



# “Estudio sobre la regulación de la expresión de proteínas estructurales relevantes en la regeneración axonal”

Tesina de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización en Biología Molecular

Bach. Mathías Martínez Fernández

Orientador: Dr. José Roberto Sotelo-Silveira

Co-orientador: Lic. Joaquina Farías

# Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>I-Introducción</b>	2
<b>I.1-Respuestas fisiológicas frente a una lesión de nervio</b>	3
<b>I.1.1-Degeneración Walleriana</b>	3
<b>I.1.2-Regeneración</b>	5
<b>I.1.2.1-Citoesqueleto y Regeneración</b>	7
<b>I.2-Síntesis local de proteínas en el axón</b>	9
<b>I.3-Mecanismos post transcripcionales de regulación de la expresión génica:</b>	
Interferencia mediada por ARNs	10
<b>I.3.1-microARNs en dominios neuronales</b>	12
<b>I.3.2-microARNs en la regeneración nerviosa</b>	13
<b>I.3.2.1-Perfiles de expresión de miARNs durante regeneración de nervio ciático</b>	15
<b>I.4-Presentación del estudio</b>	18
<b>I.5-Hipótesis de trabajo</b>	19
<b>I.6-Objetivos</b>	19
<b>I.6.1-Objetivo general</b>	19
<b>I.6.2-Objetivos específicos</b>	19
<b>II- Metodologías</b>	20
<b>II.1-Herramientas empleadas</b>	20
<b>II.1.1-Herramientas para el análisis de datos de micro arreglos Affymetrix</b>	20
<b>II.1.1.1-Plataforma “mAdb”</b>	20
<b>II.1.2-Herramientas para el análisis de datos de micro arreglos Agilent de dos canales</b>	21
<b>II.1.2.1-R environment</b>	21
<b>II.1.2.2-Limma</b>	22
<b>II.1.3-Micro Arreglos de dos canales: Transformación y Normalización de datos</b>	22
<b>II.1.4-Herramientas para el análisis de datos de Secuenciación masiva de ARNs</b>	24
<b>II.1.4.1-CLC Genomics Workbench</b>	24
<b>II.1.5-Plataformas para la búsqueda predictiva de blancos de miARNs</b>	25
<b>II.1.5.1-miRWalk</b>	27

<b>II.1.5.2-TargetScan</b>	27
<b>II.2-Procedimientos experimentales</b>	28
<b>II.2.1-Búsqueda de correlación en los niveles de expresión entre ARNm codificantes para proteínas estructurales y miARNs con sitios de unión en los mismos</b>	28
<b>II.2.1.1-Análisis de datos de expresión de ARNm obtenidos con micro arreglos de plataforma Affymetrix</b>	28
<b>II.2.1.2-Análisis de datos de expresión de miARN obtenidos con micro arreglos de plataforma Agilent de dos canales</b>	30
<b>II.2.1.3-Búsqueda de correlación entre los comportamientos de ARNm y miARNs</b>	32
<b>II.2.2-Búsqueda de miARNs expresados diferencialmente en el cabo proximal de nervio ciático seccionado y evaluación de la representación de la función estructural dentro de sus blancos predictivos</b>	33
<b>II.2.2.1-Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con micro arreglos Agilent de dos canales</b>	33
<b>II.2.2.2-Análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños</b>	35
<b>III-Resultados</b>	38
<b>III.1-Búsqueda de correlación en los niveles de expresión entre ARNm codificantes para proteínas estructurales y miARNs con sitios de unión en los mismos</b>	38
<b>III.1.1-Análisis de datos de expresión de ARNm obtenidos con micro arreglos de plataforma Affymetrix</b>	38
<b>III.1.2-Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con micro arreglos de plataforma Agilent de dos canales</b>	46
<b>III.1.3-Búsqueda de correlación entre los comportamientos de ARNm y miARNs</b>	51
<b>III.2-Búsqueda de miARNs expresados diferencialmente en el cabo proximal de nervio ciático seccionado y evaluación de la representación de la función estructural dentro de sus blancos predictivos</b>	53
<b>III.2.1-Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con micro arreglos de plataforma Agilent de dos canales</b>	53
<b>III.2.2-Análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños</b>	55

