



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS Y SU RELACIÓN CON LAS VÍAS DE  
SEÑALIZACIÓN DE INFLAMACIÓN, AUTOFAGIA Y APOPTOSIS DURANTE EL PROCESO  
SARCOPÉNICO EN ADULTOS MAYORES”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:  
ARAMARA YASMIN ACO FLORES

TUTOR:  
DR. MIGUEL ÁNGEL FONSECA SÁNCHEZ  
SERVICIO DE MEDICINA GENÉTICA DEL  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

COMITÉ  
DRA. GLORIA E. QUEIPO GARCÍA  
SERVICIO DE MEDICINA GENÉTICA DEL  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

DR. JUAN ANTONIO GONZÁLEZ BARRIOS  
SERVICIO DE GENÓMICA DEL HOSPITAL 1° DE OCTUBRE

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. ENERO 2018



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.



## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	
1.	Envejecimiento.....	8
1.2	Sarcopenia.....	8
1.2.1	Fisiopatología de la sarcopenia.....	9
1.2.2	Cambios celulares.....	10
1.2.3	Cambios moleculares.....	10
2.	MiRNAs.....	12
2.1	MiRNAs y sarcopenia.....	16
3.	Antecedentes directos.....	17
<b>II.</b>	<b>Pregunta de investigación.....</b>	<b>19</b>
<b>III.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>20</b>
<b>IV.</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>22</b>
<b>V.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>23</b>
<b>VI.</b>	<b>Objetivo general y particulares.....</b>	<b>24</b>
<b>VII.</b>	<b>Tipo de estudio.....</b>	<b>25</b>
<b>VIII.</b>	<b>Muestra.....</b>	<b>25</b>
<b>IX.</b>	<b>Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....</b>	<b>26</b>
<b>X.</b>	<b>Material y Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>XI.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>XII.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>49</b>
<b>XIII.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>XIV.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## ABREVIATURAS

<b>CT</b>	.....	ciclo threshold (ciclo umbral)
<b>DEXA</b>	.....	Absorciometría radiológica de doble energía
<b>DGCR8</b>	.....	DiGeorge syndrome critical region 8
<b>DNA</b>	.....	Ácido desoxirribonucleico
<b>EWGSOP</b>	.....	European Working Group on Sarcopenia in Older People
<b>g</b>	.....	gramo
<b>min</b>	.....	minuto
<b>ml</b>	.....	mililitro
<b>µl</b>	.....	microlitro
<b>miRNA</b>	.....	microRNA
<b>ng</b>	.....	nanogramos
<b>OMS</b>	.....	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	.....	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RISC</b>	.....	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
<b>RNA</b>	.....	Ácido ribonucleico
<b>RQ</b>	.....	Relative quantification (cuantificación relativa)
<b>RT</b>	.....	transcripción reversa
<b>SPPB</b>	.....	Short Physical Performance Battery
<b>TLDA</b>	.....	Arreglos de baja densidad de sondas TaqMan

## FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Biogénesis de miRNAs.....	13
<b>Figura 2.</b> Cambios fisiopatológicos durante el envejecimiento muscular.....	17
<b>Figura 3.</b> miRNAs con expresión diferencial en adultos mayores frágiles.....	31
<b>Figura 4.</b> Gráfica de miRNAs modulados en adultos mayores frágiles.....	33
<b>Figura 5.</b> <i>Heatmap</i> (mapa de calor) de los miRNAs modulados en adultos mayores frágiles.....	40
<b>Figura 6.</b> Vía de señalización de MAPK.....	41
<b>Figura 7.</b> Vía de señalización de FOXO.....	42
<b>Figura 8.</b> Red de modulación génica.....	43
<b>Tabla 1.</b> miRNA modulados en cuádriceps de adultos mayores frágiles.....	34
<b>Tabla 2.</b> miRNA y su localización cromosómica.....	35
<b>Tabla 3.</b> Funciones biológicas de miRNAs en una misma localización.....	35
<b>Tabla 4.</b> Ejemplo representativo de genes blanco.....	37
<b>Tabla 5.</b> Genes modulados por miRNAs.....	38
<b>Tabla 6.</b> Vías de señalización de KEEG.....	38
<b>Tabla 7.</b> miRNAs que modulan los genes implicados en la vía mTOR-FoxO.....	44
<b>Tabla 8.</b> miRNAs que modulan genes de apoptosis, autofagia e inflamación.....	45
<b>Tabla 9.</b> Sitios de unión de miRNAs a genes de inflamación, autofagia y apoptosis.....	47
<b>Tabla 10.</b> Sitios de unión de los miRNAs a genes de la vía FOXO.....	48

## RESUMEN

**Introducción:** El envejecimiento es un proceso multifactorial caracterizado por multitud de cambios, entre los que se encuentran la pérdida de la masa muscular. El proceso en el cual disminuye la masa y función muscular es conocido como sarcopenia. Esta se acompaña de falta de actividad física, disminución de la movilidad, marcha lenta y mala resistencia física que son características del síndrome de fragilidad. Provocando la pérdida de independencia, disminución en la calidad de vida y aumento en la mortalidad; lo que conlleva una elevación en los costos de atención para una población de adultos mayores que se calcula alcanzara los 36.2 millones para el 2050 en nuestro país.

Dada la importancia de los procesos moleculares como la apoptosis, autofagia e inflamación en el desarrollo de la sarcopenia es importante evaluar los mecanismos que puedan estar modulando la expresión de moléculas participantes en estas vías de señalización, y que aún no han sido descritos, como son los microRNAs (miRNAs). La identificación de estas moléculas reguladoras nos permitirá el desarrollo de biomarcadores útiles para la identificación temprana de la sarcopenia.

El objetivo del trabajo fue: determinar los perfiles de expresión diferencial de miRNAs en cuádriceps femoral de adultos mayores frágiles con sarcopenia y de adultos mayores funcionales y establecer su relación con los procesos de apoptosis, autofagia e inflamación.

**Metodología:** Se extrajo el RNA de 10 biopsias de tejido muscular de cuádriceps de adultos mayores de 60 años frágiles con sarcopenia y de 10 adultos mayores sin el padecimiento. Se determinó la expresión diferencial en tiempo real de los miRNAs, utilizando la plataforma de arreglos de baja densidad de sondas TaqMan. Mediante análisis bioinformático se predijeron los blancos moleculares de los miRNAs modulados utilizando la plataforma Target scan y se terminó su ontología en la base de datos DavidOntology y KEEG, para finalmente obtener una simulación de la red de interacción génica.

**Resultados:** se encontraron 29 miRNAs (con al menos un Fold change de 2.0,  $p=0.05$ ) con expresión diferencial en el tejido muscular de adultos mayores frágiles (miR-1262, let-7c#, miR-576-3p, miR-1303, miR-941, miR-518a-3p, miR-542-3p, miR-302a#5p, miR-99b#3p, miR-454#5p, miR-875-5p, miR-548E5p, miR-874-3p, miR-92a-1#5p, miR-

586, miR-29b-1#5p, miR-506-5p, miR-936, miR-1283, miR-622, miR-1278, miR-92b#-5p, miR-587, miR-510-5p, miR-202#5p, miR-1250-5p, miR-933, miR-609, miR-554). Mediante Target scan se determinaron los blancos moleculares de todos los genes modulados, siendo un total de 15,810 genes. Para determinar su ontología elegimos los genes con mayor número de miRNAs modulándolos, con un punto de corte de 14. Así se analizaron 523 genes en la plataforma de David Ontology, dando como resultado 129 procesos en los que están involucrados; obteniéndose 52 vías de señalización mediante KEEG, de las cuales destacan 4 que ya han sido reportadas en el proceso de sarcopenia: oxitocina, mTOR, MAPK, FoxO, siendo la vía mTOR-FoxO una de las más importantes ya que es regulada por 16 miRNAs.

Por otro lado se determinó que los miRNAs identificados regulan 10 genes de inflamación, apoptosis y autofagia con expresión diferencial en las biopsias de adultos mayores frágiles y funcionales que habían sido identificados previamente.

**Conclusiones:** En el proceso de sarcopenia desarrollado en adultos mayores frágiles participa la sobreexpresión de 29 miRNAs que regulan genes relacionados con la respuesta inflamatoria, autofagia y apoptosis a través de la inhibición de la vía de señalización intracelular IGF1-Akt-mTOR-FoxO.



# **“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CUADRICEPS Y SU RELACIÓN CON LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE INFLAMACIÓN, AUTOFAGIA Y APOPTOSIS DURANTE EL PROCESO SARCOPÉNICO EN ADULTOS MAYORES”.**

## **I. Introducción**

### **a. Envejecimiento**

La población de adultos mayores está aumentando de forma importante, según datos de la OMS, de los 900 millones existentes en 2015 se proyectan 2,000 millones para 2050,(1) la importancia de este dato radica en prever las condiciones en las que llegará esta población. El envejecimiento es un proceso multifactorial, existe pérdida acelerada de las reservas del organismo, disminución de los sentidos, desgaste articular, disminución en la cognición y cambios en la composición corporal, alteraciones que influyen de manera importante en la calidad de vida. Desde 1976, Bernard Isaacs documentó los grandes gigantes en la Geriatria: las alteraciones en la visión y audición, inestabilidad y caídas, incontinencia, déficit cognitivo (demencia, delirium), todas condiciones presentes en los adultos mayores frágiles. La fragilidad es un estado de vulnerabilidad que aumenta el riesgo de presentar un deterioro funcional, hospitalización o muerte. (2) Identificada primeramente por Fried *et al*, quien desarrollo una herramienta de tamizaje al medir la fuerza muscular, la velocidad de la marcha, pérdida de peso, autoreporte de nivel de actividad y fatiga; con un puntaje de 0 correspondiendo a robusto, 1-2 prefrágil y de 3-5 frágil.(3)

### **1.2 Sarcopenia**

Uno de los principales determinantes de la fragilidad es la sarcopenia, un síndrome geriátrico que implica pérdida de masa muscular y de fuerza. Esto corresponde a los cambios en la composición corporal que observamos durante el envejecimiento, donde hay un aumento de la masa grasa y disminución de la masa ósea y muscular que se inicia entre los 20 y 30 años, con una pérdida de fuerza de alrededor del 1% al año, sin embargo, los cambios en la masa, potencia y fuerza son pequeños entre los 30 y 50 años,(4) después de esta edad la pérdida se acelera con una disminución

progresiva en el tamaño y número de las fibras musculares, resultando en una pérdida de 30% de la masa muscular a los 80 años.(5) Las consecuencias de la sarcopenia incluyen dificultad para la movilización, aumento en la incidencia de caídas y fracturas, reducción en la calidad de vida, mayor requerimiento de atención social y de salud, aumento de la morbilidad y mortalidad. (6)

La sarcopenia fue definida por el *European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSOP) en 2010, como la disminución progresiva y generalizada de la masa muscular más disminución de la fuerza o disminución del desempeño físico, con riesgo de resultados adversos como discapacidad, pobre calidad de vida y muerte. Para cumplir con la definición, la EWGSOP estableció puntos de corte para las mediciones de la masa muscular medida por bioimpedancia, absorciometría radiológica de doble energía (DEXA) o antropometría, la fuerza muscular mediante la medición de la fuerza de prensión con dinamómetro y el desempeño físico con el Short Physical Performance Battery (SPPB), velocidad de la marcha, y prueba levántate y anda.(7)

### 1.2.1 Fisiopatología de la Sarcopenia

Durante el proceso de la sarcopenia, tienen lugar una serie de cambios celulares, bioquímicos y moleculares que alteran la neurotransmisión y la modelación de la arquitectura muscular. Estos cambios son explicados en los párrafos siguientes y de manera general todos ellos son exacerbados por factores como la edad, la actividad física, el estrés oxidativo y padecimientos concomitantes como la falla renal crónica, insuficiencia arterial, diabetes y cáncer; condiciones frecuentes en los adultos mayores.(8)

Sus causas son complejas, se considera que no es una única, sino que están implicados en dicha pérdida una amplia variedad de procesos. Entre los factores implicados en la pérdida de masa y funcionalidad del músculo esquelético podemos destacar las alteraciones en la síntesis y degradación de proteínas, la inflamación, las alteraciones hormonales y la disfunción mitocondrial.(9)

### 1.2.2 Cambios celulares

Las alteraciones ocurridas durante el envejecimiento muscular incluyen la disminución de la masa, se ha detectado en humanos una reducción específica de las fibras tipo II. En los adultos mayores hombres se ha visto una atrofia severa de estas fibras incluso hasta convertirse en más pequeñas que las tipo I, teniendo consecuencias funcionales importantes, impactando en la fuerza muscular. Así mismo estas células musculares tipo II tienen una menor cantidad de células satélite (encargadas de la regeneración muscular) que además tienen una respuesta disminuida al crecimiento celular mediada por ejercicio de resistencia. El contenido de grasa inter e intra muscular aumenta con la edad en los humanos, esta infiltración está asociada a pérdida de la función muscular.(10) Existe una reducción en la capilarización del músculo, disminución de la velocidad y de la fuerza máxima.(11) Otro cambio demostrado en modelos de ratones es que con el envejecimiento hay un detrimento en las uniones neuromusculares, alterando la homeostasis del músculo.(10)

### 1.2.3 Cambios moleculares

No existe un simple mecanismo que pueda explicar la pérdida muscular asociada a la edad. Dentro de los mecanismos moleculares que pueden estar interviniendo en el desarrollo de sarcopenia, sin embargo se pueden mencionar: acumulación de citocinas proinflamatorias, aumento de la apoptosis, aumento de estrés oxidativo, desbalance entre las síntesis y degradación de proteínas como el incremento en el sistema proteosoma-ubiquitina y autofagia.

