microarreglos con GeneChipR Human Genome U133 2.0 array de mRNAs de pacientes y controles. Mediante este chip se evaluó la expresión de 28 867 genes y se determinó que 11 361 genes se encuentran sub-expresados y 9 828 sobre-expresados, quedando 7 677 genes sin cambio al comparar los pacientes con los controles. La gráfica de la figura 14 muestra los genes con significancia estadística; se graficó el *fold change* contra el valor de *p*, de esta manera, se muestran puntos azules y naranjas que representan genes que no tuvieron cambios en su expresión. Por otro lado, los puntos rosas representan a los genes que sí tuvieron cambios en su expresión, tanto de sub y sobre-expresión, pero

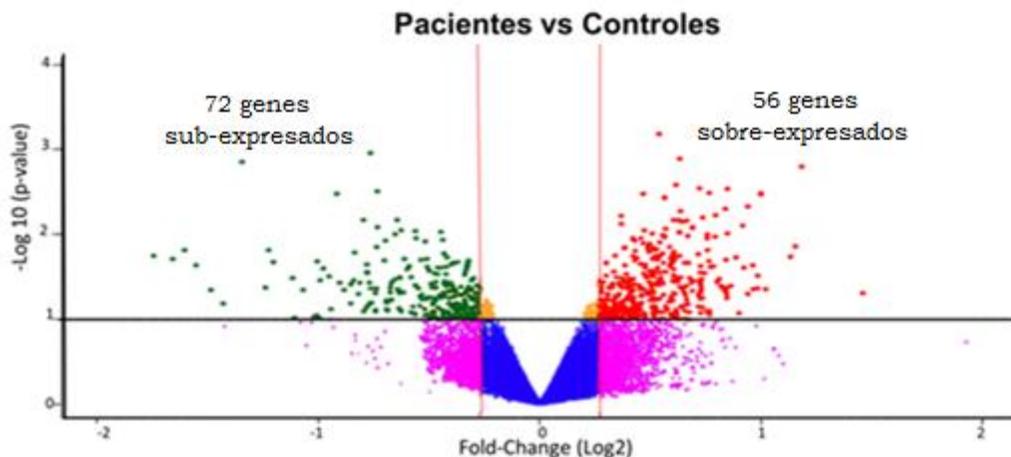


Figura 14. Grafica de dispersión del perfil de expresión de mRNAs de pacientes de RMI. Se hizo un punto de corte en los valores de Fold-Change (Log2) en -0.26 y 0.26 para identificar aquellos genes que tengan cambios en su expresión y que sean validables por qRT-PCR, y en 0.05 en valor de *p* (valor de 1 en -Log10) para identificar aquellos que presenten cambios en su expresión que sean estadísticamente significativos.

que no tienen significancia estadística, en cambio, los puntos rojos representan los genes sobre-expresados (56 genes) y los verdes los sub-expresados (72 genes), que sí son estadísticamente significativos.

Para fines de este trabajo, dado que se busca un posible blanco del mir25, solo se tomaron en cuenta los 72 genes sub-expresados (puntos verdes Figura 14). Estos genes se muestran en la Tabla 9. .

Tabla 9. Genes sub-expresados significativamente en pacientes con RMI.

Gen	Fold-change	Valor de P	Gen	Fold-change	Valor de P
<i>ALOX15B</i>	-1.20	0.045	<i>MST1R</i>	-1.40	0.037
<i>ARHGEF5</i>	-1.45	0.019	<i>NBR2</i>	-1.33	0.018
<i>C6orf108</i>	-1.34	0.024	<i>PARP11</i>	-1.30	0.046
<i>CCDC23</i>	-2.53	0.001	<i>PAX7</i>	-1.57	0.010
<i>CDC20B</i>	-2.80	0.045	<i>PDGFA</i>	-1.33	0.046
<i>CDH13</i>	-1.37	0.024	<i>PLK4</i>	-2.36	0.042
<i>CERS3</i>	-1.70	0.037	<i>PROS1</i>	-2.00	0.021
<i>CHP2</i>	-1.38	0.042	<i>PTN</i>	-1.66	0.008
<i>CHRNA</i>	-1.53	0.036	<i>RASGRP1</i>	-1.30	0.045
<i>CLCA4</i>	-3.35	0.017	<i>ROBO2</i>	-1.56	0.006
<i>CTSC</i>	-1.38	0.036	<i>RPS4X</i>	-1.52	0.019
<i>CTTNBP2</i>	-1.39	0.028	<i>SCGB1A1</i>	-3.15	0.019
<i>DEFB127</i>	-1.26	0.027	<i>SEMA3E</i>	-1.59	0.042
<i>DPP4</i>	-1.69	0.043	<i>SERPINB3</i>	-1.71	0.027
<i>DSC3</i>	-2.10	0.045	<i>SERPINB4</i>	-2.30	0.021
<i>DSG3</i>	-1.98	0.034	<i>SERPINB5</i>	-1.96	0.025
<i>ENG</i>	-1.21	0.049	<i>SLC22A18</i>	-1.25	0.023
<i>ERBB4</i>	-1.37	0.029	<i>SLC23A1</i>	-1.49	0.031
<i>FMO2</i>	-2.93	0.023	<i>SLC40A1</i>	-1.34	0.029
<i>FMO6P</i>	-1.55	0.047	<i>SLC4A4</i>	-1.59	0.037
<i>FRRS1</i>	-1.59	0.048	<i>SNAI2</i>	-1.71	0.028
<i>GBP1</i>	-1.47	0.011	<i>SNORD116-11</i>	-1.32	0.038
<i>GBP3</i>	-1.78	0.016	<i>STATH</i>	-1.71	0.022
<i>GBP4</i>	-1.47	0.009	<i>SYNM</i>	-1.23	0.034
<i>GPM6B</i>	-1.51	0.025	<i>TCEAL4</i>	-1.38	0.042
<i>HIST1H4B</i>	-1.27	0.041	<i>TCTEX1D4</i>	-1.24	0.045
<i>HLF</i>	-1.20	0.046	<i>TIGD4</i>	1.25	0.043
<i>IL33</i>	-2.33	0.015	<i>TIMP1</i>	-1.42	0.019
<i>KCNJ16</i>	-1.80	0.038	<i>TMEM204</i>	-1.31	0.046
<i>KIF20B</i>	-1.33	0.040	<i>TMEM9</i>	-1.25	0.021
<i>KLHL13</i>	-1.31	0.022	<i>TMPRSS11A</i>	-3.04	0.015
<i>KLRC4-KLRK1</i>	-1.54	0.009	<i>TP63</i>	-1.93	0.031
<i>LDHD</i>	-1.20	0.042	<i>VNN2</i>	-1.57	0.034
<i>LIPC</i>	-1.21	0.040	<i>VSNL1</i>	-2.16	0.032
<i>MMP1</i>	-1.50	0.023	<i>ZNF287</i>	-1.36	0.009
<i>MMP28</i>	-1.22	0.049	<i>ZNF493</i>	-1.66	0.043

Los 72 genes sub-expresados, fueron analizados *in silico* utilizando la base de datos DAVID Bioinformatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Con este análisis se realizó la selección de los mRNAs que tuvieran alguna función

en el SNC. Este análisis permitió identificar 15 genes con alguna función reportada a nivel de SNC (Tabla 10). Los genes se ordenaron de menor a mayor significancia estadística de acuerdo a la expresión; de tal manera que el gen *ROBO2* resultó ser el más significativo. Dentro de los procesos encontrados en el análisis, los que predominaron fueron los relacionados con la neurogénesis y la guía axonal.