<b>IV-Discusión</b>	61
<b>IV.1-Búsqueda de correlación entre ARNm codificantes para proteínas estructurales y miARNs con sitios de unión en los mismos</b>	61
<b>IV.2-Búsqueda de miARNs expresados diferencialmente en el cabo proximal de nervio ciático seccionado y evaluación de la representación de la función estructural dentro de sus blancos predictivos</b>	67
<b>IV.3-Aprendizaje del empleo de herramientas bioinformáticas de utilidad para la realización de análisis transcriptómicos y procesamientos de datos en general</b>	70
<b>V-Conclusiones y perspectivas</b>	71
<b>VI-Glosario de siglas empleadas</b>	72
<b>VII-Bibliografía</b>	73

## Resumen

La regeneración en el sistema nervioso periférico involucra mecanismos de interacción entre células y la matriz extracelular, que modulan procesos como la síntesis de proteínas en los componentes celulares gliales o neuronales. Recientemente se ha comenzado a estudiar cuál es la participación de los microARNs (miARN) en la modulación de la síntesis proteica durante el proceso de regeneración.

Nuestro grupo de trabajo empleó micro arreglos para estudiar los niveles globales de expresión de miARNs y ARNm durante la regeneración del nervio ciático. En esta Tesina, se buscó enfocar el análisis de los datos obtenidos en estudiar la influencia que tiene la regulación de la síntesis local de proteínas del citoesqueleto mediante miARNs. Para ello se analizaron tanto nuestros datos de expresión como aquellos generados por Yu y colaboradores (2011) mediante secuenciación masiva de ARNs pequeños. Se focalizó en la regulación ejercida por miARN sobre los genes que codifican para proteínas del citoesqueleto ya que el mismo participa activamente en el proceso regenerativo.

En primer lugar, los análisis de expresión de ARNm aportaron información acerca de la variación de los niveles de ARNm codificantes para proteínas citoesqueléticas entre los días 1 y 2 tras la lesión. Al comparar esta información con los niveles de miARN en dichas condiciones, se observó que existe una correlación inversa entre los niveles de Myo18a y Hook3 con algunos de los miARNs que potencialmente los regulan. En el caso de Myo18a se trata del miR-125a-5p, mientras que para Hook3 se encontró a miR-192, miR-194 y miR-203. Asimismo, se identificaron aquellos miARNs que se expresan diferencialmente en el cabo proximal del nervio lesionado en los días 1, 2 y 4 tras la lesión. Se encontraron expresados diferencialmente en más de un día los miR-146a, miR-22 y miR-100, a partir de los cuales una búsqueda predictiva de blancos mostró que las proteínas citoesqueléticas representan al menos el 10% del total.

En este estudio se logró obtener información acerca de la participación potencial de los miARNs en la regulación de la síntesis local de proteínas del citoesqueleto durante la regeneración nerviosa, aportando bases para la realización de estudios posteriores que profundicen en la participación de los miARN descritos en los procesos de regeneración axonal.

# I) Introducción

El axón es una estructura caracterizada no solo por su peculiar fisiología, sino también por su geometría y sus proporciones respecto al soma. Debido a estos aspectos, las neuronas poseen una gama de mecanismos que aseguran tanto su integridad estructural como su función. Cuando alguno de estos fenómenos falla, sobreviene la incapacidad de los axones para mantener su estructura. Este fenómeno es característico de diversos desórdenes neurodegenerativos tales como las enfermedades Alzheimer (Rasool et al, 2013) y Esclerosis Lateral Múltiple y Amiotrófica (Bossy-Wetzel et al., 2004). La incapacidad de los axones por mantener su estructura se vincula también con otras afecciones en las que se altera la eficiencia de la regeneración, como sucede en las neuropatías periféricas denominadas Charcot-Marie-Tooth (Rossor et al., 2013; Vallat et al., 2013). Los principios de la fisiología de la fibra nerviosa, sobre los cuales se basan esos desórdenes neurodegenerativos, aún no están bien comprendidos.