Las vías de señalización que conectan el sistema inflamatorio y la degradación muscular podrían ser la clave para revelar las interacciones posibles para la progresión de la sarcopenia. En la sarcopenia existe un estado subclínico de inflamación generado por citosinas proinflamatorias que aumentan la infiltración de células inmunes en las células musculares dañadas.(12) Estas citosinas además afectan el metabolismo proteico en el tejido muscular, resultando en la activación del catabolismo o regulando al alza vías inflamatorias como la NFκB y STAT3, que

aumentan la activación de sistemas de proteosoma-ubiquitina y autofagia. Las citosinas con mayor evidencia de intervención en la homeostasis muscular, la discapacidad y mortalidad relacionadas con el envejecimiento, son: el TNF- $\alpha$ , IL-6 y proteína C reactiva. (12)

La IL-6, la citosina de los gerontólogos, está involucrada en la activación de las vías de señalización que incluyen STAT3, MAPK/ERK, p38, miostatina y FoxO3. La sobreexpresión de IL-6 puede reducir la masa muscular y alterar la absorción de glucosa mediada por insulina.(12)

El TNF- $\alpha$  es una citosina implicada en la inflamación crónica, junto con la formación de IL-1 aumenta la gluconeogénesis, lipólisis y proteólisis acompañada de la disminución en síntesis de proteínas, lípidos y glucógeno en el músculo. También puede aumentar el catabolismo muscular al suprimir la vía Akt/mTOR, puede antagonizar los efectos anabólicos del factor de crecimiento de insulina-1 (IFG-1), induce la pérdida muscular al incrementar la apoptosis y degradación de miofibrillas. Se ha descrito, junto con su receptores solubles, como un importante biomarcador de pérdida de masa y fuerza del músculo envejecido.(12)

Aunque los mecanismos que causan la sarcopenia son aún desconocidos, un decline progresivo en el anabolismo, por reducción en la síntesis de proteínas y un aumento en el catabolismo por activación de vías de señalización de apoptosis pueden iniciar el proceso sarcopénico.(13)

La maquinaria apoptótica comprende proteínas reguladoras, endonucleasas, inhibidores de proteasa y enzimas proteolíticas, conocidas como caspasas. Cuando la señal de muerte celular se presenta se activan las caspasas efectoras (3, 6 y 7) que son responsables de la degradación celular y la fragmentación del DNA. La activación se da por vías principales, la extrínseca mediada por receptores en la superficie celular como los de TNF y la intrínseca donde participan las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Dada la naturaleza multinucleada de los miocitos, la

apoptosis se muestra con características únicas. La activación de la cascada apoptótica resulta en la remoción de manera individual de mionúcleos junto con una porción de sarcoplasma lo que produce atrofia en las fibras más que una pérdida total de células.(6)

A nivel molecular existe una significativa desregulación de la expresión génica muscular relacionada dependiente de la edad. La expresión de muchos genes a nivel muscular tiende a aumentar o disminuir entre la tercera y séptima década de la vida. (14) Se sugiere que las alteraciones en los RNAs reguladores de la expresión génica pueden tener un papel crucial en el proceso de envejecimiento.(10)

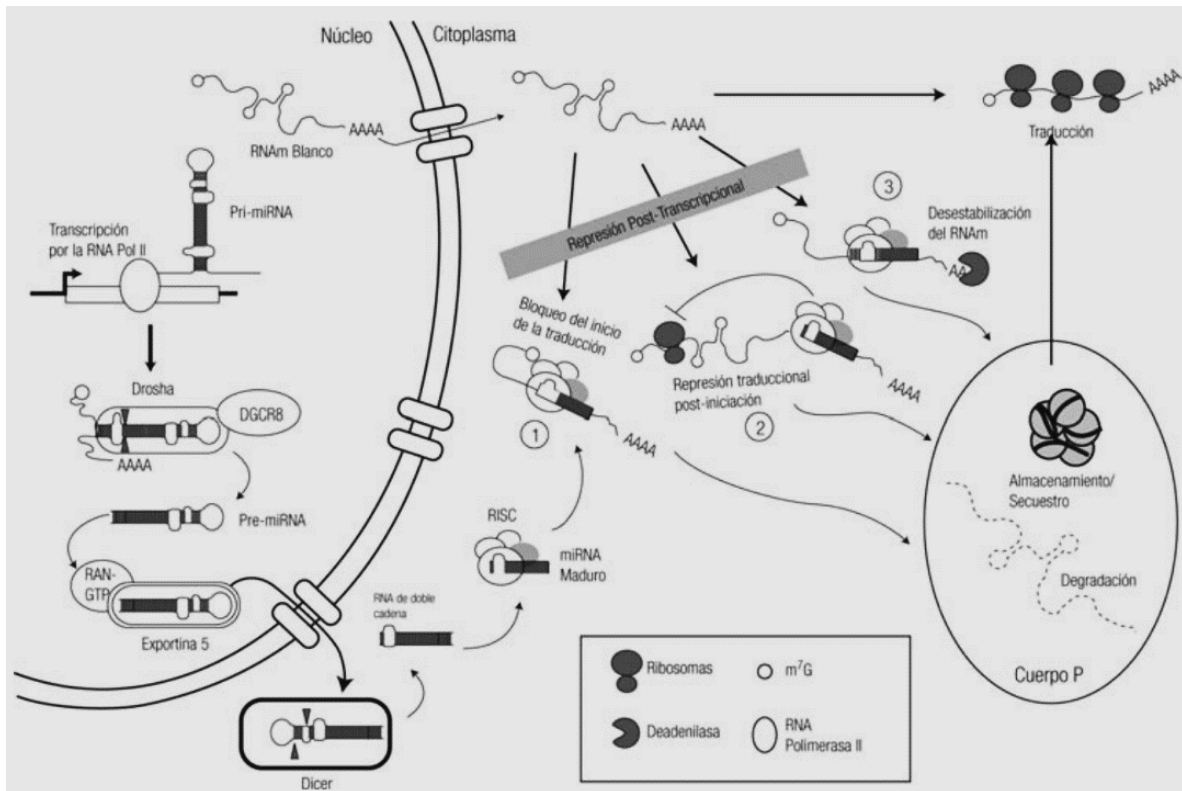
## 2. MiRNAs

La regulación de la expresión génica por lo microRNAs (miRNAs) es una clave en el desarrollo y la enfermedad muscular. Los miRNAs son RNAs no codificantes, endógenos, cortos (20-22 nucleótidos) que están involucrados en procesos biológicos como metabolismo, desarrollo, cáncer y envejecimiento.(15) Fueron identificados por primera vez en 1993 en el nemátodo *C elegans* y se calculan más de 2,558 moléculas distintas.(16)

Para entender la forma en que regulan la expresión génica es necesario conocer su biogénesis. La vía biosintética clásica o canónica implica la generación de un transcrito primario largo de aproximadamente 70 nucleótidos por una RNA polimerasa II, este es procesado en el núcleo por el complejo microprocesador: endonucleasa Drosha con la subunidad DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), formando el precursor, pre-miRNA que posee dos nucleótidos salientes en el extremo 5' terminal, que son necesarios para su reconocimiento y exportación hacia el citoplasma, por la exportina-5. Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es escindido por la enzima Dicer para generar el miRNA maduro esto permite el reconocimiento del pre-miRNA por el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). En este proceso el RNA dúplex es separado, una cadena es degradada,

mientras que la otra cadena es satisfactoriamente incorporada al RISC; esta última funciona como “guía” para identificar a los RNAm blanco, con el fin de que RISC actúe sobre ellos. El complejo RISC está constituido por varias proteínas, entre ellas Dicer, TRBP (transactivation-response element RNA-binding protein) y, principalmente, por las proteínas Argonata (Ago).(17,18) El miRNA reconoce la región 3’ guiado por el complejo, silenciando la expresión del blanco ya sea inhibiendo su traducción o degradándolo. La unión del miRNA a su blanco depende de la secuencia blanco (2-8 nucleótidos).(15) Esta se localiza en el extremo 5’ del miRNA, la definición de un sitio semilla canónico consiste en una A (adenina) en la posición 1 seguida de las bases complementarias en las subsecuentes 7 posiciones, lo que es útil para predecir los blancos.(19)

Figura 1. Biosíntesis de miRNAs. A. Procesamiento del miRNA, transcripción por una RNA pol II para formar un



pri-miRNA de 70 nucleótidos, formación del pre-miRNA por la enzima Drosha/DGCR8, salida del núcleo por la exportina 5, identificación por la enzima Dicer para formar el miRNA de doble cadena, el cual se une al complejo RISC como miRNA maduro monocatenario. B. regulación de RNAm. Unión de la región semilla del miRNA con su RNAm blanco produciendo inhibición de la traducción al bloquear su inicio (1), represión postiniciación (2) o desestabilización por deanonilación (3). C. Los RNAm pueden ser almacenados en los cuerpos P para permitir su traducción posterior o son degradados. Modificado de Lugo A et al., 2009.

Los miRNAs reprimen la expresión génica por medio de varios mecanismos de acción. Distintas líneas de evidencia indican que los miRNAs actúan en complejos efectores que son conocidos como miRNP, miRgonauta o miRISC, en donde las proteínas Argonauta (Ago) son los constituyentes más importantes. Las proteínas Ago están localizadas en regiones específicas del citoplasma denominados cuerpos-P (cuerpos de procesamiento de RNAm) estos sitios tienen una función central en la de los mRNAs blanco y en la inhibición de la traducción, también los RNAm pueden ser secuestrados y posteriormente liberados para su traducción. Se sabe que la represión de la traducción de proteínas es controlada al degradar al mRNA blanco, debido a su deadenilación (región 3' terminal) y/o modificación de la cap (extremo 5'; "decapping"); la ausencia de la cola de poli(A) y de cap induce la degradación del mRNA por exo y endonucleasas como Xrn1p y PMR1 (ribonucleasa polisomal 1), respectivamente.(18)

Los miRNAs tienen el potencial de elegir como blanco cientos de RNA mensajeros (RNAm) gracias a que la unión a este se da por complementariedad imperfecta. (19) Un miRNA puede regular múltiples RNAm, y un RNAm puede ser blanco de varios miRNAs.(15) Además un solo miRNA tiene la habilidad de tener funciones opuestas en diferentes sistemas, por lo que la descripción de un miRNA depende del contexto celular.(19) Esto crea un reto para identificar el rol funcional de los miRNAs, por lo que una forma de identificar la función es determinando la vía de señalización que puede estar modificando, usando métodos predictivos.(19) Cuando un miRNA actúa de manera coordinada con otros, produce una mayor represión del RNAm blanco. Los miRNAs que tienen gran similitud en su secuencia y estructura secundaria son considerados como miembros de una familia; se conocen al menos 195 familias conservadas entre los mamíferos. Gracias a estas similitudes los microRNAs en la misma familia frecuentemente tienen los mismos blancos lo que permite una represión más robusta de las vías de señalización.(19)

Los miRNAs están distribuidos en diversas localizaciones genómicas; algunos están solos pero aproximadamente 50% de los miRNAs se encuentran en clusters, como

transcritos policistrónicos.(15) 52% están localizados en las regiones intergénicas, 40% en las regiones intrónicas y 8% son exónicos. Los miRNAs se regulan de manera similar a otros RNA, como activación o inhibición de la transcripción, represión epigenética y degradación controlada. La vida media de los miRNAs es por lo general larga, muchos pueden persistir por 5 o más días.(19)

La nomenclatura de los genes de los miRNA es inconstante. Los primeros genes identificados se nombraron posterior a sus fenotipos, como lin-4, let-7 y lsy-6; mientras que los encontrados mediante clonación y secuenciación recibieron nombres numéricos como, mir-125. Los genes codificados de miRNA hermanos se indican con sufijos de letras como mir-125a y mir-125b. Si el mismo miRNA maduro es generado en múltiples loci separados, se utilizan sufijos numéricos al final del nombre, por ejemplo mir-125b-1 y mir-125b-2. Cada locus produce dos miRNAs maduros uno de la cadena 5´ y otro de la cadena 3´ del precursor, mir-125a-5p y mir-125a-3p. Sin embargo, un brazo (llamado la cadena guía) es usualmente más prevalente (96%-99%) y es más biológicamente activo que el otro brazo (conocido como miRNA\*).(16)

Los miRNAs se dividen en dos categorías: los tejido específicos que se expresan sólo en un tipo celular, por ejemplo músculo (myomiRs) y los que se expresan exclusivamente en tejido no muscular o de manera extensa en muchos tipos celulares.(20) Esto nos permite saber según el miRNA que tipo celular se está analizando, por ejemplo el miR-122 es el más conocido específico de hígado participando en el metabolismo del colesterol, carcinoma hepatocelular e infección de virus por hepatitis C.(19) Las dos categorías de miRNAs tienen un impacto significativo en la proliferación y diferenciación celular. Los myomiRs exhiben roles significativos y dinámicos en los procesos miogénicos, durante la embriogénesis y en los adultos al regular la quiescencia o diferenciación de las células satélite y así la homeostasis muscular.(10) miR-1, miR-206 y el miR-133 entran en esta categoría; este último aumenta la proliferación de mioblastos y disminuye la diferenciación, mientras que el miR-1 y el miR-206 realizan lo contrario.(21) En



ratones la inyección de miR-1, miR-133 y miR-206 favorecieron la regeneración de músculo dañado aumentando la expresión de marcadores miogénicos como miogenina y Pax7.(10) Adicionales a estos se encuentran los miR-208, miR-486 y miR-499 codificados en genes musculo específicos como ankyrina y cadena pesada de miosina.(21) Muchos miRNAs no específicos de músculo también se han implicado en la miogénesis. Por ejemplo, el gen Myf5 juega un papel importante para determinar que células satélites entran en proliferación o diferenciación y cuales permanecen quiescentes. miR-31 está presente en las células quiescentes e inhibe la traducción de Myf5.(20)

Aproximadamente 60% de los genes codificadores de proteínas pueden ser regulados por miRNAs. De tal forma que estos pueden influir en el fenotipo biológico al participar en el desarrollo, homeostasis, muerte celular, carcinogénesis y cambios relacionados a la edad.(21) Muchos trabajos han demostrado que varios miRNAs se expresan diferencialmente durante el envejecimiento y participan en procesos en tejidos y tipos celulares de manera específica. Algunos grupos han reportado el perfil de expresión en músculo con envejecimiento usando análisis de microarreglos. Por ejemplo, la familia let-7 están elevados en el músculo envejecido, contribuyendo a la reducción de la proliferación celular y la capacidad regenerativa. El envejecimiento altera la expresión de 57 miRNAs en cuádriceps de ratones y se ha sugerido que los miRNAs regulados por la edad disminuyen la proliferación y la diferenciación de precursores miogénicos.(15)

De manera adicional, se ha buscado relacionar la expresión diferencial encontrada en ratones con la encontrada en humanos. Al menos se han identificado 61 miRNAs relacionados con 10 diferentes grupos de enfermedades musculares en humanos, de estas, 8 se han encontrado en las dos especies, lo que implica una significativa relación entre los miRNAs modulados en roedores y en humanos. Esto no sólo implica que los modelos animales son útiles en el estudio de la patología muscular, sino que en efecto los miRNAs forman parte importante en la regulación del músculo(15)

## 2.1 MiRNAs y sarcopenia

Los miRNAs son un importante componente de los mecanismos biológicos de las células musculares, se ha identificado un rol potencial interviniendo en la homeostasis durante el envejecimiento, en la Figura 2 podemos observar algunos de los miRNAs que se han involucrado en los cambios musculares relacionados con la edad.