Tabla 10. Genes con cambios en expresión estadísticamente significativa en pacientes con RMI relacionados a SNC. (www.david.abcc.ncifcrf.gov).

Genes	Expresión	P	Función en el SNC
<i>ROBO2</i>	-1.5	0.006	Guía de axón y neurogénesis.
<i>PTN</i>	-1.6	0.008	Promueve neuritas.
<i>PAX7</i>	-1.57	0.010	Neurogénesis
<i>TIMP1</i>	-1.42	0.019	Formación de la corteza cerebral y formación de memoria
<i>ARHGEF5</i>	-1.5	0.019	Asociada a la proteína Rho (importante en Alzheimer).
<i>MMP1</i>	-1.5	0.023	Proyección de neuronas y dendritas.
<i>CDH13</i>	-1.4	0.024	Proyección neural/receptor de señalización.
<i>SERPINB5</i>	-1.97	0.025	Unión adherente en guía axón y formación dendritas.
<i>GPM6B</i>	-1.5	0.025	Neurogénesis.
<i>SNAI2</i>	-1.7	0.028	Adhesión celular y migración del tubo neural.
<i>CTTNBP2</i>	-1.39	0.028	Regula la señalización sináptica.
<i>ERBB4</i>	-1.37	0.029	Migración de la cresta neural y guía axonal
<i>DSG3</i>	-1.98	0.034	Unión adherentes en la guía axón.
<i>SLC4A4</i>	-1.59	0.037	Formación de vesículas sinápticas
<i>SEMA3E</i>	-1.59	0.042	Guía de axón.

En la Figura 15 se muestra el mapa de calor generado para los 15 genes seleccionados de acuerdo a sus valores de expresión. Los colores representan niveles de expresión de cada gen; las regiones rojas representan genes muy expresados, las verdes genes débilmente expresados o inexistentes, mientras que las negras representan los genes sin cambio. Los genes y las muestras se agrupan por similitud en su patrón de expresión. Se puede observar que no todos siguen el mismo patrón de expresión, y en algunos casos, a pesar de ser considerados todos como sub-expresados en pacientes, hay recuadros verdes en el área de los controles. Esto es debido a que el valor de expresión se obtiene por comparación de promedio de los valores de todos los controles contra todos los pacientes. Sin embargo, solo *ROBO2* tiene un patrón de sub-expresión en

todos los pacientes y, de sobre-expresión en todos los controles. Lo que puede corroborarse porque es el que presenta el valor de p más bajo.

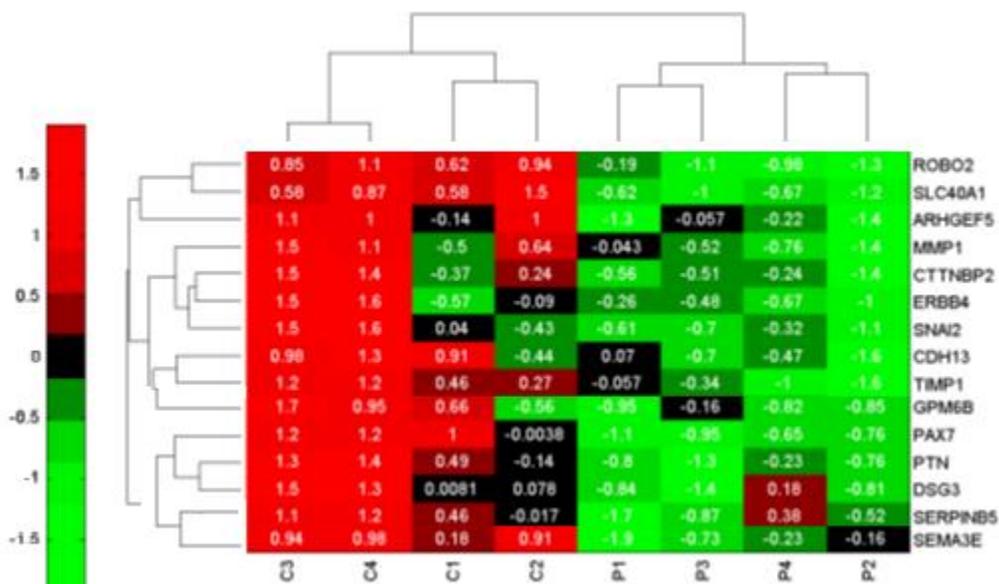


Figura 15. Mapa de calor de mRNAs sub-expresados en pacientes con RMI. Se muestra el valor de expresión de pacientes y controles en cada gen. Según la escala de expresión de la izquierda, los valores de expresión pueden ir de 1.5 (color rojo) hasta valores negativos de -1.5 (color verde). En el lado derecho se indican los genes, y en la parte de abajo el paciente o control al que pertenece el valor de expresión. Se muestra además, el agrupamiento jerárquico de pacientes y controles (por encima del mapa de calor) y el agrupamiento de genes (costado izquierdo del mapa). P1-4: Pacientes. C1-4: Controles.

Para identificar cual o cuales de estos genes son blanco de miR-25, se realizó la búsqueda de un posible alineamiento *in silico* de la secuencia de cada uno de los genes con la del mir-25 maduro en la base de datos MICRORNA(www.microrna.org). Así mismo, se realizó el alineamiento de cada uno de estos genes con los demás microRNAs que habian mostrado cambios en su expresión para hacer una correlación completa *in silico* de los miRNAs sobre-expresados con los mRNAs sub-expresados, aunque en este proyecto, solo se validó experimentalmente la correlacion de miR-25 con un mRNA blanco (Tabla 11).

Tabla 11. Alineamiento de genes sub-expresados con microRNAs sobre-expresados. En los recuadros se indica con cuantos nucleótidos alinea la región 3' UTR del gen con el microRNA maduro y si alinean en dos (X 2) o tres (X 3) regiones con el mismo número de nucleótidos, y los recuadros negros indican los genes que alinean con miR-25. (www.microrna.org)

miRNAs	Genes															
	ROBO2	PTN	ARHGEF5	MMP1	CDH13	SERPIN5	GPM6B	SNAI2	CTTNBP2	SCL40A1	DSG3	PAX7	TIMP1	ERBB4	SLC4A4	SEMA3E
hsa-miR-135a*						6nt					15nt			6nt (X 2)	12nt	11nt
hsa-miR-31							6nt				6nt			14	6nt	
hsa-miR-29a	9nt						6nt				14nt					
	16nt															
hsa-miR-24			9nt			13nt					10nt					9nt
hsa-miR-28-3p	14nt					15nt			10nt					6nt		
									6nt							
hsa-miR-597		12nt				6nt			6nt			6nt		6nt (X 2)	15nt	6nt
hsa-let-7d				6nt							15nt			6nt	16nt	13nt
hsa-miR-324-5p						16nt	6nt								14nt	
hsa-miR-138-1*	6nt (X 2)				14nt	6nt	12nt		6nt (X 2)		8nt				9nt	13nt
											6nt (X 2)			8nt	6nt	
														7nt		
hsa-miR-17		6nt		17nt	6nt	16nt	6nt			16nt (X 2)	16nt			6nt (X 5)	9nt	16nt
														15nt (X 2)		6nt
hsa-miR-27b					13nt		8nt				6nt			12nt	13nt	16nt
hsa-miR-93		6nt		6nt	14nt	6nt	15nt			13nt (X 2)	16nt			6nt	16nt	16nt
																6nt
hsa-miR-19b	14nt		16nt	14nt	15nt	6nt					18nt			11nt		
														7nt		
hsa-miR-27a					13nt		8nt				6nt			12nt	13nt	6nt
hsa-miR-30c	7nt				6nt		10nt	8nt					8nt	10nt	6nt	
	14nt						15nt	12nt					12nt			
	9nt							17nt					15nt			
hsa-miR-9				6nt	13nt	13nt		15nt			7nt		15nt			
											13nt					
hsa-miR-32	15nt				6nt			14nt	6nt		13nt (X 2)		14nt	6nt	17nt	17nt
	14nt							6nt					6nt		14nt	11nt
	10nt													6nt	6nt	
	6nt															
hsa-let-7c				17nt							15nt			6nt	8nt	15nt
hsa-miR-15b	6nt		6nt				14nt	13nt			15nt		13nt	15nt	9nt	6nt
							9nt				12nt			16nt		
							6nt				7nt (X 3)					
hsa-miR-25	15nt				6nt			16nt	6nt		6nt		16nt	13nt	11nt	6nt (X 2)
	12nt							10nt					10nt		6nt (X 2)	
	6nt															
	6nt															