El proceso de regeneración nerviosa comprende mecanismos de interacción de células entre sí y con la matriz extracelular. Luego de una lesión en la fibra nerviosa, ocurre tanto en Sistema Nervioso Central (SNC) como en Sistema Nervioso Periférico (SNP) un proceso de degeneración del extremo del nervio separado del soma por la lesión. No obstante, en SNC tal proceso es sumamente lento y deficiente (Vargas y Barres, 2007). Esto pone de manifiesto que el proceso regenerativo-degenerativo implica mecanismos de regulación local. Un ejemplo de esos mecanismos es la expresión local de proteínas y los procesos regulatorios a la que está sometida. Tales fenómenos implican tanto a la glía como al axón. Estos mecanismos locales que operan durante la regeneración también participan, aunque a otra escala, en el mantenimiento de la estructura y la función axonal en condiciones normales (Koenig, 1991; Alvarez et al., 2000; Giuditta et al., 2002; Sotelo-Silveira et al., 2006).

La regulación post transcripcional de la expresión génica es un mecanismo de regulación que permite modificar los niveles de proteínas de forma independiente del núcleo. Este aspecto hace que sea importante estudiar este nivel de regulación en las prolongaciones neuronales. Particularmente, los microARNs (miARNs) han sido documentados como activos participantes de la regulación de la expresión génica tanto en dendritas como en axones, ya sea en condiciones fisiológicas normales como durante un proceso de regeneración-degeneración (Ver revisiones Kaplan et al., 2013 y Wu y Mursahov, 2013).

## **I.1) Respuestas fisiológicas frente a una lesión de nervio**

Las respuestas nerviosas que ocurren tras una lesión de los nervios han sido abordadas por científicos ya desde el siglo XIX. En esa época, dos corrientes contrapuestas de pensamiento intentaban dar respuesta a los fenómenos que acontecían en los nervios lesionados. Una de esas corrientes era la de los “monogenistas”, la cual era defendida por August Waller. En esta corriente se postulaba que tras una lesión de nervio, los axones conectados con el soma neuronal (cabo proximal) tenían la capacidad de permanecer funcionales, mientras que los axones que quedaban separados del soma por la lesión (cabo distal) perdían funcionalidad y degeneraban. La segunda corriente era aquella sostenida por los “poligenistas”, en la cual se sostenía que los axones de los cabos distales no perdían funcionalidad y que el proceso de regeneración involucraba un fenómeno de anastomosis entre ambos cabos del nervio separados por la lesión.

Los principios sostenidos otrora por los “monogenistas” son los que actualmente se alinean con concepción de los fenómenos que acontecen luego de una lesión nerviosa. En este marco, la Degeneración Walleriana descrita por Waller en el siglo XIX (Waller, 1850) continúa siendo foco de atención para científicos abocados al estudio de las respuestas nerviosas frente a una lesión (Ver revisiones: Vargas y Barres, 2007; Wang et al., 2012; Svenningsen y Dahlin, 2013; Beirowski, 2013).

### **I.1.1) Degeneración Walleriana**

Las lesiones de las fibras nerviosas pueden generar procesos degenerativos en los extremos nerviosos separados de los somas neuronales por la injuria (Segmento distal). Este fenómeno, denominado Degeneración Walleriana (DW), fue originalmente descrito por Waller (Waller, 1850) empleando como modelos de lesión la sección completa o aplastamiento de la fibra nerviosa. La DW es un proceso por el cual se eliminan los axones y restos de mielina del segmento distal del nervio lesionado (Waller, 1850; Vargas y Barres, 2007). Las lesiones pueden ser también inducidas por traumas metabólicos, tóxicos e inflamatorios o pueden asociarse a fenómenos genéticos (Stoll et al., 1989; Griffin et al., 1992; Coleman y Perry, 2002

La DW es un proceso que comprende una serie de eventos a nivel celular y molecular que comienza con la degeneración axonal. Una vez comenzado dicho proceso de degeneración, se incrementa la

permeabilidad de la barrera hemato-tisular, lo que favorece el ingreso de macrófagos que contribuyen a la eliminación de los restos de mielina (Nathaniel y Pease, 1963; Griffin et al., 1995).