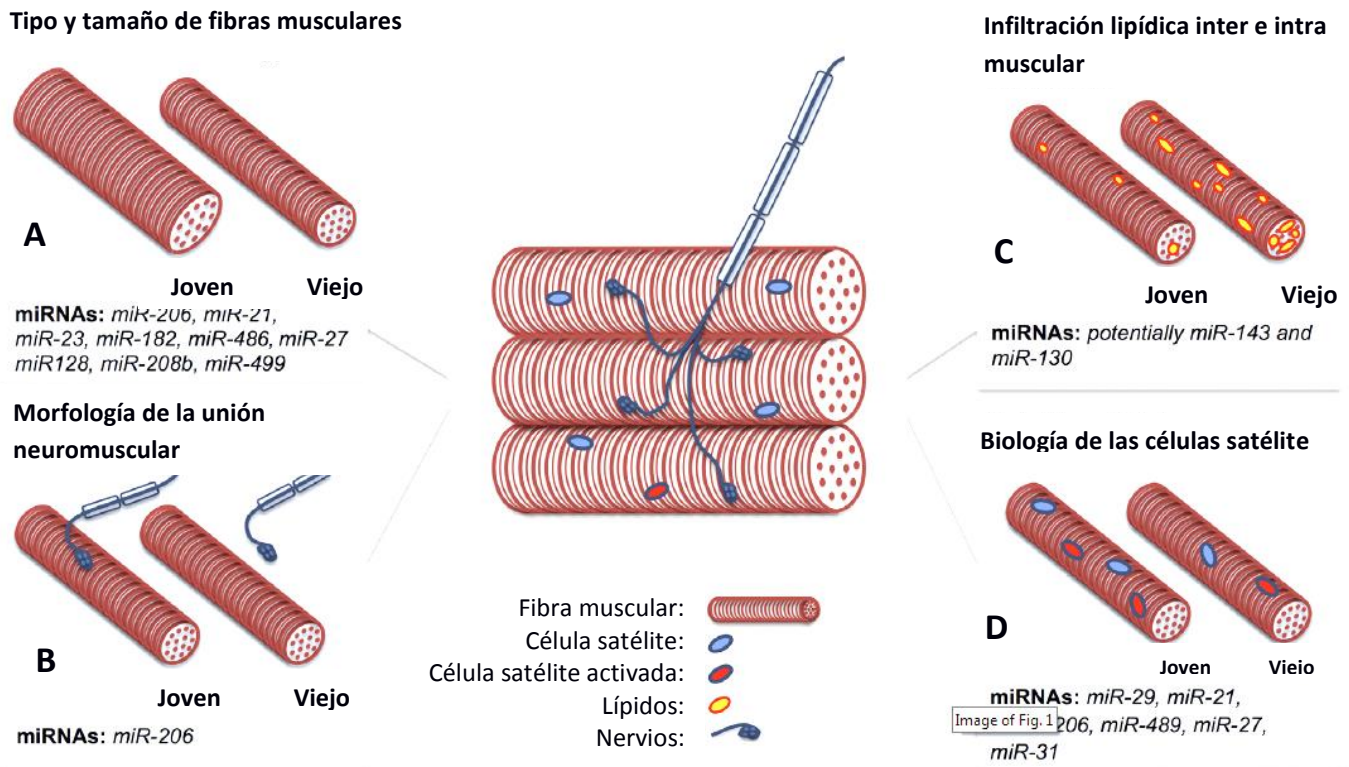


Figura 2. Cambios fisiopatológicos durante el envejecimiento muscular. A. Disminución de las fibras tipo II y transición a fibras contráctiles más lentas. B. desestabilización de la unión neuromuscular. C. Infiltración de lípidos. D. Disminución en el número y activación de células satélite. Se muestran los miRNAs que se conoce modulan estos procesos aunque no todos se han descrito durante el envejecimiento. Modificado de Brown et al., 2015.

Para aminorar los efectos de la sarcopenia es necesario conocer los mecanismos que la producen, hasta la fecha aún se desconoce la totalidad del proceso, por lo que se requiere el desarrollo de mejores herramientas de tamizaje, así como biomarcadores robustos que nos permitan identificarla.

### 3. Antecedentes directos

Nuestro grupo de investigación primero se dio a la tarea de determinar si la contractilidad contribuye en la sarcopenia; se encontró que a nivel clínico los pacientes no mostraban una correlación significativa entre la masa muscular y las pruebas de funcionalidad como la prueba de la silla y marcha a 4 metros, lo cual se podría esperar teniendo en cuenta la visión clásica de que es la masa muscular la responsable del desempeño físico, sin embargo, encontramos que la masa muscular no es la determinante, mientras que la fatiga muscular medida por electromiografía si mostró una relación; por lo que concluimos que en la sarcopenia un factor más importante que la pérdida muscular es la disminución en la contractilidad, lo que se traduce en cambios clínicos significativos en el adulto mayor.(22) En este orden de ideas se buscó la expresión de proteínas directamente relacionadas con la contractilidad como lo son la miosina, actina y serca. Encontramos mediante inmunofluorescencia una menor expresión de estas proteínas en tejido muscular de adultos mayores frágiles en comparación con funcionales, lo que sugiere que la reducción de estas proteínas en el músculo se relaciona con la menor contractilidad observada clínicamente. Estos antecedentes llevaron a proponer la determinación del perfil de expresión de RNA mensajeros de los procesos moleculares involucrados en el desarrollo de sarcopenia, encontrando que los genes que participan en apoptosis se encuentran sobreexpresados en adultos mayores frágiles posiblemente inducidos por factores de inflamación que también se encontraron sobreexpresados en este mismo grupo.

En este trabajo se pretende determinar que mecanismos moleculares que están modificando la expresión de los RNAm previamente analizados. Considerando la importancia que los miRNAs tienen como reguladores de la expresión génica, surge así nuestra pregunta de investigación.

## **II. Pregunta de investigación**

¿Existe una expresión diferencial de miRNAs en adultos mayores frágiles; y cuál es su relación con las vías de apoptosis, inflamación y autofagia, involucradas en el proceso sarcopénico?

### III. Justificación

Gracias al progreso médico, social y tecnológico, la cantidad de adultos mayores en la pirámide población se está incrementando, ya que están aumentando su expectativa de vida hasta los 80 años.(5) Se calcula que para el 2050 la población de adultos mayores en nuestro país podría alcanzar 36.2 millones de habitantes, más del 20% de la población total.

Establecer la prevalencia de sarcopenia aún es un reto de salud pública, esta dependerá de la definición y de las técnicas utilizadas en los estudios de referencia. Así, según la definición de Baumgartner *et al.* a partir de los datos del *New Mexico Elder Health Survey*, que utilizó la bioimpedancia para la valoración de la masa muscular, la sarcopenia afecta al 20% de los varones entre 70 y 75 años, al 50% de los de más de 80 años y entre el 25% y el 40% en las mujeres en las mismas franjas de edad. El mismo autor publicó datos de la misma población pero estudiada con DEXA, obteniendo datos del 8,8% en mujeres y el 13,5% en varones de 60 a 69 años, y del 16% en mujeres y el 29% en varones mayores de 80 años. En personas sanas que viven en la comunidad procedentes del estudio francés EPIDOS, el 10% de las mujeres tenían sarcopenia. El estudio NHANES III reporta que el 35% de las personas mayores tenían sarcopenia moderada y el 10% severa. Estos estudios se basan sólo en la medida de la masa muscular y no en definiciones que incluyan masa y función.(9) Se ha determinado también de acuerdo al tipo de población, en la comunidad hasta el 29% tiene sarcopenia, mientras que aquellas en asilos mostraron una prevalencia de 14% a 35%.(23) En el más reciente meta-análisis se determinó una prevalencia global para ambos sexos de 10%, aunque con una gran heterogeneidad entre los estudios.(24)

La sarcopenia representa un deterioro del estado de salud con un coste personal elevado: trastornos de la movilidad, mayor riesgo de caídas y fracturas, deterioro de la capacidad de realizar actividades cotidianas, discapacidad, pérdida de independencia y mayor riesgo de muerte.(7) Muchas de las consecuencias de la

sarcopenia son indicadores pronósticos de discapacidad, admisión a asilos, depresión y hospitalización. La mayor necesidad de cuidados se traduce en un incremento de los costos de atención. Tan sólo en Estados Unidos se ha calculado hasta un gasto de 18.6 billones de dólares anuales en la atención de la sarcopenia, con una estimación de más de 183 millones de dólares anuales tan sólo para atención especializada en domicilio.(8) Reduciendo 10% la prevalencia de sarcopenia resultaría en un ahorro de 1.1 billones de dólares anuales.(5)

#### **IV. Planteamiento del problema**

En la sarcopenia contribuyen varios factores: el proceso de envejecimiento a lo largo de la vida, influencias sobre el desarrollo en las etapas iniciales de la vida, una alimentación subóptima, el reposo en cama o sedentarismo, enfermedades crónicas y determinados tratamientos farmacológicos. Hay varios mecanismos que podrían intervenir en el inicio y la progresión de la sarcopenia. Estos mecanismos tienen que ver, entre otros, con la síntesis proteica, proteólisis, apoptosis, autofagia, integridad neuromuscular e inflamación. En una persona con sarcopenia pueden participar varios mecanismos y las contribuciones relativas pueden variar con el tiempo. Cabe esperar que la identificación de estos mecanismos y sus causas subyacentes facilite el diseño de ensayos de intervención en los que se actúe sobre uno o más de los mecanismos subyacentes.(7)

Sabemos que los miRNAs pueden participar en la regulación del tejido muscular, por lo que pudieran ser moduladores del proceso de sarcopenia, sin embargo, la expresión de miRNAs durante el envejecimiento y su relación con las vías de señalización implicadas en sarcopenia que ya hemos estudiado aún no han sido del todo descritos. A la fecha no existen herramientas que nos permitan la detección e intervención temprana para identificar la sarcopenia, ni contamos con los medios para diferenciar los mecanismos de envejecimiento muscular en los adultos mayores funcionales y los adultos mayores frágiles. La identificación de moléculas reguladoras como los miRNAs nos permitirá el desarrollo de biomarcadores gracias al reporte de la presencia de estos en la circulación convirtiéndolos en prometedores marcadores no invasivos de los procesos patogénicos en el músculo.(25) Así como el desarrollo de blancos terapéuticos como el miR-122 para hepatitis C o el miR-34 para tumores sólidos que ya están en estudios clínicos. (26)

## **V. Hipótesis**

Si los miRNAs participan en el proceso de la sarcopenia, al regular vías de señalización de inflamación, autofagia y apoptosis, entonces habrá una expresión diferencial de miRNAs en adultos mayores frágiles, con respecto a adultos mayores funcionales con al menos un índice de cambio de  $\pm 2$ .



## **VI. Objetivo general:**

Comparar los perfiles de expresión de microRNAs en cuádriceps de adultos mayores frágiles y adultos mayores funcionales y determinar su relación con las vías de señalización implicadas en el desarrollo de sarcopenia.

### **Objetivos particulares:**

- 1) Determinar el perfil transcripcional de los miRNAs, utilizando arreglos de baja densidad de sondas TaqMan (TLDA).
- 2) Realizar el análisis de predicción de los genes blanco de los miRNAs modulados, así como su análisis ontológico para determinar los mecanismos moleculares regulados por estos.
- 3) Construir una red de interacción génica entre las vías de señalización de inflamación, autofagia y apoptosis y los miRNAs que las modulen.

## VII. Tipo de estudio:

Observacional analítico, prospectivo, transversal.

Variable	Tipo	Definición operacional	Unidad de medida	Análisis estadístico
Expresión de microRNAs	Cuantitativa	Índice de cambio de $\pm 2$ con respecto al grupo control	Numeral Continua	t de Student

## VIII. Muestra

El presente proyecto forma parte del protocolo denominado: ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE LA EXPRESION DE MICRORNAS EN CUADRICEPS FEMORAL DE PERSONAS DE DISTINTOS GRUPOS DE EDAD Y DIFERENTE ACTIVIDAD FÍSICA Y SU RELACION CON EL PROCESO DE SARCOPENIA, DI/13/110B/05/092 (aprobado por los comités de Ética e Investigación del Hospital General de México).

La muestra se obtuvo por conveniencia, 20 pacientes distribuidos en un grupo de 10 adultos mayores frágiles, según los criterios de Fried(3) y 10 adultos mayores sanos. Para obtener las biopsias de tejido muscular de cuádriceps, se utilizaron los siguientes criterios:

## **IX. Criterios de selección**

Para obtener las biopsias de los adultos mayores:

### **De inclusión:**

1. Pacientes adultos mayores entre 75 y 90 años de edad, que firmen el consentimiento informado.
2. De ambos sexos, con cualquier índice de masa corporal.
3. Para el grupo de adultos mayores funcionales: aquellos que conservaran la capacidad de efectuar todas las actividades de la vida diaria, KATZ A y Lawton mayor de 6/8.
4. Para el grupo de frágiles con sarcopenia: además del compromiso para realizar las actividades de la vida diaria (KATZ B en adelante, Lawton menor de 6), se efectuó dinamometría incluyéndose aquellos con disminución de la fuerza por debajo del percentil 20, y aquellos con disminución de masa muscular acorde a la medición por tomografía computada.