Se encontró que miR-25 alinea con diez genes. Al analizar con detalle cada alineamiento en la región 3' UTR de estos genes, se encontró que el alineamiento en cuatro de ellos (*CDH13*, *CTTNBP2*, *DSG3* y *SEMA3E*) es solo con la secuencia semilla de miR25 (6 nucleótidos) en una o dos posiciones distintas del mRNA. Con los genes *SNAI2* y *TIMP1* el mir25 alinea en dos posiciones con 10 y 16 nucleótidos, respectivamente. En el caso de *SLC4A4* alinea en dos posiciones con 6 y 11 nucleótidos. Con *ERBB4* solo una vez con 13 nucleótidos. Solo con *ROBO2* alinea en cuatro regiones, en dos con la secuencia semilla, y en otras regiones con 12 y 15 nucleótidos. Después de este análisis se eligió *ROBO2* como el principal blanco putativo de miR-25, ya que resultó ser el que tenía el mayor número de alineamientos y además, fue el segundo con mayor significancia estadística (valor menor de *p*). Al elegir a *ROBO2* este fue el gen que fue validado por PCR tiempo real para corroborar su expresión y realizar los ensayos funcionales.

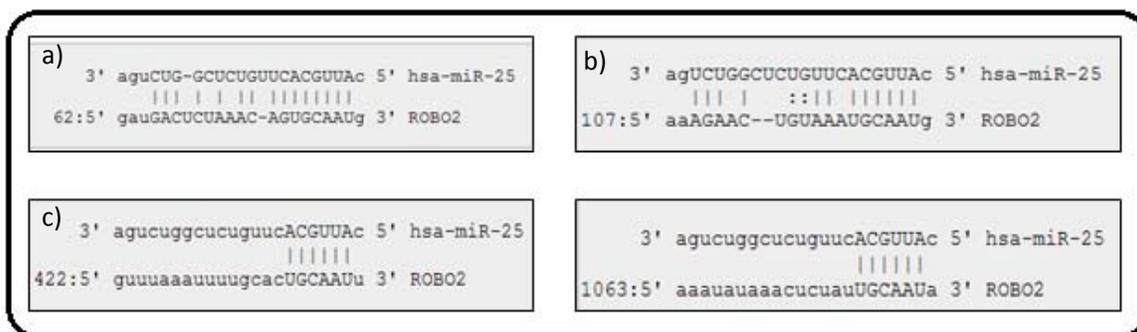


Figura 16. Alineamientos del dúplex miR-25:región 3' UTR de ROBO2 (mRNA). **a)** alineamiento imperfecto del duplex a partir de la posición 62 de la región 3'UTR con 15 nt de miR-25. **b)** alineamiento imperfecto de 12 nucleótidos del dúplex, más 2 interacciones no Watson-Crick (G:U) que comienzan en la posición 107 de la región 3' UTR. **c)** y **d)** alineamientos perfectos de la secuencia semilla (6 nucleótidos) que comienzan en la posición 422 y 1063, respectivamente, de la región 3' UTR del mRNA de *ROBO2*. www.microrna.org

Los datos de expresión de *ROBO2* obtenidos del microarreglo fueron validados por PCR Tiempo Real en las mismas muestras de los 8 pacientes y 8 controles utilizados para el microarreglo. La Figura 17a muestra la gráfica de la amplificación de los pacientes y los controles y observa que las muestras de pacientes, la expresión de *ROBO2* (curvas en color verde) es mucho menor que en los controles (curvas color rojo). Al realizar los cálculos del valor de la expresión de los pacientes en relación a los controles se encontró que la expresión en los pacientes es al menos 6 veces menor (Figura 17b). La

cuantificación por PCR tiempo real corroboró la sub-expresión de *ROBO2* en los pacientes con RMI obtenida en el microarreglo.

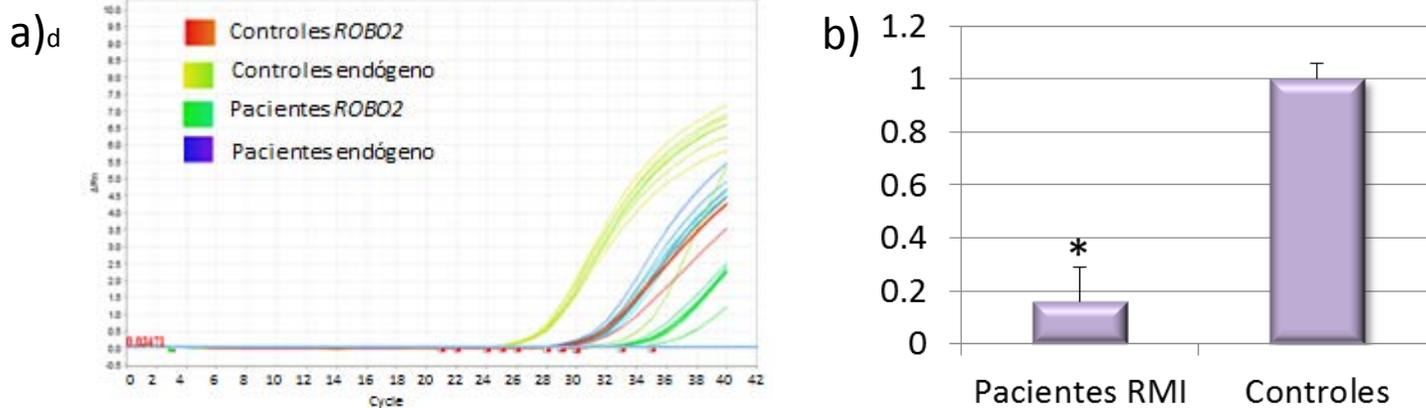


Figura 17. Validación de expresión de *ROBO2* en pacientes con RMI. a) Gráfico de amplificación de la reacción de qPCR; **b)** Expresión relativa de *ROBO2*. El valor de expresión en controles se tomó el basal, por lo que se le asignó el valor de 1. * $p > 0.005$

Para analizar si la sobre-expresión del miR-25 provoca la sub-expresión de *ROBO2* se realizaron ensayos funcionales en la línea celular A549 (carcinoma de pulmón humano), la cual presenta una sobre-expresión de *ROBO2* y una expresión basal de mir25. Para realizar la sobre-expresión del miRNA se utilizó el plásmido CMV-MIR25, el cual se caracterizó para asegurar que fuera el plásmido correcto. Para la caracterización el plásmido fue amplificado por PCR punto final y se comparó con el plásmido vacío (CMV) en un gel de agarosa al 1.5% (Figura 18). Se observaron las bandas del tamaño adecuado para cada plásmido, es decir, para el CMV-MIR25 se obtuvo una banda de 643pb (figura 18, carriles 2-5) debido a que este contiene la secuencia del pre-miR que es de 84 nucleótidos mas una secuencia flanqueante de 111 nucleótidos, en tanto que el plásmido vacío presentó una banda de 448pb (Figura 18, carril 1).