Si bien tanto en SNC como en SNP ocurre DW, en SNC el proceso es lento y deficiente (luego de años tras la lesión aún se encuentran restos de mielina), sin conseguir remover por completo la mielina del extremo distal (Mikloosy y Van der Loos, 1991; Becerra et al., 1995; Buss et al., 2004). En cambio, en el SNP dicho proceso es más rápido y eficiente, de modo que entre los 7 y 14 días se logran eliminar considerablemente los restos de mielina del segmento distal (Griffin et al., 1992; George et al., 1994). La correcta remoción de la mielina es necesaria para que se produzca la regeneración. La ocurrencia de una relativamente rápida y efectiva DW en SNP genera un ambiente extracelular que favorece la regeneración. Mientras tanto, en el SNC la DW no es tan rápida ni efectiva, por lo que restos de mielina perduran por mayor tiempo impidiendo la regeneración. Esto se debe a que en la mielina se encuentran componentes inhibitorios de la regeneración axonal, tales como *myelin-associated glycoprotein* (MAG) (Mukhopadhyay et al., 1994, McKerracher et al., 1994); *Nogo A* (Chen et al., 2000, GrandPre et al., 2000, Prinjha et al., 2000); *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein* (OMgp) (Wang et al., 2002); *semaphorin 4D* (Sema4D) (Moreau-Fauvarque et al., 2003) y *ephrin B3* (Benson et al., 2005). Si bien estos componentes fueron identificados en SNC, también se observó la presencia en el SNP de MAG (Shen et al., 1998). Estudios realizados *in vitro*, en donde se purificó mielina a partir de nervios del SNP, demostraron que ésta tiene la misma capacidad inhibitoria que la poseída por la mielina del SNC, por lo que las diferencias en las capacidades regenerativas se vinculan con la remoción de los restos de mielina (Bahr, 1995; David et al., 1995).

Como se mencionó anteriormente, es necesaria la remoción de la mielina para que se pueda producir la regeneración y para esto es necesaria una participación activa celular: la actividad de los macrófagos y de las propias células formadoras de mielina.

En el caso del SNP, la Célula de Schwann (CS) desempeña un rol preponderante en la DW, participando tanto de la descomposición de la vaina de mielina como de la remoción de sus restos. Dentro de las primeras 12 horas tras la lesión, estas células reducen la síntesis de lípidos formadores de mielina, mientras que dentro a las 48 horas detienen la producción de proteínas que forman parte de la misma (White et al., 1989; Trapp et al., 1988). La vaina de mielina comienza su separación del axón a nivel de las Incisuras de Schmidt-Lanterman (Williams y Hall, 1971; Ghabriel y Allt, 1979). Posteriormente, la vaina rápidamente se segmenta y separa completamente del soma neuronal, dando lugar a la formación de los “ovoides de mielina” (Stoll et al., 1989). Las CS eliminan los restos de mielina de 3 maneras: degradación de su propia mielina, fagocitosis de restos de mielina



extracelular y presentación de los mismos a los macrófagos para que los fagociten (Holtzman y Novikoff, 1965; Han et al., 1989; Hirata et al., 1999).

En el caso de SNC, los Oligodendrocitos responden de una manera diferente durante la DW. La pérdida de contacto axonal y la ocurrencia de un proceso inflamatorio hace que los Oligodendrocitos no reciban señales de supervivencia, lo que promueve la muerte o quiescencia de los Oligodendrocitos (Barres et al., 1993).

La capacidad diferencial de regeneración que posee el SNP se vincula con la capacidad especial de la Célula de Schwann, ausente en los Oligodendrocitos, de colaborar en la eliminación de los restos de mielina que contienen los factores inhibidores de dicho proceso (Vargas y Barres, 2007).

### **I.1.2) Regeneración**

La regeneración axonal comprende mecanismos de interacción entre células y con la matriz extracelular. Como se mencionó en la sección anterior, la regeneración solo puede suceder con cierto grado de efectividad en el SNP, sin embargo no es del todo exitoso y eficiente como ha sido considerado (Smith et al., 2009; Tuszynski y Steward, 2012). Debido a esto, varios grupos de investigadores están trabajando en el desarrollo de nuevas estrategias moleculares y quirúrgicas para alcanzar mejores resultados en los tratamientos ya sea de enfermedades neurodegenerativas como de lesiones accidentales (ver revisiones Christie y Zochodne, 2013 y Hall, 2005).