### **De exclusión:**

1. Enfermedad sistémica no controlada con repercusiones a otros órganos que limiten la funcionalidad.
2. Historial de enfermedad con repercusión neurológica.
3. Osteoartrosis grado III en adelante por rayos X.
4. Que tomen estatinas.

### **De eliminación:**

1. No completar la evaluación clinimétrica.

Para incluir las muestras obtenidas bajo los criterios antes citados a nuestro proyecto de investigación, se especificaron los siguientes criterios:

**De inclusión:**

1. Muestras con in RIN (RNA Integrity Number sea igual o superior a 6).
2. Muestras con una densidad óptica (OD) 1.96-1.98.
3. Muestras con una concentración superior a 100 ng por microlitro.

**De exclusión:**

1. Muestras que no estén correctamente identificadas.

**De eliminación:**

1. Muestras degradadas.

## **X. Material y métodos**

### **1. Obtención de muestras de tejido muscular.**

Se utilizó material genético de las biopsias de tejido muscular de cuádriceps, bajo los criterios antes mencionados. Inmediatamente posterior a la extracción las biopsias fueron transportadas en hielo seco para ser preservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$

### **2. Extracción de RNA de biopsias musculares.**

Para obtener el RNA total, las muestras fueron lisadas con 1 ml de trizol por cada 100 mg de tejido, utilizando un homogenizador automático. El procedimiento se realizó en hielo, con 3-5 impulsos de 10 segundos a máxima velocidad y descansos de 20 segundos, evitando calentar la muestra. El lisado se recuperó en un microtubo y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente con el fin de disociar los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente, se agregaron 0.3 ml de cloroformo por cada ml de trizol y se mezclaron los reactivos por inversión durante 15 segundos. La reacción se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y centrifugó 12,000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior roja de fenol-cloroformo, una interfase (proteica) y una fase acuosa incolora. Se obtuvieron aproximadamente 400  $\mu\text{l}$  de la fase acuosa la cual contiene el RNA y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de isopropanol para precipitar durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, se realizó una centrifugación a 12,000 g durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 100%. Posteriormente, se realizó otra centrifugación a 12,000 g durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejará secar durante un lapso de 5 min. El RNA se resuspendió en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  de agua dpc o libre de nucleasas.

### **3. Cuantificación y evaluación de la calidad del RNA total purificado.**

La cuantificación del RNA total se realizó por espectrometría digital utilizando un equipo BioDrop  $\mu\text{LITE}$  (concentración máxima 2,500  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Las moléculas de RNA tienen una relación de densidad óptica 260/280 mayor de 1.8 lo cual indica que el RNA se encuentra limpio de proteínas que pudieran interferir con nuestros análisis o afectar la estabilidad del RNA. Las muestras seleccionadas cumplieron con este

criterio. Así mismo, la integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, esto con el fin de determinar la calidad de la extracción del RNA.

#### 4. Transcripción reversa (RT) de miRNAs.

Para obtener el perfil de microRNAs en sarcopenia se realizó la RT de miRNAs de los tejidos musculares mediante el uso del pool de primers stem-loop RT Megaplex (Applied Biosystems), que permiten la conversión a cDNA de cientos de miRNAs maduros en una sola reacción. De manera inicial, 3  $\mu$ l (60-100 ng/ $\mu$ l) de RNA total, fueron sumados a la mezcla que contiene: 0.80  $\mu$ l de primers RT Megaplex 10X; 0.20  $\mu$ l de dNTPs con dTTP (100mM); 1.5  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa MultiScribe (50 U/  $\mu$ l); 0.80  $\mu$ l de buffer RT 10X; 0.90  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0.10  $\mu$ l de inhibidor de RNasa (20 U/  $\mu$ l) y 0.20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de RNasa, que en total suman 7.5  $\mu$ l por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min en hielo. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Veriti 96 Thermal Cycler (Applied biosystems), programando 40 ciclos de tres temperaturas a 16°C por 2 min; 42°C por 1 min; 50°C por 1 s; seguido de un paso de 85°C por 5 min y un paso final a 4°C $\infty$ .

#### 5. Preamplificación del producto de RT.

Con el fin de detectar miRNAs que presenten un nivel muy bajo de expresión, se realizó una preamplificación previa a la detección por PCR en tiempo real. Esta consistió en una mezcla de reacción que contenía: 12.5  $\mu$ l de la master mix TaqMan PreAmp (2X); 2.5  $\mu$ l de los primers Megaplex PreAmp (10X); 7.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2.5  $\mu$ l del producto de reacción, dando un volumen final de 25  $\mu$ l por reacción. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min en hielo. La reacción se realizó en un termociclador Veriti 96 Thermal Cycler, programando tres pasos a 95°C por 10 min; 55°C por 2 min; 72°C por 2 min; seguido de 12 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 segundos y 60°C por 4 min, posteriormente se continuo un paso de 99.9°C por 10 min y finalmente un paso de 4°C. El producto de la preamplificación se diluyó con 75  $\mu$ l de TE pH 8.0, se almacenó a -20°C y se analizó mediante PCR en tiempo real.

#### 6. Expresión de miRNAs en sarcopenia.

Se analizó la expresión de miRNAs mediante el arreglo TaqMan MicroRNA Array v3.0 A+B de baja densidad, (TLDA, *TaqMan Low Density Array*) el cual contiene dos placas con sondas TaqMan conteniendo 754 miRNAs humanos más ocho controles internos, lo que permitió evaluar de manera confiable la expresión conjunta de los miRNAs en un solo experimento. Para esto, 9 µl del producto diluido de la preamplificación se mezclaron con 441 µl de agua libre de RNAsas más 450 µl del master mix TaqMan (Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, 2X). El análisis se realizó en un equipo 7900 FAST de Applied Biosystems, el cual posee un bloque especial de 386 pozos para PCR en tiempo real. Este equipo se encuentra en servicio en el Instituto Nacional de Medicina Genómica. La reacción se llevó a cabo programando un paso a 95°C por 10 min; seguido de 40 ciclos de dos temperaturas 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 min.

#### 7. Análisis del perfil de expresión.

Los resultados de la reacción de PCR se capturaron con el software S.D.S 2.4, lo que nos permitió tener los valores crudos de CT (Ciclo Treshold) de cada detector contenido en el arreglo. Se utilizó el método de lectura RQ (Relative Quantification), ajustando los parámetros con una línea de corte manual de 0.2 y una línea basal automática, acorde a las instrucciones del fabricante. Estos datos fueron procesados en los programas RQ Manager 1.2.1 (para realizar la conversión de datos en un archivo de texto) y DataAssist 2.0 ambos de Applied Biosystems. Este permitió definir la lista de miRNAs con expresión diferencial utilizando el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Se consideró como miRNAs con expresión diferencial aquellos que obtuvieran un índice de cambio de  $\geq 2$  con respecto al control y que tengan una confianza estadística 95% o valor de *P* de 0.5.

#### 8. Análisis bioinformáticos.

La información obtenida de los miRNAs modulados diferencialmente se recopiló de diversas bases de datos. Para el análisis de enriquecimiento y ontología realizado con las listas de los genes predichos como blancos de miRNAs obtenidos del

programa TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)), se utilizó la base DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). El análisis en DAVID se realizó con el identificador GENE SYMBOL, seleccionando el tipo de lista “Gene List”. Los resultados fueron depurados a genes para la especie *Homo sapiens* y se utilizó la herramienta de anotación funcional (Functional Annotation Tool). En este apartado se seleccionaron 1) las categorías funcionales SP\_PIR\_KEYWORDS, 2) la ontología génica (Gene Ontology) categorías; GOTERM\_BP\_FAT (Biological Process), GOTERM\_CC\_FAT (Cellular Component) y GOTERM\_MF\_FAT (Molecular Function) y 3) Rutas de señalización KEGG PATHWAY. El análisis de estos datos permitió realizar una aproximación del efecto que tiene la modulación de los microRNAs sobre diversas vías de señalización o procesos biológicos que participen en el establecimiento del proceso sarcopénico.

#### 9. Construcción de una red de interacción génica.

Se utilizó el listado de los RNAm blanco obtenidos por Targetscan, que estuvieran modulados por al menos 16 miRNAs, para conformar la red de interacción proteica en la plataforma *String protein*. Se indicó que la visualización de la red fuera en el rubro de *Settings* para el *minimum required interaction score: highest confidence* (0.900). Se eliminaron los nodos que no tuvieran una interacción.



## XI. Resultados.

### Perfil de expresión de miRNAs en tejido femoral de adultos frágiles.

Para obtener el perfil de expresión de los miRNAs en tejido muscular de cuádriceps de adultos mayores frágiles y funcionales, se realizó el análisis ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de los datos de expresión relativa de los miRNAs obtenidos mediante TLDA acorde a lo descrito en la metodología. Se encontraron 29 miRNAs (con al menos un Fold 2.0,  $p=0.05$ ) con expresión diferencial en el tejido muscular de adultos mayores frágiles.

Los 29 miRNAs que presentaron cambios significativos en su expresión fueron visualizados a través de un gráfico de volcán. Este es la representación de la tasa de valor de cambio expresada en ( $\log_2 RQ$ ) en relación con el valor de  $p$  (expresado en  $\log_{10}$ ), lo que nos permite ver los miRNAs que modulan su expresión por arriba de la línea de corte que en este caso fue de  $p=0.05$ . Con este tipo de gráfico visualizamos la totalidad de los miRNAs que se modularon en el perfil de expresión y los 29 miRNAs que superan la línea de corte con una tasa de valor de cambio  $\geq 2$  y un valor  $p=0.05$  (figura 3).

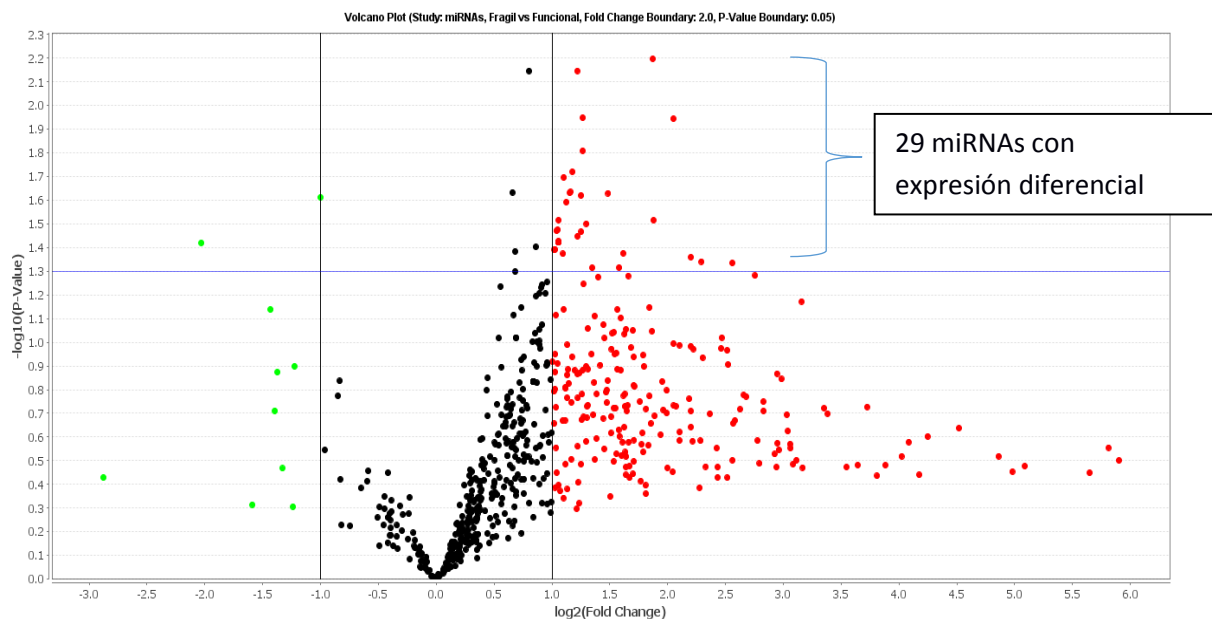


Figura 3. miRNAs con expresión diferencial en adultos frágiles. El gráfico de volcán muestra los 29 miRNAs con sobreexpresión diferencial significativa ( $p \leq 0.05$ ), con un índice de cambio  $\geq 2$  (expresado en log), en el cuadrante superior derecho (en rojo) y con expresión significativa a la baja índice de cambio  $\leq 2$  en el cuadrante superior izquierdo (verde).

Entre los miRNAs modulados significativamente figuran algunos previamente reportados en musculo como los miR-454, miR-1262 y miR-576 mientras que el resto no han sido reportados previamente en este tejido. Observamos en la siguiente gráfica los miRNAs modulados en adultos mayores con una  $p$  significativa menor de 0.05; mientras que en la Tabla 1 se muestra la lista de estos 29 miRNAs modulados con su valor de índice de cambio (Fold change RQ), el valor de  $p$ , y el *locus* o localización cromosómica y si existen reportes previos en musculo.