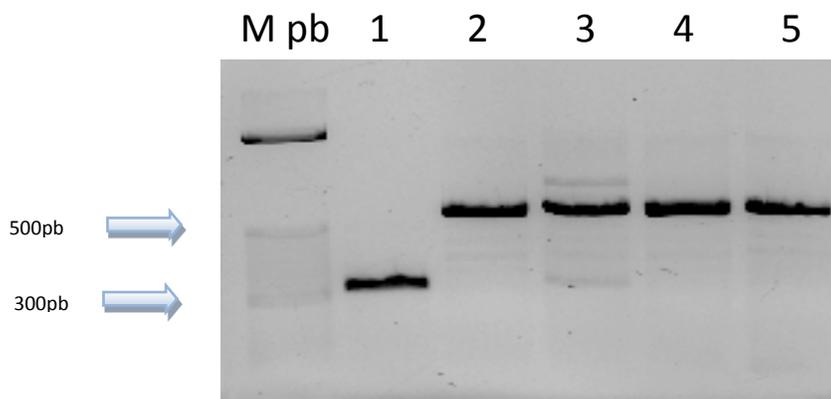


Figura 18. Electroforesis de productos de PCR para caracterización de plásmidos en gel de agarosa 1.5%. Carril 1) Fragmento amplificado de CMV=448pb. Carriles 2-5) Fragmento amplificado de CMV-MIR25=643 pb. M pb: marcador de pares de bases.

Una vez confirmado que los plásmidos eran los adecuados, ambos fueron transfectados en la línea celular A549, para cuantificar si la expresión de *ROBO2* era modificada por el miR-25. Después de realizar la transfección y la obtención del RNA total se determinó la expresión relativa tanto de miR-25 como de *ROBO2* mediante PCR tiempo real. Considerando el valor promedio de la expresión de las células tranfectadas con el plásmido CMV como la expresión basal considerada con el valor de 1 tanto para el miR-25 como para *ROBO2* (Figura 19). Una vez realizado el análisis se observó que la expresión de miR-25 aumentó 1.5 veces en las células transfectadas con CMV-MIR25, lo que indica que se logró sobre-expresar a este miRNA después de la transfección en la línea A549 (Figura 19a). A su vez, los niveles de expresión de *ROBO2* fueron inferiores en las células transfectadas con el plásmido CMV-MIR25 en comparación con las células que se transfectaron solo con el vector vacío (CMV) (figura 19b). Estos resultados mostraron que la sobre-expresión de miR-25 provocó la sub-expresión de *ROBO2*, en la línea celular A549.

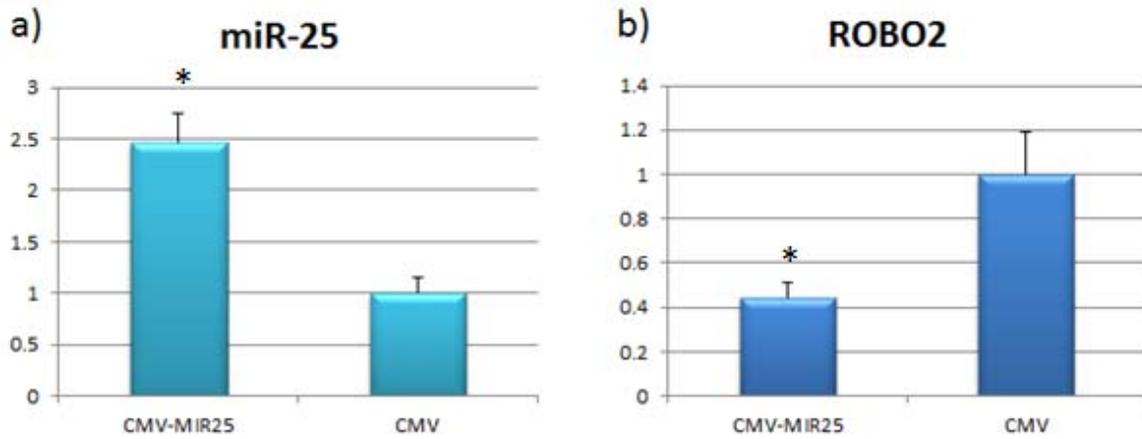


Figura 19. Expresión relativa de miR-25 y *ROBO2* en células A549 después de la transfección con CMV-MIR25 y CMV. a) Expresión relativa de miR-25; b) expresión relativa de *ROBO2*. El valor de expresión en CMV se tomó como el basal, por lo que se le asignó el valor de 1 para ambos casos.

* $p < 0.005$

6. DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que indica que la sobre-expresión del miR-25 está provocando la sub-expresión del mRNA del gen *ROBO2*. El producto del gen *ROBO2* participa en etapas importantes del neurodesarrollo y por lo tanto, la sub-expresión de este puede jugar un papel trascendental en el RMI.

El gen *ROBO2* codifica a la proteína del mismo nombre, y se sabe que tiene alta expresión en cerebro fetal por pertenecer al grupo de receptores de membrana de axones que han iniciado su proyección hacia neuronas diana con las que establezcan conexiones sinápticas. Este proceso es crucial en la definición de conexiones entre las neuronas cerebrales especialmente durante el desarrollo de estructuras como la corteza, el hipocampo y el bulbo olfatorio^{34; 38}. Por lo tanto, la sub-expresión de *ROBO2* puede ser considerada de suma importancia en el RMI, ya que esta es una patología cuyo daño se considera sucede durante el neurodesarrollo.

Los defectos en este proceso se han relacionado directamente con algunas patologías, entre ellas la esquizofrenia, epilepsia, problemas de aprendizaje y enfermedad de Parkinson¹⁵⁻¹⁸.

En pacientes con Autismo, desorden caracterizado por deficiencias en las interacciones sociales recíprocas y de comunicación, se han encontrado reducidos los niveles tanto de mRNA como de proteínas de receptores de señales de la guía axonal, entre ellos *PLXNA4* y *ROBO2* en la corteza del cíngulo anterior que trasmite señales neuronales entre los hemisferios cerebrales y que es conocida por estar relacionada a la cognición social¹⁴⁹, característica también relacionada al RM. Es de particular interés que la pérdida de la señalización *Robo2/Slit* afecta el desarrollo de los sistemas serotoninérgicos y dopaminérgicos, ambos implicados en la patofisiología del autismo³⁰.