Luego de una lesión axonal (axotomía) de neuronas periféricas, ocurren cambios morfológicos y moleculares en el pericarion que promueven la regeneración. Cuando ocurre la axotomía, un potencial retrógrado se dirige hacia el pericarion, el cual entra en un proceso de cromatolisis central que incluye un movimiento nuclear atípico y dispersión del retículo endoplásmico rugoso (Lieberman, 1971; Fu y Gordon, 1997).

Dentro de los cambios moleculares, se encuentran cambios en la expresión de genes que participan en el proceso regenerativo. Tales genes se conocen como “Genes asociados a la regeneración” (RAG). Aquellos genes que son necesarios para el crecimiento axonal aumentan su expresión. Ejemplos de éstos son la proteína asociada al crecimiento GAP/B50 y la proteína asociada al citoesqueleto 23 (CAP-23). Estas proteínas son responsables de la elongación y estabilidad del cono de crecimiento (Aloyo et al., 1982; Tetzlaff et al., 1989; Coggins y Zwiers, 1991; Strittmatter et al., 1994).

En este marco, se han desarrollado diversos estudios en los que se evalúan los perfiles de expresión génica mediante la cuantificación de la variación de los niveles de proteínas (Jiménez et al., 2005) y de ARNs mensajeros (ARNm) (Bosse et al., 2006; Li et al., 2013) en los nervios lesionados. Vale la pena mencionar que en las muestras de tejidos extraídas para los estudios *in vivo*, no solo se ven representadas neuronas sino que también CS. Por otra parte, también se realizaron estudios *in vitro* en los cuales se evaluaron los perfiles de expresión génica mediante la cuantificación de los niveles de ARNm en cultivos neuronales (Bosse et al., 2006; Szpara et al., 2007). Con estos se puede ver el comportamiento propiamente neuronal.

La regulación transcripcional de la expresión génica durante la regeneración es un fenómeno importante que ocurre tras la axotomía, pero no da cuenta de todos los cambios moleculares que ocurren en las neuronas. Dadas la geometría y dimensiones neuronales, se ha ido demostrando con el transcurso de los años que ocurre una síntesis proteica a nivel de los axones (síntesis local). Por ello, en dichas prolongaciones neuronales se encuentran presentes tanto la maquinaria básica para la síntesis proteica como los distintos tipos de ARNs que participan en la expresión génica y su regulación. En este contexto, la regulación de la expresión génica a nivel post transcripcional adquiere notoria importancia ya que permite variar de forma localizada los niveles de proteínas sintetizadas (Ver sección I.2).

Aún no se han determinado cuales son las señales que inician el programa regenerativo, pero se ha visto que la presencia de un ambiente inflamatorio, entrada de calcio a los dominios axonales y la interrupción de la señalización retrógrada pueden determinar la activación de los RAGs (Makwana y Raivich, 2005; Chen et al., 2007).

Así como en el cabo distal de los nervios lesionados ocurre un proceso de DW, en el cabo proximal también hay una pequeña degeneración que alcanza hasta el primer nodo de Ranvier (Fu y Gordon, 1997). En los cabos proximales de las neuronales lesionadas ocurre una re-organización citoesquelética en la que los microtúbulos desempeñan un rol importante en el transporte anterógrado de vesículas que contribuirán a la organización del cono de crecimiento y a la formación de membrana. Inmediatamente tras la lesión, los axones sellan sus extremos lo que impide que se produzca una pérdida de axoplasma. Conjuntamente ocurre la formación de los bulbos terminales en los cuales se acumulan componentes somáticos y que probablemente liberen al medio extracelular constituyentes tales como *calcitonin gene-related peptide* (CGRP). CGRP es un vasodilatador capilar y actúa como mitógeno de las CS (Zochodne et al., 1995; Cheng et al., 1995). Resulta interesante la observación de que durante el proceso regenerativo, CGRP se encuentra en altos niveles en los axones, mientras que a nivel somático sus niveles son reducidos, dejando a

entrever una regulación post transcripcional diferencial entre dichos dominios celulares (Toth et al., 2009).