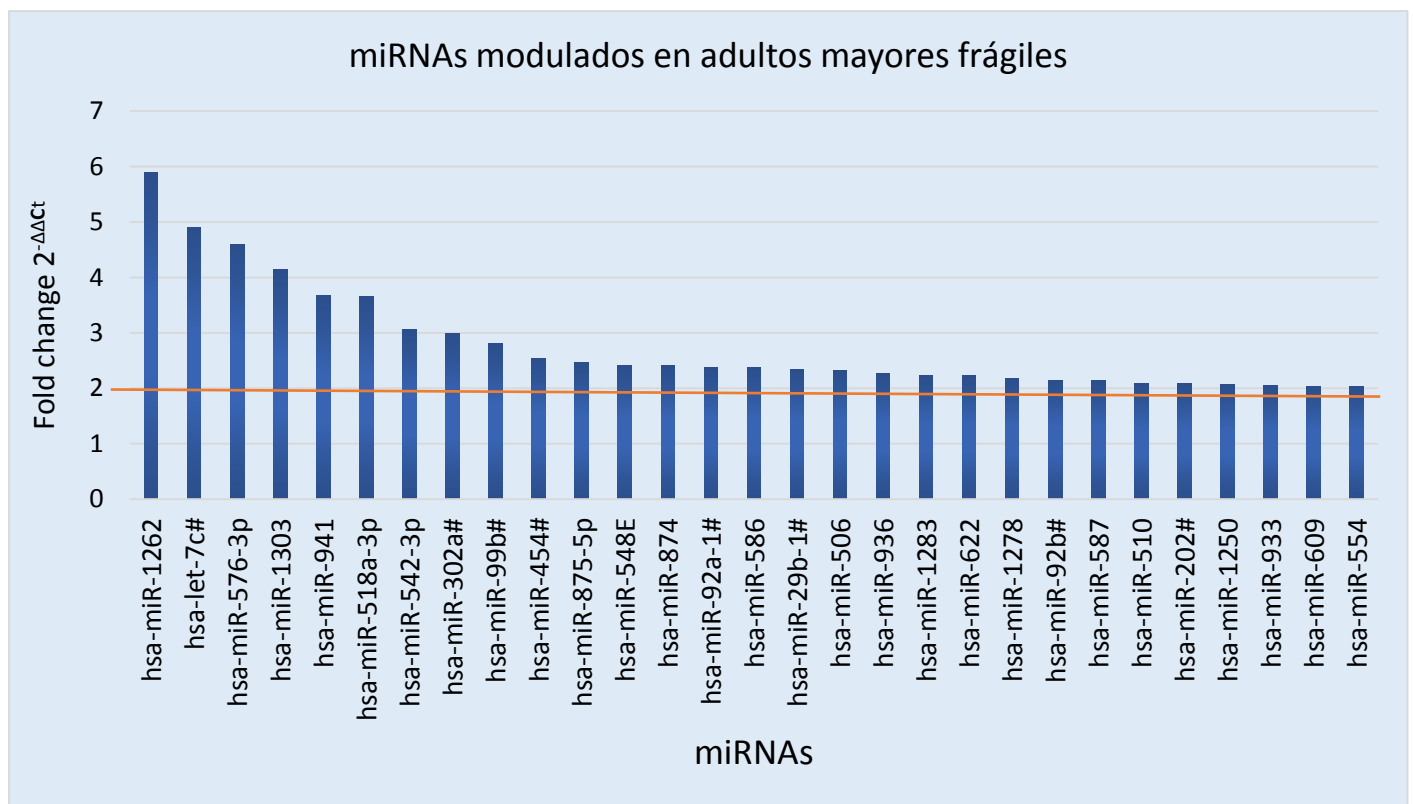


Figura 4. Gráfica de miRNAs modulados en adultos mayores frágiles. Se observa el Fold change mayor de 2 en todos los casos.

Tabla 1. miRNA modulados en cuádriceps de adultos mayores frágiles

miRNA	Fold change	p valor	Locus	Reportado en músculo
hsa-miR-1262	5.8931	0.0462	1p31.3	
hsa-let-7c#	4.899	0.0456	21q21.1	
hsa-miR-576-3p	4.5998	0.0437	4q25	
hsa-miR-1303	4.137	0.0114	5q33.2	
hsa-miR-941	3.6741	0.0305	20q13.33	
hsa-miR-518a-3p	3.6609	0.0064	19q13.42	
hsa-miR-542-3p	3.0628	0.0421	Xq26.3	
hsa-miR-302a#-5p	2.9931	0.0484	4q25	
hsa-miR-99b#-3p	2.8003	0.0235	19q13.41	Si
hsa-miR-454#-5p	2.5451	0.0485	17q22	Si
hsa-miR-875-5p	2.4591	0.0315	8q22.2	
hsa-miR-548E-5p	2.4066	0.0113	10q25.2	
hsa-miR-874-3p	2.406	0.0155	5q25.2	Si
hsa-miR-92a-1#-5p	2.3842	0.0341	13q31.3	
hsa-miR-586	2.3827	0.024	6p21.1	
hsa-miR-29b-1#-5p	2.3315	0.0356	7q32.3	Si
hsa-miR-506-5p	2.3277	0.0071	Xq27.3	
hsa-miR-936	2.2627	0.019	10q25.1	
hsa-miR-1283	2.235	0.0232	19q13.42	
hsa-miR-622	2.2288	0.0234	13q31.3	
hsa-miR-1278	2.1816	0.0256	1q31.2	
hsa-miR-92b#-5p	2.1495	0.0201	1q22	
hsa-miR-587	2.1371	0.0423	6q21	
hsa-miR-510-5p	2.0817	0.0305	Xq27.3	
hsa-miR-202#-5p	2.0806	0.0373	10q26.3	
hsa-miR-1250-5p	2.0721	0.0335	17q25.3	
hsa-miR-933	2.0536	0.0338	2q31.1	
hsa-miR-609	2.0374	0.0404	10q25.1	
hsa-miR-554	2.0289	0.0407	1q21.3	

Posteriormente agrupamos los miRNAs de acuerdo a su localización génica. Ello nos permitió, por ejemplo, encontrar que 2 miRNAs con sobreexpresión se localizan en el cromosoma 13, específicamente en la región 13q31.3. La tabla 2 resume el número de miRNAs alterado en cada cromosoma.

Tabla 2. miRNA y su localización cromosómica

miRNA	Localización cromosómica
miR-576-3p miR-302a*5p	4q25
miR-92a miR-622	13q31.3
miR-506 miR-510	Xq27.3
miR-36 miR-609 miR-548E-5p	10q25.1 10q25.2
miR-29b miR-183	7q32.3 7q32.2

Para conocer si estos miRNAs podrían estar participando como un cluster, identificamos los genes blanco que coinciden de cada par de miRNAs en una misma localización, y realizamos su estudio ontológico, encontrando que sí tienen funciones biológicas relacionadas, como se puede observar en la Tabla 3.

miRNA	Localización cromosómica	Número de genes modulados	Funciones biológicas
miR-576-3p miR-302a*5p	4q25	1,780	Metabolismo de cisteína y metionina
miR-92a miR-622	13q31.3	1,235	Regulación del ion y canal del K
miR-506 miR-510	Xq27.3	487	Infección por HTLV Sinapsis dopaminérgica Vía AMPK Secreción de vasopresina
miR-36 miR-609 miR-548E-5p	10q25.1 10q25.2	3,516	Ácidos grasos Transportadores ABC Vía adipocitocina Secreción de bilis

miR-29b	7q32.3	221	Organización de los componentes celulares
miR-183	7q32.2		

Tabla 3. Funciones biológicas de miRNAs en una misma localización. Se observan el número de genes modulados de manera compartida y las funciones biológicas en las que están participando.

### Blancos predichos y validados de los miRNAs del perfil de expresión.

Cada miRNA puede tener cientos de RNAm blancos potenciales, por lo que podemos asumir que pequeños cambios en la expresión de miRNAs, tienen un importante efecto en múltiples rutas bioquímicas. Este panorama se complica aún más al asumir la corregulación de un grupo de miRNAs que actúen de forma coordinada para llevar a cabo la represión traduccional. Por lo cual la predicción de RNAm blancos de miRNAs es una labor compleja pero esencial para la comprensión del mecanismo de acción efectuado por estas moléculas. Existen diversos programas que pueden predecir los blancos potenciales de los miRNAs, entre ellos destaca la plataforma de Target scan ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)), la cual predice los blancos biológicos de los miRNAs al buscar la complementaridad entre la región semilla de los miRNA y los RNAm. A través de esta herramienta se obtuvieron los blancos potenciales de cada uno de los miRNAs enlistados en la tabla 1, encontrando un total de 15,810 genes modulados. A continuación, se muestra un resultado representativo de los resultados obtenidos.

miRNA	Posibles blancos (4,191 en total) y procesos biológico involucrados
miR-1262	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FOXI2: forkhead box I2 → regulación de la transcripción, regulación del promotor de la RNA polimerasa II.</li> <li>• MEIS3: meis homeobox 3 → regulación positiva de la transcripción y negativa de la vía apoptótica</li> <li>• ZNHIT1: zinc finger HIT-type containing → regulación de histonas</li> <li>• PLBD2: phospholipase B domain containing → metabolismo lipídico</li> <li>• CLCN6: chloride voltage-gated channel 6 → transportador de membrana de aniones, homeostasis del volumen celular.</li> <li>• LMOD2: leiomodín 2 → polimerización de filamento de actina, organización de sarcomera</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ETRF1: electron transfer flavoprotein regulatory factor 1 → transportador de electrones en la cadena respiratoria.</li> <li>• COL28A1: collagen type XXVIII alpha 1 chain → adhesión celular, regulación de peptidasa</li> <li>• HAX1: HCLS1 associated protein X-1 → regulación de filamentos de actina, del proceso apoptótico, reorganización del citoesqueleto de actina, regulación de mitofagia, diferenciación granulocítica, respuesta celular a citocinas</li> <li>• NCR3: natural cytotoxicity triggering receptor 3 → regulación de la respuesta inflamatoria, del sistema inmune, activación de células asesinas naturales y linfocitos T, adhesión y reconocimiento celular</li> <li>• USP14: ubiquitin specific peptidase 14 Proteólisis, catabolismo proteico dependiente de ubiquitina y proteosomal, regulación de quimiotaxis</li> </ul>
--	---

Tabla 4. Ejemplo representativo de genes blanco. Podemos observar algunos de los blancos para el miR-1262, se enlistan 11 de los 4,191 genes predichos, se menciona el símbolo, nombre y la función biológica a la que ha sido relacionado.

### **Vías de señalización afectadas por los miRNAs modulados en sarcopenia.**

Una parte importante de este proyecto fue conocer de qué manera los miRNAs pueden estar participando dentro del proceso de sarcopenia. Una aproximación a esto es determinar las funciones biológicas que los 29 miRNAs encontrados modulan de manera conjunta, para ello, de la totalidad de los blancos predichos se eligieron los genes que pueden ser blancos de al menos 14 de nuestros miRNAs, considerando que estos genes serían los mejores candidatos para explicar el fenómeno al tener mayor probabilidad de interacción con los miRNAs encontrados. De esta manera se seleccionaron 523 genes (Tabla 5) que fueron analizados en la plataforma de David Ontology (<http://david.niaid.nih.gov>), lo que nos permitió obtener el análisis de enriquecimiento y determinar así en donde participan, obteniéndose las siguientes 52 vías de señalización mediante KEEG (Tabla 6).

Genes	Número de miRNAs moduladores
IDS, Iduronate 2-Sulfatase	28
SLC5A3, Solute Carrier Family 5 Member 3	28
AGO3, Argonauta 3	25
STRN, Striatin	24
ZNF8, Zinc Finger Protein 8	24
DNAJC10, DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C10	21
LRRC40, Leucine Rich Repeat Containing 40	21
NCKAP1, NCK Associated Protein 1	21
TNRC6B, Trinucleotide Repeat Containing 6B	21
ALG14, ALG14, UDP-N-Acetylglucosaminyltransferase Subunit	20
CNKS3, CNKS3 Family Member 3	20
GRIN2B, Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B	20
KCNJ6, Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 6	20
KCTD16, Potassium Channel Tetramerization Domain Containing 16	20
RAP2B, RAP2B, Member Of RAS Oncogene Family	20
RASAL2, RAS Protein Activator Like 2	20
XKR4, XK Related 4	20
ZBTB37, Zinc Finger And BTB Domain Containing 37	20

Tabla 5. Genes modulados por miRNAs Se muestra los primeros genes de la lista de 523 modulados por la mayor cantidad de miRNAs.

#### Vías KEEG

Ras signaling pathway	Morphine addiction
P13K-Akt signaling pathway	Glycerophospholipid metabolism
MAPK signaling pathway	Glucagon signaling pathway
Focal adhesion	Estrogen signaling pathway
FoxO signaling pathway	Insulin resistance
Signaling pathway regulating pluripotency of stem cells	Cholinergic synapse
cGMP-PKG signaling pathway	Glutamatergic synapse
Rap1 signaling pathway	Vascular smooth muscle contraction
	AMPK signaling pathway

Oxytocin signaling pathway	Long-term depression
Calcium signaling pathway	Long-term potentiation
cAMP signaling pathway	Melanoma
Circadian entrainment	Chronic myeloid leukemia
Regulation of actin cytoskeleton	TGF-beta signaling pathway
HIF-1 signaling pathway	Insulin secretion
Dopaminergic synapse	Gap junction
Insulin signaling pathway	Prostate cancer
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	Circadian rhythm
mTOR signaling pathway	Aldosterone-regulated sodium reabsorption
Glioma	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)
Erb3 signaling pathway	Non-small cell lung cancer
GnRH signaling pathway	Pancreatic cancer
Retrograde endocannabinoid signaling	Amphetamine addiction
Choline metabolism in cancer	Fc epsilon RI signaling pathway
Renin secretion	Nicotine addiction
Prolactin signaling pathway	Pantothenate and CoA biosynthesis
Progesterone-mediated oocyte maturation	

Tabla 6. Vías de señalización de KEEG. Se muestran las vías de los genes modulados por al menos 14 miRNAs.

Con el fin de comparar los anteriores resultados obtenidos mediante David Ontology, utilizamos la plataforma de mirPath v.3 (<http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/>), en donde utilizando la base de blancos de microT-CDS obtuvimos las vías de señalización mostradas en el siguiente mapa de calor, destacamos la regulación por 5 miRNAs de la vía de señalización de TGF dentro de la cual se incluye la vía MAPK (Figura 5).

De la misma plataforma obtuvimos la esquematización de la vía de señalización de MAPK y de FOXO (Figura 6 y 7), en donde es posible apreciar la modulación de genes que participan en inflamación, apoptosis y autofagia por varios de nuestros miRNAs.