Cabe destacar que con la metodología utilizada, partiendo de cultivos primarios de CPNs, es posible relacionar las alteraciones a nivel de expresión de genes con procesos involucrados en el desarrollo embrionario. El perfil de expresión obtenido de los pacientes con RMI demuestra que, además de *ROBO2*, cuatro genes más de los sub-expresados están relacionados a la guía axonal, lo que podría estar indicando que defectos en este proceso pueden ser característicos de esta discapacidad. No todos estos genes se relacionan con la guía axonal al mismo nivel; por una parte, *ROBO2* y *SEMA3E* codifican proteínas secretables

que actúan como moléculas de quimio-repulsión y atracción, respectivamente, regulando directamente la orientación axonal; *SERPINB5* y *DSG3* participan en la formación de uniones adherentes cuando el axón ha llegado a su sitio de destino y son de suma importancia en las sinapsis eléctricas; y por último, *ERBB4* codifica un receptor tirosina cinasa que se ha visto que expresado en neuronas

Robo2 es un receptor de las proteínas Slit1 y 2, ambos tienen una función importante en la guía axonal, pero también se sabe que la ausencia de estas proteínas lleva a una pérdida de mitosis del área ventricular. Recientemente se reportó que la vía Robo/Slit tiene la capacidad de modular la dinámica de las células progenitoras en el cerebro en desarrollo y potenciar la transición de progenitores primarios a intermedios neurales (IPCs) en la zona ventricular, sin llevar a una sobre-producción de neuronas, esto probablemente debido a que la gran cantidad de IPCs producidas resultan defectuosas y no se desprenden del revestimiento ventricular, lo que afecta por supuesto la neurogénesis de esta área cerebral¹⁵⁰. Revisando el perfil de expresión obtenido, los genes *SLIT1* y *SLIT2* muestran cambios, pero ninguno resultó ser estadísticamente significativo, lo que indica que estos cambios no son consistentes en todos los pacientes del estudio, pero seguramente la sub-expresión del receptor Robo2 podría representar una falla suficiente para afectar procesos como la guía axonal como la neurogénesis.

La vía de señalización Robo/Slit no es exclusiva del desarrollo del SNC, también se ha propuesto que participa en la regulación y maduración de tejidos y órganos no neuronales, como el pulmón¹⁵¹, se ha relacionado con la quimiotaxis de leucocitos y angiogénesis en el desarrollo cardíaco y del riñón¹⁵². Por otro lado, es conocido su papel como genes supresores de tumores en cáncer de pulmón y de mama^{152; 153}. En la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón, se han observado disminuciones en la expresión de *SLIT1*, 2 y 3 y *ROBO1* y 3, mientras que *ROBO2* mantiene sus niveles de expresión basales propios de este tejido¹⁵⁴, niveles que se pudieron detectar también en este trabajo. Por otro lado, miR-25 se expresa también en esta línea celular, sin embargo, estos niveles de expresión no parecen ser suficientes para inhibir a *ROBO2* a nivel de mRNA en este tejido. En este trabajo se demostró que, una vez que miR-25 se sobre-expresó 1.5 veces en esta línea celular, los niveles de expresión de *ROBO2* disminuyen poco más de la mitad, lo que sugiere que cuando miR-25 se encuentra sobre-expresado, como es el caso de pacientes con

RMI, la vía de Robo/Slit podría estar afectada a nivel de este receptor y podría, a su vez, afectar procesos importantes en el desarrollo del SNC, como la guía axonal.

Se sabe que una desregulación en el proceso de guía axonal causa disfunción a nivel sináptico, que no afecta solo a un área determinada, sino que conlleva a alteraciones en la conectividad cerebral general, y en varios trabajos sea propuesto como el principal factor que contribuye al RM. Este es el primer trabajo que reporta que *ROBO2* se encuentra sub-expresado en pacientes con RMI, y que puede ser a causa del efecto de miR-25,

Si bien todavía estamos lejos de la identificación de los factores etiológicos concretos, estos avances en la identificación a nivel molecular de genes desregulados y moléculas que pueden estar causando este efecto, sin duda, es el primer paso hacia el esclarecimiento de la etiopatogenia del RM.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo al perfil de expresión obtenido a partir de células progenitoras neurales de pacientes con RMI, se encontró que 19 genes de los sub-expresados se encuentran relacionados al SNC, siendo la guía axonal y neurogénesis los procesos con más genes relacionados. De estos, *ROBO2* se ha visto relacionado con ambos procesos.

Por otro lado, miR-25 se ha visto sobre-expresado en pacientes con RMI, y en este trabajo se encontró que *ROBO2* alinea con este miRNA en su región 3' UTR en 4 regiones, dos con la secuencia semilla, una con 12 nt y otra con 25 nt, lo que aumenta la probabilidad de que este mRNA sea degradado a causa del efecto de miR-25, lo que se pudo comprobar después del ensayo transfección en la línea celular A549 donde se sobre-expresa miR-25 y la expresión de *ROBO2* se vio disminuía.

Si bien todavía estamos lejos de la identificación de los factores etiológicos concretos, estos avances en la identificación a nivel molecular de genes desregulados y moléculas que pueden estar causando este efecto, sin duda, es el primer paso hacia el esclarecimiento de la etiopatogenia del RM.

8. LITERATURA CITADA

1. Galasso, C., Lo-Castro, A., El-Malhany, N., and Curatolo, P. (2010). "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Italian journal of pediatrics* 36, 17.
2. Vissers, L.E., de Vries, B.B., and Veltman, J.A. (2010). Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *Journal of medical genetics* 47, 289-297.
3. Lewis Wolpert, T.J., Peter Lawrence, Elliot Meyerowitz, Elizabeth Robertson, Jim Smith. (2010). *Principios del Desarrollo*.
4. Pimienta, M.I.E.y.H.J. (2006). *Sistema Nervioso*.
5. Urgelés D., C.F., Ramos-Moreno T. . (2008). Neurodesarrollo y patogenia de las enfermedades mentales: la vía de señal mediada por reelin. *Psiquiatría Biol* 15, 16-22.
6. Eynard, A.R. (2008). *Histología y Embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*.
7. W., S.T. (2006). *Langman: Embriología médica: con orientación clínica*. Editorial Medica Panamericana
8. Gilbert, S.F. (2005). *Biología del Desarrollo*. Editorial Medica Panamericana.
9. Ramon y Cajal, S. (1890). Sobre la aparición de las expansiones celulares en la médula embrionaria. *Gaceta sanitaria de Barcelona*, 413-419.
10. Yamada, K.M., and Wessells, N.K. (1971). Axon elongation. Effect of nerve growth factor on microtubule protein. *Experimental cell research* 66, 346-352.
11. Hall, A., and Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a001818.
12. Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
13. Fan, J., Mansfield, S.G., Redmond, T., Gordon-Weeks, P.R., and Raper, J.A. (1993). The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *The Journal of cell biology* 121, 867-878.
14. Suter, D.M., and Forscher, P. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of neurobiology* 44, 97-113.
15. Diaz-Martinez, N.E., Tamariz, E., Diaz, N.F., Garcia-Pena, C.M., Varela-Echavarria, A., and Velasco, I. (2013). Recovery from experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 1579-1591.
16. Fisher, S.E., and Francks, C. (2006). Genes, cognition and dyslexia: learning to read the genome. *Trends in cognitive sciences* 10, 250-257.
17. Eastwood, S.L., Law, A.J., Everall, I.P., and Harrison, P.J. (2003). The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Molecular psychiatry* 8, 148-155.
18. Yaron, A., and Zheng, B. (2007). Navigating their way to the clinic: emerging roles for axon guidance molecules in neurological disorders and injury. *Developmental neurobiology* 67, 1216-1231.
19. Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M., and Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.
20. Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 9, 873-881.