La extensión de los axones luego de la formación del cono de crecimiento se denomina “sprouting” y su aparición se ve limitada por el tiempo requerido para la síntesis, transporte y ensamblado de los componentes de la nueva membrana y de los conos de crecimiento. La síntesis lipídica ocurre en el soma y su transporte hacia los extremos de los axones regenerantes ocurre a través de microtúbulos (Vance et al., 2000). Para que la regeneración ocurra con cierto grado de éxito, es necesaria una apropiada guía direccional y un ambiente permisivo que permita reconectarse con su blanco distal. Como se mencionó en la sección **I.1.1**, la mielina contiene componentes inhibitorios de la regeneración, que deben ser removidos para alcanzar dicho ambiente permisivo y pueda ocurrir la regeneración. Asimismo, el guiado de los axones regenerantes es fundamental para que éstos conecten sus blancos distales. En este aspecto, la interacción con la matriz extracelular es muy importante ya que contiene moléculas que participan en el guiado de los brotes axonales. Ejemplos de dichas moléculas son la Laminina y Fibronectina, ambas proteínas se encuentran en altos niveles en las zonas próximas a los sitios de brote (Liu et al., 2009). Las Integrinas representan la familia más importante de receptores celulares que interactúan con la matriz extracelular y median el crecimiento de las neuritas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lemons y Condic, 2008). Se ha observado que varias subunidades de las Integrinas se encuentran en altas cantidades en neuronas con capacidad regenerativas como lo son las neuronas del Ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Wallquist et al., 2004) y varias clases de motoneuronas (Hammarberg et al., 2000; Werner et al., 2000). Resulta interesante destacar que en SNC, en donde el proceso regenerativo es deficiente, no se observa un aumento en la expresión de Integrinas luego de la lesión (Plantman et al., 2005; Werner et al., 2000).

### **I.1.2.1) Citoesqueleto y regeneración**

Como se mencionó anteriormente, los microtúbulos desempeñan un rol importante en el proceso regenerativo participando activamente en el transporte de componentes necesarios para el crecimiento de la fibra nerviosa. Otros componentes del citoesqueleto también tienen importancia en el proceso regenerativo, como lo son los filamentos de Actina y proteínas motoras asociadas a éstos. Consistente con esto, se ha observado un aumento en la expresión de los genes de Actina, Tubulina y de la subunidad liviana de los neurofilamentos luego de una lesión nerviosa (Bomze et al., 2001; Bulsara et al., 2002; Sotelo-Silveira et al., 2000) y son ejemplos de los ya descritos “RAGs”. Por otra parte, Jiménez y colaboradores (2005) realizaron un estudio proteómico para

evaluar la variación de los niveles de proteínas inducida por una lesión de nervio ciático. Dentro del conjunto de proteínas que identificaron que varían sus niveles, los autores pudieron detectar la variación de los niveles de proteínas citoesqueléticas tales como TUBB, VIM, TPMsK3 y TPM4.

La relevancia del citoesqueleto en la regeneración trasciende su rol en el transporte macromolecular. Además de su importancia estructural exhibe propiedades que contribuyen al proceso regenerativo. La dinámica de los microtúbulos regula procesos durante el cicatrizado, tales como la proliferación celular, migración y diferenciación. Conjuntamente participa en el tráfico y secreción de moléculas que componen la matriz extracelular (Liu et al., 2005; Westermann et al., 2003). El ensamblaje axonal requiere la polimerización de microtúbulos y su estabilización. Sin embargo, en las zonas próximas a los extremos axonales, los microtúbulos deben presentar una dinámica que permita un crecimiento eficiente (Zhou y Snider, 2006). Los comportamientos de estabilización y dinámica de los microtúbulos requieren de la participación de la *glycogen synthase kinase-3 $\beta$*  (GSK-3 $\beta$ ) que regula la actividad de diferentes proteínas de unión a microtúbulos como lo es la *microtubule-associated protein 1B* (MAP1b) (Trivedi et al., 2005).