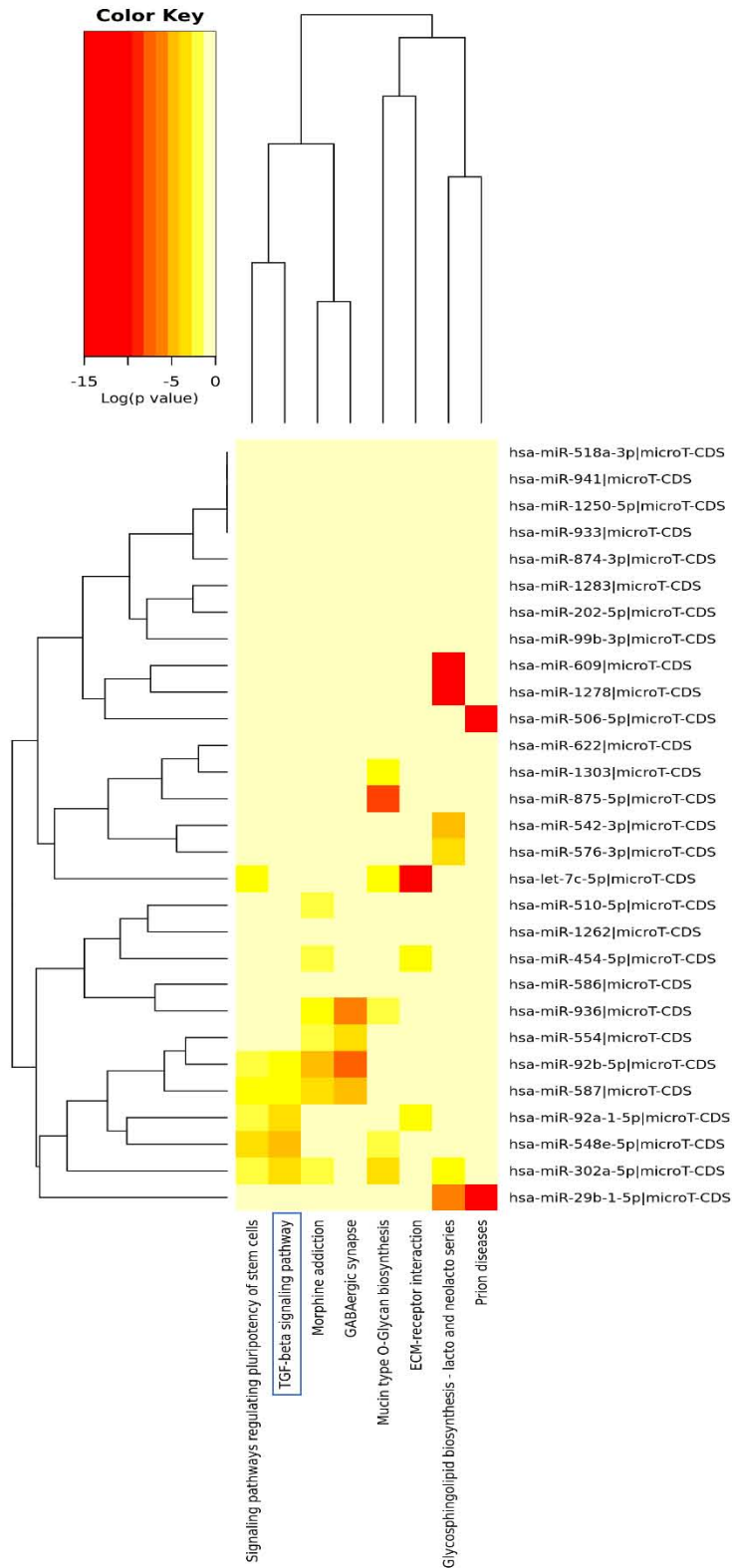


Figura 5. Heatmap (mapa de calor) de los miRNAs modulados en adultos mayores frágiles. Se destaca la vía de regulación de células progenitoras, la vía de señalización de TGF dentro de la que se encuentra la de MAPK.

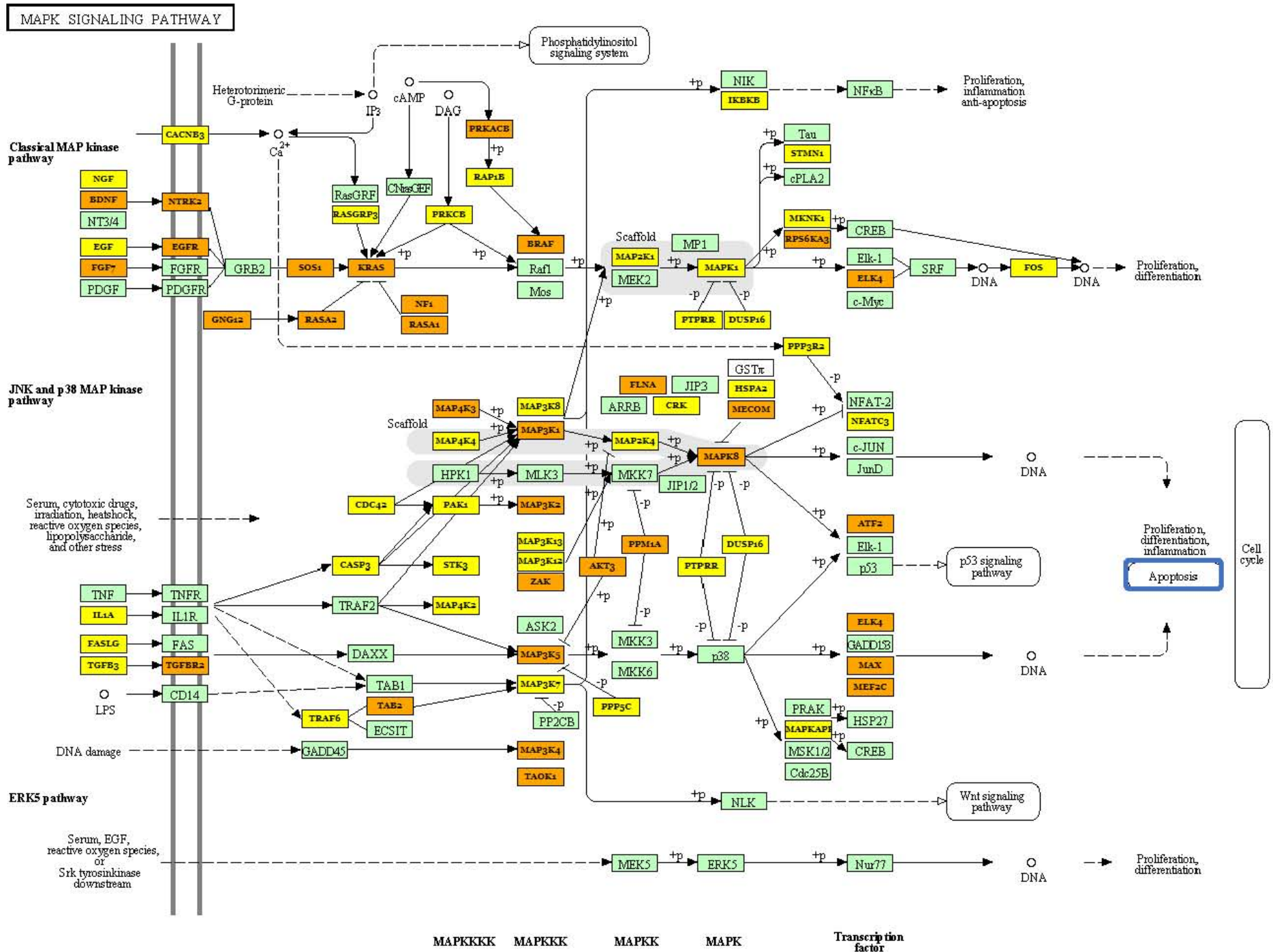


Figura 6. Vía de señalización de MAPK. Una de las vías Keeg que están siendo moduladas por miRNAs en adultos mayores frágiles. Los genes modulados por más de un miRNA se encuentran en anaranjado.

FOXO SIGNALING PATHWAY

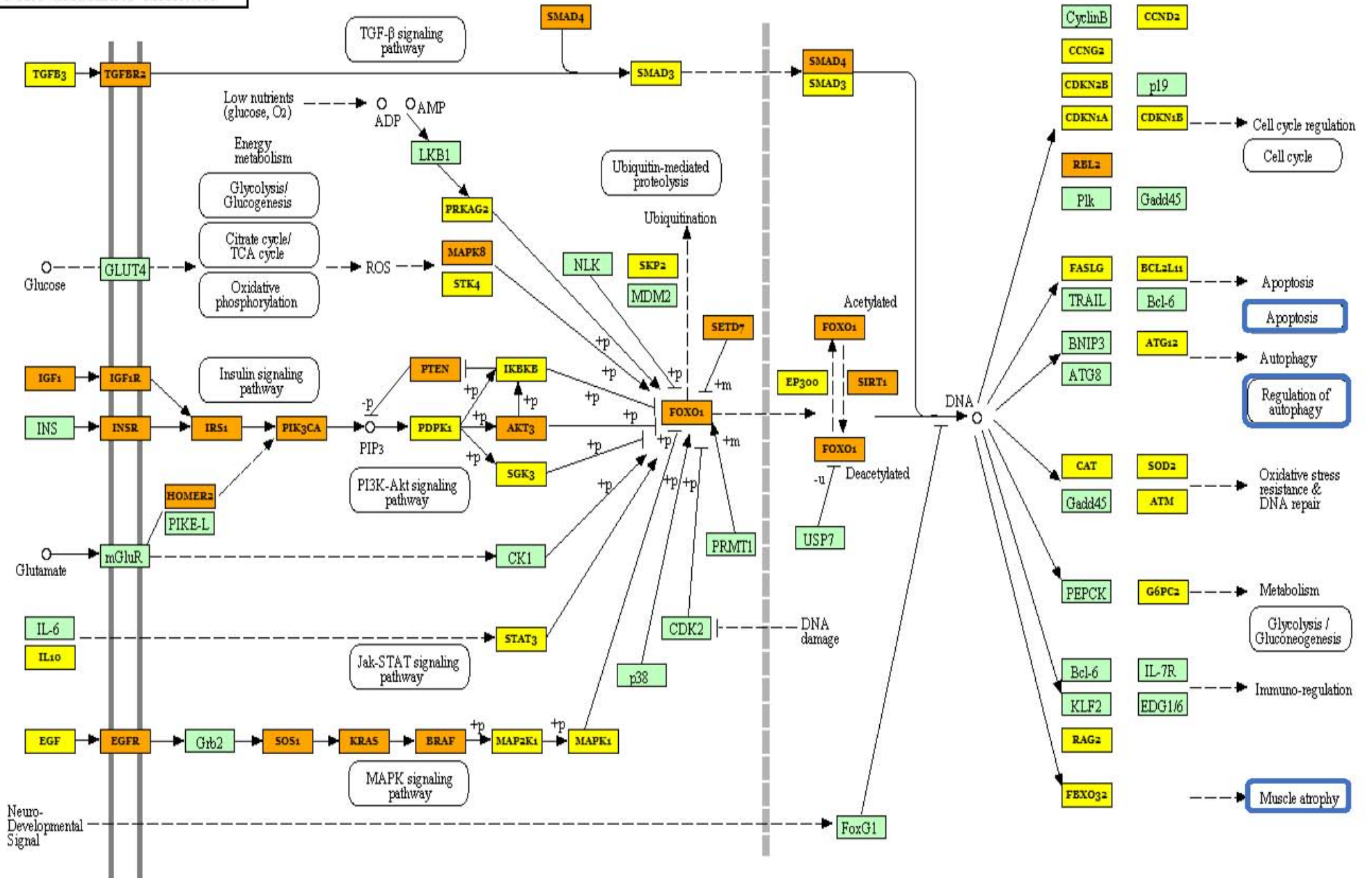


Figura 7. Vía de señalización de FoXO. Destaca la modulación de los genes IKBKB, AKT3, SGK3, MAPK1, (en amarillo modulación por un miRNA, en naranja más de 2), que incrementarían FoXO 1 y asu vez la apoptosis, autofagia y atrofia muscular.

## Red de interacción génica

Finalmente, modelamos una red de interacción génica entre los genes blanco modulados por los miRNAs que nos permitió visualizar su interacción en los diversos procesos biológicos que podrían dar lugar al desarrollo de la sarcopenia.