21. Yurchenco, P.D., and Wadsworth, W.G. (2004). Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Current opinion in cell biology* 16, 572-579.
22. Barallobre, M.J., Del Rio, J.A., Alcantara, S., Borrell, V., Aguado, F., Ruiz, M., Carmona, M.A., Martin, M., Fabre, M., Yuste, R., et al. (2000). Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development* 127, 4797-4810.
23. Gherardi, E., Love, C.A., Esnouf, R.M., and Jones, E.Y. (2004). The sema domain. *Current opinion in structural biology* 14, 669-678.
24. Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.
25. (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* 97, 551-552.
26. Jongbloets, B.C., and Pasterkamp, R.J. (2014). Semaphorin signalling during development. *Development* 141, 3292-3297.
27. Falk, J., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Puschel, A.W., et al. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48, 63-75.
28. Pasterkamp, R.J., Peschon, J.J., Spriggs, M.K., and Kolodkin, A.L. (2003). Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424, 398-405.
29. Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
30. Bagri, A., Marin, O., Plump, A.S., Mak, J., Pleasure, S.J., Rubenstein, J.L., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33, 233-248.
31. Brose, K., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Current opinion in neurobiology* 10, 95-102.
32. Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C.S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.
33. Hu, H., Li, M., Labrador, J.P., McEwen, J., Lai, E.C., Goodman, C.S., and Bashaw, G.J. (2005). Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4613-4618.
34. Nguyen Ba-Charvet, K.T., Brose, K., Marillat, V., Kidd, T., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., and Chedotal, A. (1999). Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron* 22, 463-473.
35. Howitt, J.A., Clout, N.J., and Hohenester, E. (2004). Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *The EMBO journal* 23, 4406-4412.
36. Liu, Z., Patel, K., Schmidt, H., Andrews, W., Pini, A., and Sundaresan, V. (2004). Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding. *Molecular and cellular neurosciences* 26, 232-240.
37. Kramer, S.G., Kidd, T., Simpson, J.H., and Goodman, C.S. (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* 292, 737-740.

38. Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.
39. Zhu, Y., Li, H., Zhou, L., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 23, 473-485.
40. Bloch-Gallego, E., Causeret, F., Ezan, F., Backer, S., and Hidalgo-Sanchez, M. (2005). Development of precerebellar nuclei: instructive factors and intracellular mediators in neuronal migration, survival and axon pathfinding. *Brain research Brain research reviews* 49, 253-266.
41. Sang, Q., Wu, J., Rao, Y., Hsueh, Y.P., and Tan, S.S. (2002). Slit promotes branching and elongation of neurites of interneurons but not projection neurons from the developing telencephalon. *Molecular and cellular neurosciences* 21, 250-265.
42. Rothberg, J.M., Jacobs, J.R., Goodman, C.S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes & development* 4, 2169-2187.
43. Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C.S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10, 409-426.
44. Simpson, J.H., Kidd, T., Bland, K.S., and Goodman, C.S. (2000). Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron* 28, 753-766.
45. Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S., and Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-215.
46. Keleman, K., Rajagopalan, S., Cleppien, D., Teis, D., Paiha, K., Huber, L.A., Technau, G.M., and Dickson, B.J. (2002). Comm sorts robo to control axon guidance at the *Drosophila* midline. *Cell* 110, 415-427.
47. Keleman, K., Ribeiro, C., and Dickson, B.J. (2005). Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. *Nature neuroscience* 8, 156-163.
48. Simpson, J.H., Bland, K.S., Fetter, R.D., and Goodman, C.S. (2000). Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell* 103, 1019-1032.
49. Long, H., Sabatier, C., Ma, L., Plump, A., Yuan, W., Ornitz, D.M., Tamada, A., Murakami, F., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (2004). Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 42, 213-223.
50. Sabatier, C., Plump, A.S., Le, M., Brose, K., Tamada, A., Murakami, F., Lee, E.Y., and Tessier-Lavigne, M. (2004). The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117, 157-169.
51. Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 291, 1928-1938.
52. Neurology, A.A.o. (2006). Myelination of language-related areas in the developin brain. *Official journal of American Academy of Neurology*

53. Association, A.P. (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.(Washington DC: American Psychiatric Association).
54. (AAIDD), A.A.o.I.a.D.D. (2010). Intectual Disability. In. (<http://aaid.org/intellectual-disability>).
55. Sparrow, S.S., Cicchetti, Domenic V., Balla, David A. (2008). Vineland Adaptive Behavior Scales.(Ellensburg, WA).
56. Kaufman, L., Ayub, M., and Vincent, J.B. (2010). The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *Journal of neurodevelopmental disorders* 2, 182-209.
57. Leonard, H., and Wen, X. (2002). The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8, 117-134.
58. Joaquín, G.P. Evaluación del desarrollo potencial en sujetos escolarizados con Retraso Mental. Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
59. Richard E. Behrman, R.M.K., Hal B. Jenson. (2004). Nelson. Tratado de pediatría.(España: Elsevier).
60. Guitart, F.M., Brunet, V. A, Villatoro, G. S, Baena, N., Gabau, E. (2006). Causas cromosómicas que originan el retraso mental: alteraciones cromosómicas diagnosticables en el paciente. *Rev Neurología* 42, 21-26.
61. Xu, J., and Chen, Z. (2003). Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 117C, 15-24.
62. van Karnebeek, C.D., Jansweijer, M.C., Leenders, A.G., Offringa, M., and Hennekam, R.C. (2005). Diagnostic investigations in individuals with mental retardation: a systematic literature review of their usefulness. *European journal of human genetics : EJHG* 13, 6-25.
63. De Vigan, C., Baena, N., Cariati, E., Clementi, M., and Stoll, C. (2001). Contribution of ultrasonographic examination to the prenatal detection of chromosomal abnormalities in 19 centres across Europe. *Annales de genetique* 44, 209-217.
64. Behjati, F., Ghasemi Firouzabadi, S., Kahrizi, K., Kariminejad, R., Bagherizadeh, I., Ansari, J., Fallah, M., Mojtahedi, F., Darvish, H., Bahrami Monajemi, G., et al. (2011). Chromosome abnormality rate among Iranian patients with idiopathic mental retardation from consanguineous marriages. *Archives of medical science : AMS* 7, 321-325.
65. Moeschler, J.B., and Shevell, M. (2006). Clinical genetic evaluation of the child with mental retardation or developmental delays. *Pediatrics* 117, 2304-2316.
66. Rittey, C.D. (2003). Learning difficulties: what the neurologist needs to know. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74 Suppl 1, i30-36.
67. Torrado, M.d.I.V. (2009). Evaluación etiológica del ratardo mental de origen genético. Algoritmo diagnóstico y nuevas técnicas moleculares. *Arch Argent Pediatr* 107, 246-255.
68. Rajesh, C. (2012). MicroRNAs and fetal brain development: implications for ethanol teratology during the second trimester period neurogenesis. *Frontiers in genetics* 3, 1-7.
69. Shaffer, L.G., Bejjani, B.A., Torchia, B., Kirkpatrick, S., Coppinger, J., and Ballif, B.C. (2007). The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 145C, 335-345.
70. Li, M.M., and Andersson, H.C. (2009). Clinical application of microarray-based molecular cytogenetics: an emerging new era of genomic medicine. *The Journal of pediatrics* 155, 311-317.
71. Liang, J.S., Shimojima, K., and Yamamoto, T. (2008). Application of array-based comparative genome hybridization in children with developmental delay or mental retardation. *Pediatrics and neonatology* 49, 213-217.