Los filamentos de Actina presentan un comportamiento dinámico a nivel de los conos de crecimiento que es necesario para la prolongación del axón regenerante. En neuronas espinales de *Xenopus* se ha observado que la polimerización y dinámica de los filamentos de Actina se ve favorecida por la activación de la vía de la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K). Esto posibilita la protrusión del cono de crecimiento (Zhou et al., 2004; Li et al., 2012).

Es necesario que el citoesqueleto presente una re-organización de sus componentes para que se forme el cono de crecimiento y se produzca la elongación axonal. Las Integrinas actúan como intermediarios entre las señales presentes en el medio extracelular y el citoesqueleto pero requieren de la interacción con otras proteínas. Dentro de éstas se destaca la acción de la Miosina X (MyoX) que funciona como intermediario del contacto entre las Integrinas y los filamentos de Actina, participando del proceso de adhesión celular y crecimiento de filopodios. La interacción ocurre a nivel de las colas citoplasmáticas de las Integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$  (Miranti y Brugge, 2002; Zhang et al., 2004). Se ha observado que la Miosina X se encuentra sobre expresada en neuronas de DRG y en motoneuronas tras la axotomía. También se observó que *in vitro*, dicha proteína se acumula en los conos de crecimiento. Adicionalmente se observó que la Miosina X participa del proceso de extensión de neuritas basado en la interacción de la Integrina  $\beta 1$  y la Laminina (en la matriz extracelular) (Plantman et al., 2013).

En el contexto del tráfico intracelular, tanto en condiciones de regeneración como fisiológicamente normales, las proteínas motoras hacen posible el desplazamiento de diversos componentes celulares (Ver revisiones Sotelo-Silveira et al., 2006 y McQuarrie y Lund, 2009).

## **I.2) Síntesis local de proteínas en el axón**

Una serie de trabajos demostró que no era factible que el mantenimiento del axón dependiera únicamente del soma. Se observó que las proteínas que son transportadas por el axón no tienen la estabilidad metabólica suficiente para soportar velocidades de transporte 1-5 mm/día antes de llegar a su destino, particularmente a nivel de los largos axones del SNP (Nixon, 1980; Álvarez y Torres, 1985; Nixon et al., 1986). Por otra parte, se observó que existe un reciclaje local de aminoácidos cuyo origen son proteínas degradadas y su destino proteínas nuevas (Nixon, 1980). Así entonces, se comenzó a considerar la síntesis local de proteínas como uno de los mecanismos que participan del mantenimiento axonal.

En esta línea, Benech y colaboradores (1982) demostraron mediante análisis auto-radiográficos la incorporación local de precursores de proteínas así como también de ácidos nucleicos durante la regeneración de nervio ciático de rata seccionado. Este trabajo sugiere que durante la regeneración nerviosa, existe en el cabo proximal una producción *de novo* de proteínas y ácidos nucleicos. Estudios posteriores demostraron la presencia de una maquinaria endógena para la síntesis proteica en el axón de invertebrados (Giuditta, 1991; Sotelo JR., 1999), de peces (Koenig et al., 1996) y mamíferos (Sotelo-Silveira et al., 2000; Koenig et al., 2000; Álvarez et al., 2000). En este contexto es importante destacar la confirmación de la presencia y traducción de los ARNm codificantes para las tres sub unidades de los neurofilamentos en nervios ciáticos intactos y lesionados (Sotelo-Silveira et al., 2000). Se ha descrito que la maquinaria para la síntesis proteica se encuentra en regiones discretas de los axones. Por ejemplo, las denominadas Placas ribosomales periaxoplásmicas (PARPs) son regiones conspicuas que se encuentran a lo largo de las fibras mielinizadas de vertebrados y que presentan acumulación de ribosomas (Koenig y Martin 1996; Koenig et al., 2000). Acorde con esto, Kun y colaboradores (2007) observaron la presencia de ribosomas en la fibra nerviosa de ratas, empleando inmuno-microscopía electrónica y microscopía de luz. Conjuntamente, Sotelo-Silveira y colaboradores (2008) demostraron que en PARPs de fibras

Mauthner (Goldfish) se encuentran presentes y co-localizados el ARNm de la  $\beta$ -actina y su factor de trans-activación, la *zipcode-binding protein-1*.