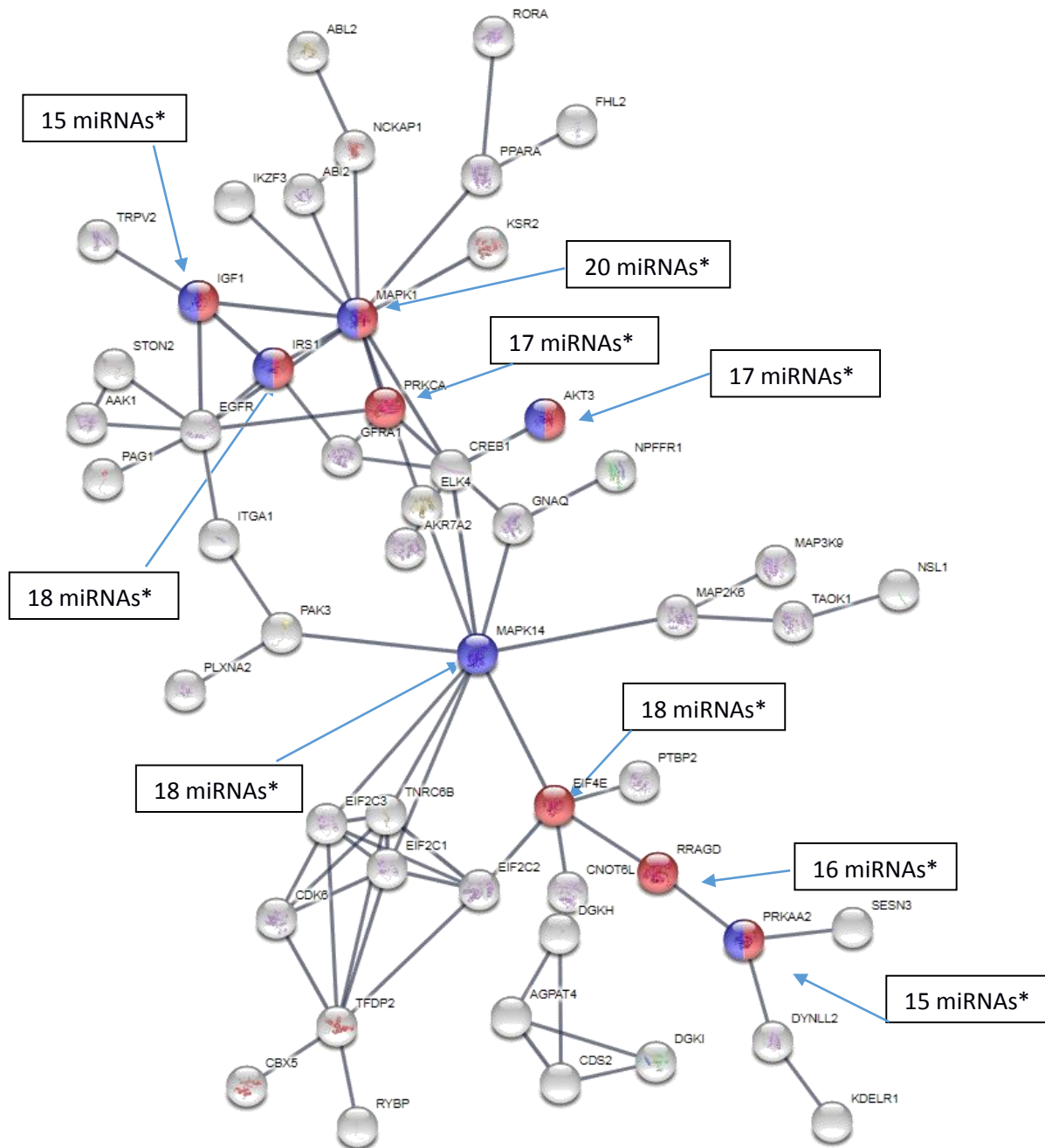


Figura 8. Red de modulación génica. Se observa la red con el destacamiento en rojo de la vía mTOR y en morado la vía FoxO, con la cantidad de miRNAs que las están modulando. \* para conocer los miRNAs involucrados ver la tabla 7.

Mediante la plataforma de String protein, que nos permite obtener el modelo a partir de una lista de genes, efectuamos el modelaje empleando la lista de genes modulados por los 16 miRNAs de tal forma que utilicemos los que tiene un mayor número de interacciones. El análisis obtenido nos indica que nuestra red tiene 375 nodos con una significativamente mayor cantidad de interacciones a la esperada por el azar entre un número de proteínas de tamaño similar. Este enriquecimiento indica que las proteínas en nuestra lista están conectadas biológicamente como un grupo.

IGF1	IRS1	MAPK1	PRKCA	AKT	MAPK14	EIF4E	RRAGD	PRKAA2
				miR-125b-5p	miR-125b-5p			miR-125b-5p
		miR-1250-5p	miR-1250-5p					
		miR-1262	miR-1262		miR-1262	miR-1262	miR-1262	
miR-1262	miR-1278	miR-1278	miR-1278	miR-1278	miR-1278	miR-1278		
miR-1283	miR-1283	miR-1283	miR-1283	miR-1283	miR-1283	miR-1283	miR-1283	miR-1283
miR-1303	miR-1303	miR-1303		miR-1303	miR-1303	miR-1303	miR-1303	miR-1303
	miR-183-5.2	miR-183-5.2						
	miR-183-5p.1		miR-183-5p.1					
		miR-193b-5p	miR-193b-5p		miR-193b-5p	miR-193b-5p	miR-193b-5p	miR-193b-5p
						miR-202*5p		
miR-29b-1-5p	miR-29b-1-5p	miR-29b-2*5p	miR-29b-1-5p	miR-29b-1-5p	miR-29b-1-5p	miR-29b-1-5p	miR-29b-2*5p	miR-29b-1-5p
miR-29b-2*5p	miR-29b-2*5p		miR-29b-2*5p	miR-29b-2*5p	miR-29b-2*5p	miR-29b-2*5p		miR-29b-2*5p
miR-302a*5p	miR-302a*5p	miR-302a*5p		miR-302a*5p	miR-302a*5p	miR-302a*5p	miR-302a*5p	miR-302a*5p
miR-36	miR-36	miR-36	miR-36	miR-36	miR-36	miR-36		miR-36
		miR-454*5p		miR-454*5p	miR-454*5p		miR-454*5p	miR-454*5p
		miR-518a-3p						
				miR-506-3p	miR-506-3p		miR-506-3p	miR-506-3p
miR-510-5p	miR-510-5p		miR-510-5p	miR-510-5p	miR-510-5p		miR-510-5p	miR-510-5p
miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p	miR-548E-3p
miR-554	miR-554	miR-554		miR-554		miR-554		
miR-576-3p	miR-576-3p	miR-576-3p		miR-576-3p		miR-576-3p	miR-576-3p	
miR-586	miR-586	miR-586	miR-586	miR-586		miR-586	miR-586	
miR-587		miR-587	miR-587	miR-587	miR-587	miR-587	miR-587	miR-587
miR-609		miR-609	miR-609	miR-609	miR-609	miR-609	miR-609	
	miR-622	miR-622	miR-622		miR-622	miR-622	miR-622	miR-622
	miR-875-5p							
miR-92a-1-5p	miR-92a-1-5p	miR-92a-1-5p	miR-92A-1-5p			miR-92a-1-5p		
	miR-99b*3p							
			miR-941					miR-941
					miR-92b-5p			
							miR-99b*3p	

Tabla 7. miRNAs que modulan los genes implicados en la vía mTOR-FoxO. Llama la atención los 3 miRNA que regulan todos los genes: miR-1283, miR-29b-1-5p y miR-548E-3p.

Con anterioridad, de las biopsias musculares, se obtuvieron 11 genes con expresión diferencial entre adultos mayores frágiles y funcionales, relacionados con apoptosis, autofagia e inflamación de los cuales 9 podrían estar siendo modulados por los miRNAs que hemos identificado en el presente estudio, tal como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. miRNAs que modulan genes de apoptosis, autofagia e inflamación

<b>GENES</b>	<b>MIRNAS</b>	
<b>CYLD</b>	miR-506-3p miR-1278 miR-936 miR-587 miR-92a-1-5p miR-1262	
<b>SYCP2</b>	miR-1278 miR-302a*5p	
<b>BCL2A1</b>	miR-587	
<b>MCL1</b>	miR-29b-1-5p miR-1278 miR-587 miR-125b-5p miR-1303 miR-92a-1-5p	miR-622 let 7c-3p miR-548E-3p miR-36 miR-510-5p miR-193b-5p
<b>IFNG</b>	miR-125b-5p miR-587	
<b>SNCA</b>	let 7c-3p miR-622 miR-1283 miR-302a*5p	
<b>MYC</b>	miR-302a*5p miR-586 miR-622 miR-454*5p miR-510-5p	miR-92a-1-5p miR-576-3p miR-193b-5p miR-29b-1-5p

<b>IL6</b>	miR-587 miR-302a*5p
<b>IL8</b>	miR-587 let 7c-3p miR-302a*5p

Para conocer en qué medida están siendo regulados los anteriores genes, mostramos en la siguiente tabla (Tabla 9) el número de sitios de unión de cada miRNA, siendo el miR-587 el que tiene un mayor número de sitios de unión y por lo tanto mayor participación en la regulación. Así mismo podemos apreciar en la Tabla 10 los sitios de unión de los miRNAs que están regulando genes de la vía FOXO, favoreciendo la expresión de FOXO1 y con ello la apoptosis y autofagia.

Genes con expresión disminuida	miRNAs sobreexpresados en adultos mayores frágiles															
	miR-506-3p	miR-1278	miR-936	miR-92a-1-5p	miR-587	miR-1262	miR-29b-1*5p	miR-586	miR-548E-3p	miR-1283	miR-193b-5p	miR-622	miR-510-5p	miR-302a-5p	miR-125b-5p	miR-1303
<b>CYLD</b>	1	1	2	1	3	1		3	2	2	2	2	1	2	2	
<b>SYCP2</b>		1				1								1		
<b>BCL2A1</b>					2											
<b>MCL1</b>	1	1	1	1	1		1		1	1		1	1		2	3
<b>IFNG</b>					1										1	
<b>SNCA</b>	1								1			2		1		
<b>MYC</b>	2			2	3				2	1	2	1	1	2		
<b>IL6</b>					4									1		
<b>IL8</b>					1									1		

Tabla 9. Sitios de unión de miRNAs a genes de inflamación, autofagia y apoptosis. Se muestra el número de sitios de unión de cada uno de los miRNAs en los genes blanco relacionados a inflamación, autofagia y apoptosis que se encontraron con expresión disminuida en cuádriceps de adultos mayores frágiles.



Genes modulados en la vía FOXO	miRNAs sobreexpresados						
	miR-874-3p	miR-454-5p	miR-936	miR-302a-5p	miR-548E-5p	miR-202-5p	miR-875-5p
<b>IKBKB</b>	2						
<b>AKT3</b>		1	1				
<b>SGK3</b>				1			
<b>MAPK1</b>					5		
<b>SETD7</b>						1	1

Tabla 10. Sitios de unión de los miRNAs a genes de la vía FOXO. Se muestra el número de sitios de unión de cada uno de los miRNAs en los genes blanco relacionados a inflamación, autofagia y apoptosis que se encontraron con expresión disminuida en cuádriceps de adultos mayores frágiles.

## **XII. Discusión:**

Con el propósito de ahondar en el conocimiento del proceso sarcopénico en adultos mayores, determinamos el perfil de expresión de los miRNAs en tejido muscular en un grupo de frágiles y otro de funcionales. Encontrando 29 miRNAs sobreexpresados diferencialmente en estos dos grupos de manera estadísticamente significativa, los cuales podrían estar participando en procesos que favorecen el desarrollo de sarcopenia y por consecuencia fragilidad.

De estos miRNA encontrados, al menos 4 se han identificado como participantes en patologías musculares. El miR-99b se ha reportado en biopsias musculares humanas, como un importante regulador de la masa muscular en jóvenes y adultos mayores.(27) Por otro lado el miR-874 se ha encontrado en el proceso de proliferación y diferenciación de la miogénesis en cultivos celulares.(28) Mientras que el miR-454 regula el gen CFL2 que es un marcador de daño muscular en la distrofia de Duchén y al gen CAPZA2 que regula el crecimiento de la actina. Y finalmente, el miR-29b-1 se ha reportado que promueve atrofia mediante IGF-1 y PI3K, su inhibición atenúa la atrofia inducida por denervación e inmovilización en cultivos celulares y en modelos de roedor.(29)

Con respecto a la localización cromosómica de los miRNAs encontrados, podemos observar algunos miRNAs localizados en la misma región cromosómica (Tabla 2), lo que nos abre la posibilidad de que realicen su función de manera coordinada en el establecimiento de la sarcopenia, similar a lo que ha sido descrito en cáncer de mama, donde algunos miRNAs localizados en un cluster regulan de manera coordinada procesos biológicos en la oncogénesis. (30) Siendo que un cluster de miRNA está definido como 2 o más miRNAs que se localizan a una distancia física cercana (tan poca como 10 kb), teniendo relaciones funcionales y evolutivas en común.(31) Nuestros resultados muestran que si hay procesos biológicos relacionados, aunque ninguno de ellos reportado con anterioridad en relación con

el proceso sarcopénico; nuestros hallazgos confirman la complejidad del proceso sarcopénico, donde son múltiples los procesos involucrados.

Para conocer la participación de estos 29 miRNAs sobreexpresados en adultos mayores frágiles, buscamos sus posibles blancos con la base de datos Target Scan 7.1, siendo 15,810 los genes modulados. Por mencionar un ejemplo, de los 4,191 posibles blancos para el miR-1262, encontramos genes involucrados en apoptosis como el MEIS3, en inflamación el NCR3, directamente relacionados con la composición de fibras contráctiles del músculo como la actina, los genes LMOD2 y HAX1, y con catabolismo proteico a través de ubiquitina descrito en sarcopenia con el gen USP14.

Para realizar un análisis más astringente de los blancos modulados, realizamos una selección de 523 genes que encontramos estaban modulados simultáneamente por al menos 14 de los miRNAs de nuestro perfil, siendo esta cantidad, la mitad de los miRNAs modulados, obteniendo así los genes con mayor posibilidad de regulación por los miRNAs modulados en adultos mayores frágiles.

De estos genes, no encontramos reportes previos que comprueben su participación en el envejecimiento, sin embargo, el que estén regulados por estos miRNAs puede sugerir una función distinta a la descrita actualmente, por lo que serían meritorios de efectuar más estudios al respecto.

Al analizar la ontología de los 523 genes seleccionados mediante David Ontology, obtuvimos 52 vías de señalización de KEEG. Dentro de la literatura especializada, podemos identificar que al menos 4 de las vías de señalización que encontramos reguladas por miRNAs, ya han sido reportadas en sarcopenia (oxitocina, MAPK, mTOR y FoxO). Así, se conoce que los niveles de oxitocina disminuyen con la edad, se ha demostrado en ratones que la inhibición de la oxitocina disminuye la regeneración muscular en jóvenes, y su administración mejora la regeneración mediante la activación/proliferación de células madre musculares a través de la

activación de la vía MAPK/ERK. La falta de oxitocina permite el desarrollo prematuro de sarcopenia. (32)

En el caso de la familia MAPK, esta juega un papel en el mantenimiento, proliferación, división y diferenciación de las células satélite musculares esenciales para el mantenimiento del musculo, teniendo un rol directo en la miogénesis. Las células musculares envejecidas tienen una alta actividad de la vía MAPK, cuando esta se corrige, se restablece la renovación de células satélite.(33)

Por otro lado se ha reportado que algunos miRNAs sirven como reguladores negativos de hipertrofia al degradar o reprimir la traducción de mTOR; en modelos celulares, la inhibición de mTOR disminuye la proliferación celular, mientras que en tejido muscular humano la disminución de miR-99 aumenta la señalización de mTOR prediciendo la respuesta al ejercicio de combate.(25)

Estos resultados coinciden con la modulación que encontramos de miRNAs a genes involucrados en la vía MAPK y que participan en la regulación de la apoptosis, tal como se puede apreciar en la Figura : los genes MECOM, MAPK8, AKT3, PPM1A, MAP3K5. Lo que nos sugiere una importante participación de los miRNAs en el establecimiento de la sarcopenia a través de la regulación de la expresión de estos genes.