72. Rio, M., Molinari, F., Heuertz, S., Ozilou, C., Gosset, P., Raoul, O., Cormier-Daire, V., Amiel, J., Lyonnet, S., Le Merrer, M., et al. (2002). Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *Journal of medical genetics* 39, 266-270.
73. Schoumans, J., Ruivenkamp, C., Holmberg, E., Kyllerman, M., Anderlid, B.M., and Nordenskjold, M. (2005). Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridisation (array-CGH). *Journal of medical genetics* 42, 699-705.
74. Bernardini, L., Alesi, V., Loddo, S., Novelli, A., Bottillo, I., Battaglia, A., Digilio, M.C., Zampino, G., Ertel, A., Fortina, P., et al. (2010). High-resolution SNP arrays in mental retardation diagnostics: how much do we gain? *European journal of human genetics : EJHG* 18, 178-185.
75. Colleaux, L., Rio, M., Heuertz, S., Moindrault, S., Turleau, C., Ozilou, C., Gosset, P., Raoul, O., Lyonnet, S., Cormier-Daire, V., et al. (2001). A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *European journal of human genetics : EJHG* 9, 319-327.
76. Chelly, J., and Mandel, J.L. (2001). Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nature reviews Genetics* 2, 669-680.
77. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
78. Lugo, A., Trujillo, K. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Revista Medicina Universitaria* 11, 187-192.
79. Hansen, K.F., Sakamoto, K., Wayman, G.A., Impey, S., and Obrietan, K. (2010). Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PLoS one* 5, e15497.
80. Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
81. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
82. Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2006). A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126, 1203-1217.
83. Kosik, K.S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nature reviews Neuroscience* 7, 911-920.
84. Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., and Schier, A.F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.
85. De Pietri Tonelli, D., Pulvers, J.N., Haffner, C., Murchison, E.P., Hannon, G.J., and Huttner, W.B. (2008). miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development* 135, 3911-3921.
86. Kawase-Koga, Y., Low, R., Otaegi, G., Pollock, A., Deng, H., Eisenhaber, F., Maurer-Stroh, S., and Sun, T. (2010). RNAase-III enzyme Dicer maintains signaling pathways for differentiation and survival in mouse cortical neural stem cells. *Journal of cell science* 123, 586-594.
87. Stark, K.L., Xu, B., Bagchi, A., Lai, W.S., Liu, H., Hsu, R., Wan, X., Pavlidis, P., Mills, A.A., Karayiorgou, M., et al. (2008). Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nature genetics* 40, 751-760.

88. Nimchinsky, E.A., Oberlander, A.M., and Svoboda, K. (2001). Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 5139-5146.
89. Motti, D., Bixby, J.L., and Lemmon, V.P. (2012). MicroRNAs and neuronal development. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 17, 347-352.
90. Munoz-Sanjuan, I., and Brivanlou, A.H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nature reviews Neuroscience* 3, 271-280.
91. Nitta, K.R., Tanegashima, K., Takahashi, S., and Asashima, M. (2004). XSIP1 is essential for early neural gene expression and neural differentiation by suppression of BMP signaling. *Developmental biology* 275, 258-267.
92. Du, Z.W., Ma, L.X., Phillips, C., and Zhang, S.C. (2013). miR-200 and miR-96 families repress neural induction from human embryonic stem cells. *Development* 140, 2611-2618.
93. Zhao, C., Sun, G., Li, S., Lang, M.F., Yang, S., Li, W., and Shi, Y. (2010). MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1876-1881.
94. Akerblom, M., and Jakobsson, J. (2013). MicroRNAs as Neuronal Fate Determinants. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 20, 235-242.
95. Liu, X.S., Chopp, M., Zhang, R.L., Tao, T., Wang, X.L., Kassis, H., Hozeska-Solgot, A., Zhang, L., Chen, C., and Zhang, Z.G. (2011). MicroRNA profiling in subventricular zone after stroke: MiR-124a regulates proliferation of neural progenitor cells through Notch signaling pathway. *PloS one* 6, e23461.
96. Cheng, L.C., Pastrana, E., Tavazoie, M., and Doetsch, F. (2009). miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature neuroscience* 12, 399-408.
97. Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., and Lee, S.K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes & development* 21, 744-749.
98. Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell* 27, 435-448.
99. Zhao, C., Sun, G., Li, S., and Shi, Y. (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nature structural & molecular biology* 16, 365-371.
100. Yoo, A.S., Staahl, B.T., Chen, L., and Crabtree, G.R. (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 460, 642-646.
101. Gaughwin, P., Ciesla, M., Yang, H., Lim, B., and Brundin, P. (2011). Stage-specific modulation of cortical neuronal development by Mmu-miR-134. *Cerebral cortex* 21, 1857-1869.
102. Niu, C.S., Yang, Y., and Cheng, C.D. (2013). MiR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression. *International journal of oncology* 42, 1533-1540.
103. Szulwach, K.E., Li, X., Smrt, R.D., Li, Y., Luo, Y., Lin, L., Santistevan, N.J., Li, W., Zhao, X., and Jin, P. (2010). Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *The Journal of cell biology* 189, 127-141.
104. Silber, J., Lim, D.A., Petritsch, C., Persson, A.I., Maunakea, A.K., Yu, M., Vandenberg, S.R., Ginzinger, D.G., James, C.D., Costello, J.F., et al. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC medicine* 6, 14.

105. Brett, J.O., Renault, V.M., Rafalski, V.A., Webb, A.E., and Brunet, A. (2011). The microRNA cluster miR-106b~25 regulates adult neural stem/progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Aging* 3, 108-124.
106. Kim, Y.K., Yu, J., Han, T.S., Park, S.Y., Namkoong, B., Kim, D.H., Hur, K., Yoo, M.W., Lee, H.J., Yang, H.K., et al. (2009). Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic acids research* 37, 1672-1681.
107. Uchida, N. (2010). MicroRNA-9 controls a migratory mechanism in human neural progenitor cells. *Cell stem cell* 6, 294-296.
108. Rago, L., Beattie, R., Taylor, V., and Winter, J. (2014). miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *The EMBO journal* 33, 906-920.
109. Smirnova, L., Grafe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *The European journal of neuroscience* 21, 1469-1477.
110. Iyer, A.N., Bellon, A., and Baudet, M.L. (2014). microRNAs in axon guidance. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 78.
111. Chiu, H., Alqadah, A., and Chang, C. (2014). The role of microRNAs in regulating neuronal connectivity. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 283.
112. Shibata, M., Nakao, H., Kiyonari, H., Abe, T., and Aizawa, S. (2011). MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 3407-3422.
113. Baudet, M.L., Zivraj, K.H., Abreu-Goodger, C., Muldal, A., Armisen, J., Blenkinsop, C., Goldstein, L.D., Miska, E.A., and Holt, C.E. (2012). miR-124 acts through CoREST to control onset of *Sema3A* sensitivity in navigating retinal growth cones. *Nature neuroscience* 15, 29-38.
114. Zou, Y., Chiu, H., Domenger, D., Chuang, C.F., and Chang, C. (2012). The *lin-4* microRNA targets the *LIN-14* transcription factor to inhibit netrin-mediated axon attraction. *Science signaling* 5, ra43.
115. Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., and Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283-289.
116. Siew, W.H., Tan, K.L., Babaei, M.A., Cheah, P.S., and Ling, K.H. (2013). MicroRNAs and intellectual disability (ID) in Down syndrome, X-linked ID, and Fragile X syndrome. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 41.
117. Palacios-Reyes, C., Espinosa, A., Contreras, A., Ordonez, R., Hidalgo-Miranda, A., Rubio-Gayosso, I., Garcia-Alonso, P., Benitez-King, G., Ramirez-Rodriguez, G., Najera, N., et al. (2013). Williams' neural stem cells: new model for insight into microRNA dysregulation. *Frontiers in bioscience* 5, 1057-1073.
118. Edbauer, D., Neilson, J.R., Foster, K.A., Wang, C.F., Seeburg, D.P., Batterton, M.N., Tada, T., Dolan, B.M., Sharp, P.A., and Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65, 373-384.
119. Yi, Y.H., Sun, X.S., Qin, J.M., Zhao, Q.H., Liao, W.P., and Long, Y.S. (2010). Experimental identification of microRNA targets on the 3' untranslated region of human *FMR1* gene. *Journal of neuroscience methods* 190, 34-38.
120. Kuhn, D.E., Nuovo, G.J., Martin, M.M., Malana, G.E., Pleister, A.P., Jiang, J., Schmittgen, T.D., Terry, A.V., Jr., Gardiner, K., Head, E., et al. (2008). Human chromosome 21-derived

- miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochemical and biophysical research communications* 370, 473-477.
121. Kuhn, D.E., Nuovo, G.J., Terry, A.V., Jr., Martin, M.M., Malana, G.E., Sansom, S.E., Pleister, A.P., Beck, W.D., Head, E., Feldman, D.S., et al. (2010). Chromosome 21-derived microRNAs provide an etiological basis for aberrant protein expression in human Down syndrome brains. *The Journal of biological chemistry* 285, 1529-1543.
 122. Turcatel, G., Rubin, N., El-Hashash, A., and Warburton, D. (2012). MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-beta induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PLoS one* 7, e31032.
 123. Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124, 319-335.
 124. Brann, J.H., and Firestein, S.J. (2014). A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Frontiers in neuroscience* 8, 182.
 125. R., A.-C.O.y.D.-C. (2007). "Neurogenesis as a therapeutic strategy to regenerate central nervous system". *Rev Neurología* 45, 739-745.
 126. Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 425, 479-494.
 127. Ma, D.K., Ming, G.L., and Song, H. (2005). Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Current opinion in neurobiology* 15, 514-520.
 128. Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L., and Vescovi, A.L. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circulation research* 92, 598-608.
 129. Graziadei, P.P., and Graziadei, G.A. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of neurocytology* 8, 1-18.
 130. Graziadei, G.A., and Graziadei, P.P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of neurocytology* 8, 197-213.
 131. Graziadei, P.P., and Monti Graziadei, G.A. (1980). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *Journal of neurocytology* 9, 145-162.
 132. Iwai, N., Zhou, Z., Roop, D.R., and Behringer, R.R. (2008). Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem cells* 26, 1298-1306.
 133. Chen, X., Fang, H., and Schwob, J.E. (2004). Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *The Journal of comparative neurology* 469, 457-474.
 134. Mackay-Sim, A. (2010). Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Archives italiennes de biologie* 148, 47-58.
 135. Katoh, H., Shibata, S., Fukuda, K., Sato, M., Satoh, E., Nagoshi, N., Minematsu, T., Matsuzaki, Y., Akazawa, C., Toyama, Y., et al. (2011). The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Molecular brain* 4, 34.
 136. Benitez-King, G., Riquelme, A., Ortiz-Lopez, L., Berlanga, C., Rodriguez-Verdugo, M.S., Romo, F., Calixto, E., Solis-Chagoyan, H., Jimenez, M., Montano, L.M., et al. (2011). A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of neuroscience methods* 201, 35-45.
 137. Marshall, C.T., Lu, C., Winstead, W., Zhang, X., Xiao, M., Harding, G., Klueber, K.M., and Roisen, F.J. (2006). The therapeutic potential of human olfactory-derived stem cells. *Histology and histopathology* 21, 633-643.

138. Jimenez-Vaca A., B.-K.G., López-Ruiz V., Velez-del Valle C., Ramirez-Sanchez I., Ramírez-Rodríguez G., Salamanca-Gómez F., Hernandez-de la Cruz B., Ordoñez-Razon R. (2015). Human olfactory neuroepithelium a source of neural progenitor cells. In Brain research. (Instituto Mexicano del Seguro Social.
139. Abrams, M.T., Kaufmann, W.E., Rousseau, F., Oostra, B.A., Wolozin, B., Taylor, C.V., Lishaa, N., Morel, M.L., Hoogeveen, A., and Reiss, A.L. (1999). FMR1 gene expression in olfactory neuroblasts from two males with fragile X syndrome. American journal of medical genetics 82, 25-30.
140. Ronnett, G.V., Leopold, D., Cai, X., Hoffbuhr, K.C., Moses, L., Hoffman, E.P., and Naidu, S. (2003). Olfactory biopsies demonstrate a defect in neuronal development in Rett's syndrome. Annals of neurology 54, 206-218.
141. Yamagishi, M., Ishizuka, Y., and Seki, K. (1994). [Definitive diagnosis of Alzheimer's disease using olfactory mucosal biopsy]. Nihon Jibiinkoka Gakkai kaiho 97, 51-60.
142. de Pablo Dávila F, C.A.M. (2009). Células madre neurales, neurogénesis y neuroprotección. In Células Madre y terapia regenerativa, d.P.D. F, ed. (España, REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA), pp 101-130.
143. Mikkers, H., and Frisen, J. (2005). Deconstructing stemness. The EMBO journal 24, 2715-2719.
144. Ramírez R. G, B.K.G., Kempermann G. (2007). Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: Neurogénesis. Salud Mental 30, 12-19.
145. Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96, 25-34.
146. Rao M., C.M., Vemuri M. (2012). Neural Development and Stem Cells.(EUA: Springer).
147. Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M., et al. (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. Cancer cell 13, 272-286.
148. Guo, F., Han, X., Zhang, J., Zhao, X., Lou, J., Chen, H., and Huang, X. (2014). Repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation via the regulation of MiR-25 in a rat model of focal cerebral ischemia. PloS one 9, e109267.
149. Suda, S., Iwata, K., Shimmura, C., Kamenno, Y., Anitha, A., Thanseem, I., Nakamura, K., Matsuzaki, H., Tsuchiya, K.J., Sugihara, G., et al. (2011). Decreased expression of axon-guidance receptors in the anterior cingulate cortex in autism. Molecular autism 2, 14.
150. Borrell, V., Cardenas, A., Ciceri, G., Galceran, J., Flames, N., Pla, R., Nobrega-Pereira, S., Garcia-Frigola, C., Peregrin, S., Zhao, Z., et al. (2012). Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. Neuron 76, 338-352.
151. Anselmo, M.A., Dalvin, S., Prodhan, P., Komatsuzaki, K., Aidlen, J.T., Schnitzer, J.J., Wu, J.Y., and Kinane, T.B. (2003). Slit and robo: expression patterns in lung development. Gene expression patterns : GEP 3, 13-19.
152. Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chedotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. Development 137, 1939-1952.
153. Sundaresan, V., Chung, G., Heppell-Parton, A., Xiong, J., Grundy, C., Roberts, I., James, L., Cahn, A., Bench, A., Douglas, J., et al. (1998). Homozygous deletions at 3p12 in breast and lung cancer. Oncogene 17, 1723-1729.
154. Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., et al. (2003). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. Cancer cell 4, 19-29.
155. Auerbach, B.D., Osterweil, E.K., and Bear, M.F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. Nature 480, 63-68.

156. Durand, C.M., Perroy, J., Loll, F., Perrais, D., Fagni, L., Bourgeron, T., Montcouquiol, M., and Sans, N. (2012). SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Molecular psychiatry* 17, 71-84.
157. Hutsler, J.J., and Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain research* 1309, 83-94.
158. Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2010). Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nature reviews Neuroscience* 11, 316-328.
159. Valnegri, P., Sala, C., and Passafaro, M. (2012). Synaptic dysfunction and intellectual disability. *Advances in experimental medicine and biology* 970, 433-449.
160. Carboni-Román A., d.R.G.D., Capilla A., Maestú F., Ortiz T. (2006). Bases neurológicas de las dificultades de aprendizaje. *Revista de neurologia* 42, S171-S175.