En el caso de FoxO, se ha reportado que en ratones transgénicos que sobreexpresan FoxO, existe una regulación negativa de la masa muscular, disminución de fibras tipo I y alteraciones en su función.(34) Aunque hay estudios controversiales que señalan que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de esta vía, IGF1-Akt-mTOR-FoxO, entre adultos mayores activos y sedentarios, si se encontró que una activación drástica de esta vía puede resultar contraproducente, acelerando la sarcopenia en lugar de detenerla al alterar la vía de degradación proteica como es la ubiquitina. (35)

Al respecto, nuestros hallazgos también implican a la vía FoXO como participe de la sarcopenia en adultos mayores, siendo esta regulada por miRNAs. Así en la Figura podemos observar la ausencia de inhibición de la expresión de FoXO al modularse los genes IKBKB, AKT3, SGK3, MAPK1 y por consiguiente la activación de la apoptosis, autofagia y atrofia muscular.

Estos resultados nos permiten sugerir que dentro de los mecanismos involucrados en sarcopenia, existen vías como la de la oxitocina, MAPK, mTOR y FoxO que están regulados por miRNAs en adultos mayores.

Al realizar la red de modulación génica pudimos observar a su vez que se resalta la vía mTOR-FoxO involucrando a las proteínas: IGF1, IRS1, MAPK1, PRKCA, MAPK14, RRAGD, PRKAA2 y EIF4E, compartiendo una modulación por hasta 16 miRNAs iguales. De manera relevante, se conoce que mTOR es uno de los principales reguladores del crecimiento, virtualmente traduce todas las señales anabólicas como los nutrientes (glucosa y aminoácidos), factores de crecimiento (insulina y factor de crecimiento similar a la insulina), oxígeno, metabolitos mitocondriales y estatus energético. Se requiere la activación de mTOR para que la célula responda presentando crecimiento, proliferación, biosíntesis de moléculas y supresión de autofagia. PI3K-Akt integran las señales de factores anabólicos como IGF1 e insulina, regulando positivamente a mTOR.(35) La delección de PI3-K en el músculo por sí mismo da como resultado un tamaño muscular disminuido e ineficiente metabolismo muscular, y la inhibición de PI3-K o AKT previene los efectos anabólicos de IGF1 en células cultivadas. De hecho, un déficit relacionado con la edad en la activación de IGF1R se ha demostrado en el músculo de ratas viejas, y esto se asoció con una reducción actividad de la vía IRS-1/PI3-K.(36) A pesar de estos hallazgos, la forma en que mTOR esta desregulada en el envejecimiento muscular no es clara, pues mientras se podría postular que un defecto en su activación estaría asociada a atrofia muscular, se sabe que la restricción calórica que inhibe esta vía se asocia a un incremento en la sobrevivencia en modelos animales.(35)

En modelos de ratón se ha encontrado una regulación al alza de mTOR, desconociéndose la forma en que esto se correlaciona con la atrofia muscular durante el envejecimiento. Las posibilidades podrían ser que los tejidos se vuelvan resistentes a la acción de la vía mTOR, que existan otros mecanismos que se contrapongan a la vía o que se favorezca la retroalimentación negativa de la vía al inhibir IRS-Akt.(35) Contrario a estas observaciones de Sandri y cols, 2013, que no lograron encontrar diferencias en esta vía en biopsias humanas, nosotros encontramos que en adultos mayores frágiles con sarcopenia existe una importante regulación de esta vía por miRNAs lo que implicaría que esta vía si participa en el proceso sarcopénico relacionado a la edad en los humanos, coincidiendo con el hallazgo en la disminución de la actividad de Akt/mTOR/p70S6K1 en adultos mayores reportado por otros autores.(37)(38) Estas discrepancias podrían deberse a que en el estudio de Sandri se utilizaron muestras de adultos mayores sanos, si bien compararon entre sedentarios y activos, no lo hicieron entre pacientes con sarcopenia, así la regulación de esta vía posiblemente no explique la atrofia que de manera esperada ocurre con el envejecimiento, pero si la atrofia acentuada que lleva a la patología; también podría explicarse estos resultados por la variabilidad entre individuos.

En el mismo sentido, la vía de FOX regula importantes vías en la célula, la de proteosoma-ubiquitina y la del sistema de autofagia de lisosoma. Si bien se podría pensar que la inhibición de esta vía conduciría a la disminución de la masa muscular, se ha descubierto en ratones que la ausencia de los efectores de FOX produce un empeoramiento de la fuerza muscular, lo que sustenta el concepto de que esta vía es crucial para el manteniendo de la calidad de las proteínas sarcoméricas y por lo tanto debe mantenerse durante el envejecimiento. En humanos se ha descrito una mayor expresión de genes relacionados con autofagia entre individuos sanos jóvenes y sanos viejos pero sólo en mujeres.(35) De la misma forma nosotros destacamos la participación de la regulación de esta vía como parte del desarrollo de sarcopenia al encontrar sobreexpresión de miRNAs que la regulan en pacientes adultos mayores frágiles comparados con funcionales.

Por otro lado, siguiendo con nuestro análisis, buscamos identificar si los miRNAs encontrados modulan genes relacionados con apoptosis, autofagia e inflamación que previamente se habían hallado en el protocolo de investigación antes citado de donde procedieron las muestras de tejido muscular. Al menos 10 genes con expresión diferencial estadísticamente significativa entre adultos mayores frágiles y funcionales, están siendo modulados por los miRNAs identificados en nuestro estudio. Lo que recalca que son múltiples los procesos implicados en la sarcopenia en donde los miRNAs están participando de manera importante.

Resulta interesante que ninguno de los miRNAs enlistados en la Tabla 8 se han reportado en relación al proceso sarcopénico, a excepción del miR-29b del que hemos comentado en líneas previas. La sobreexpresión de este microRNA en ratones y cultivos celulares se ha reportado como suficiente para producir atrofia por estímulos como denervación, inmovilización, envejecimiento y dexametasona, así mismo su inhibición ha mostrado atenuación de la atrofia (29). Lo que lo constituye como un importante candidato a validación, al haberse encontrado ya en nuestro estudio en tejido muscular humano. Por otro lado los otros miRNAs señalados amplían nuestras posibilidades de explicar de una manera más completa el complejo proceso de la sarcopenia en adultos mayores.

En este estudio hemos analizado a nivel molecular el establecimiento de la sarcopenia, para llegar a un acercamiento a la patología muscular del adulto mayor que lo lleva a la incapacidad. Al identificar a los miRNAs como potenciales reguladores de la sarcopenia, nos permite tener candidatos para su validación y posterior búsqueda como biomarcadores a nivel sérico y/o como blancos terapéuticos.

### **XIII. Conclusiones:**

Se encontró la sobreexpresión de 29 miRNAs en el grupo de adultos mayores frágiles: miR-1262, let-7c#, miR-576-3p, miR-1303, miR-941, miR-518a-3p, miR-542-3p, miR-302a#5p, miR-99b#3p, miR-454#5p, miR-875-5p, miR-548E5p, miR-874-3p, miR-92a-1#5p, miR-586, miR-29b-1#5p, miR-506-5p, miR-936, miR-1283, miR-622, miR-1278, miR-92b#-5p, miR-587, miR-510-5p, miR-202#5p, miR-1250-5p, miR-933, miR-609, miR-554. Estos miRNAs pueden participar en el desarrollo de la sarcopenia a través de la regulación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, autofagia y apoptosis y de la inhibición de las vía de señalización intracelular IGF1-Akt-mTOR-FoxO.



#### **XIV. Bibliografía**

1. Inmujeres. Situación de las personas adultas mayores en México. 2015;1–40. Recuperado a partir de: <http://www.cepal.org/celade/noticias/paginas/7/53017/IrvingJaime.pdf>
2. Morley JE, Morley JE. Frailty and Sarcopenia : The New Geriatric Giants. *Rev Inves Clin*. 2016;68:59–67.
3. Fried, LP; Tangen, C; Walston J et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56:M1–11.
4. Naseeb MA, Volpe SL. Protein and exercise in the prevention of sarcopenia and aging. *Nutr Res [Internet]*. Elsevier Inc.; 2017;40:1–20. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2017.01.001>
5. Beaudart C, Rizzoli R, Bruyère O, Reginster J, Biver E. Sarcopenia : burden and challenges for public health. *Arch Public Heal*. 2014;72(45):1–8.
6. Marzetti E, Bernabei R. Apoptosis in Skeletal Myocytes : A Potential Target for Interventions against Sarcopenia and Physical Frailty – A Mini-Review. *Gerontology*. 2012;58:99–106.
7. Cruz, A; Baeyens JBJ et al. Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*. 2010;39(April):412–23.
8. Lang T, Streeper T, Cawthon P, Baldwin K. Sarcopenia : etiology , clinical consequences , intervention , and assessment. *Osteoporos Int*. 2010;21:543–59.
9. Cruz-jentoft AJ, Cuesta F, Gómez-cabrera MC, López-soto A, Masanés F, Matía P, et al. La eclosión de la sarcopenia : Informe preliminar del Observatorio de la Sarcopenia de la Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2011;46(2):100–10.
10. Brown DM, Goljanek-whysall K. microRNAs: Modulators of the underlying pathophysiology of sarcopenia? *Ageing Res Rev [Internet]*. Elsevier B.V.; 2015; Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.007>
11. Giresi, P; Stevenson, E; Theilhaber J et al. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics*. 2005;21:253–63.
12. Fan J, Kou X, Yang Y, Chen N. MicroRNA-Regulated Proinflammatory Cytokines in Sarcopenia. *Mediators Inflamm*. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:1–9.
13. Pardo PS, Hajira A, Boriek AM, Mohamed JS, Virginia W, Virginia W. MicroRNA - 434 - 3p regulates age - related apoptosis through eIF5A1 in the skeletal muscle. *Aging*

- (Albany NY). 2017;9(3):1012–29.
14. Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Thornton CA, Brooks AI, et al. Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol Genomics*. 2003;14:149–59.
  15. Ji, K; Young, P; Kwang L et al. Genome-wide profiling of the micro-RNA-mRNA regulatory network in skeletal muscle with aging. *Aging (Albany NY)*. 2014;6(7):524–44.
  16. Ha, M; Kim V. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509–24.
  17. Lugo-trampe Á, Trujillo-Murillo KC. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica Ángel. *Med Univ*. 2009;11(44):187–92.
  18. Ruiz-esparza R, Velázquez M. BIOGÉNESIS Y ACCIÓN DE LOS microRNAs. *Rev Educ Bioquímica*. 2016;35(3):55–70.
  19. Mott, J; Mohr A. Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis*. 2015;35(1):3–11.
  20. Wang X. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(3):258–66.
  21. Aoi W. Frontier impact of microRNAs in skeletal muscle research: a future perspective. *Front Physiol*. 2015;5(January):1–5.
  22. Rivera, J de J; Carrillo, JD; López, JC; Montes, M de L; Rodríguez, P; González, F; Jiménez, F; Queipo G. Muscular volume or fatigue: which is the most important feature for the evaluation of muscular performance in elderly adults? *J Am Geriatr Soc*. 2013;61(5):834–5.
  23. Cruz-Jentoft, A; Landi, F; Schneider S et al. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review . Report of the International Sarcopenia Initiative ( EWGSOP and IWGS ). *Age Ageing*. 2014;43(September):748–59.
  24. Shafiee G, Keshtkar A, Soltani A, Ahadi Z, Larijani B, Heshmat R. Prevalence of sarcopenia in the world : a systematic review and meta- analysis of general population studies. *J Diabetes Metab Disord. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*; 2017;16(21):1–10.
  25. Margolis, L; Lessard, S; Ezzyat Y et al. Circulating MicroRNA Are Predictive of Aging and Acute Adaptive Response to Resistance Exercise in Men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016;1–8.
  26. Simonson, B; Das S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini Rev Med Chem*. 2015;15(6):467–474.

27. Zacharewicz E, Gatta P Della, Reynolds J, Garnham A, Crowley T, Russell AP. Identification of MicroRNAs Linked to Regulators of Muscle Protein Synthesis and Regeneration in Young and Old Skeletal Muscle. *PLoS One*. 2014;2:1–25.
28. Picco R, Roma F, Colangelo V, Solda G, Ginelli E, Meneveri R. Next-Generation Sequencing Analysis of MiRNA Expression in Control and FSHD Myogenesis. *PLoS One*. 2014;9(10):1–14.
29. Li J, Chan MC, Yu Y, Bei Y, Chen P, Zhou Q, et al. miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;8(May):1–15. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15201>
30. Guo, L Yang SZH et al. Global analysis of miRNA gene clusters and gene families reveals dynamic and coordinated expression. *Biomed Res Int*. 2014:78249.
31. Guo LZYZH et al. Integrated evolutionary analysis of human miRNA gene clusters and families implicates evolutionary relationships. *Gene*. 2014;534(1):24–32.
32. Elabd C. Elabd, C. (2014). Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat Commun*. *Nat Commun*. 2014;
33. Bernet J. P38 MAPK signaling underlies a cell autonomous loss of stem cell self-renewal in aged skeletal muscle. *Nat Med*. 2014;265–271.
34. Kamei Y. Skeletal Muscle FOXO1 (FKHR) Transgenic Mice Have Less Skeletal Muscle Mass, Down-regulated Type I (Slow Twitch/Red Muscle) Fiber Genes, and Impaired Glycemic Control. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. *J Biol Chem*. 2004;1114–1123.
35. Sandri M. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology*. 2013;303–23.
36. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH / IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone : mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol*. 2010;205:201–10.
37. Pallacchina, G Calabria, E Serrano A et al. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(14):9213–8.
38. Léger, B Derave WDBK et al. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. *Rejuvenation Res*. 2008;11(1):163–75.