Con el paso de los años, se ha ido demostrando gradualmente que debido a las dimensiones axonales, el contenido macromolecular del axón no tiene como único origen el soma neuronal. En este contexto, se ha descrito el aporte de ARNs y ribosomas por parte de las Células de Schwann a los axones tanto en condiciones fisiológicas normales (Court et al., 2008) como durante el proceso de regeneración (Court et al., 2011). Si bien el soma es la fuente principal del ARN y ribosomas encontrados en los axones, no se debe despreciar el rol que desempeña la glía en el aporte de este tipo de moléculas y por consiguiente en la modulación de la síntesis proteica axonal (Ver revisión Sotelo et al., 2013).

La regulación de la síntesis local de proteínas no puede depender únicamente de la regulación a nivel de la Transcripción, sino que deben producirse fenómenos locales de regulación que permitan variar los niveles de proteínas sintetizadas de forma localizada. De esta manera, la regulación de la expresión génica a nivel post transcripcional adquiere notoriedad. Uno de los mecanismos de regulación post transcripcionales descrito en axones es la regulación por ARNs de interferencia (ARNi) (Murashov et al., 2007).

### **I.3) Mecanismos post transcripcionales de regulación de la expresión génica: Interferencia mediada por ARNs**

El progreso en el descubrimiento de nuevos genes tras la secuenciación del genoma humano, pone de manifiesto que aproximadamente el 95% del genoma es ADN no codificante. No obstante, se ha visto que cambios en esas secuencias se relacionan con enfermedades y malformaciones. Una de las razones para ello es que muchas de esas secuencias corresponden a templados para la síntesis de ARNi que median la regulación de la expresión génica de forma post transcripcional (Ying et al., 2006). Este fenómeno de regulación fue observado por primera vez en petunia. Allí se observó que al introducir un ARN exógeno, éste silenciaba la expresión del ARN endógeno del cual era homólogo (Napoli et al., 1990). Sin embargo, debieron pasar años hasta que dicho fenómeno fue descrito y caracterizado en *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Fire y colaboradores (1998) crearon el término ARNi para describir a los ARNs pequeños (sARN) que llevan a cabo un proceso de silenciamiento génico mediado por la interacción entre secuencias complementarias de éstos y de ARNm.

Estudios posteriores mostraron que ARNs de doble hebra (dsARNs) largos pueden inhibir la expresión génica en invertebrados. En el caso de los mamíferos, el silenciamiento es llevado a cabo por moléculas más cortas de dsARN llamadas ARNs pequeños de interferencia (siARNs) (Elbashir et al., 2001). Los siARNs, poseen una longitud de entre 18 y 25 nucleótidos e interfieren con la expresión génica mediante una vía que involucra a la endonucleasa Dicer, perteneciente a la familia de ARNasas tipo III. Ésta enzima posee un dominio amino terminal helicasa (dominio PAZ), dos motivos ARNasa III y un motivo carbono terminal de unión a dsARNs. Dicer se une al dsADN y lo escinde en siARNs. Éstos, al localizar otras moléculas de ARN de simple hebra (ssARN) totalmente complementarias, se les unen y las marcan para que sean degradadas por enzimas ARNasas (Ying et al., 2006).

La interferencia mediada por ARNs es un mecanismo evolutivamente conservado para suprimir selectivamente la expresión génica, originalmente reconocido como una respuesta frente a la detección de ácidos nucleicos exógenos (Filipowicz et al., 2008). Células eucariotas infectadas por virus pueden procesar dsARN viral en siARNs, los cuales se unen a ARNm virales blancos y causan su degradación, lo que impide la replicación viral. Los ARNi pueden proteger al genoma eucariota de elementos transponibles exógenos y contribuyen al desarrollo normal de los organismos (Saugstad, 2010).

No obstante, éste mecanismo ha evolucionado de manera tal que desempeña un rol en la regulación de la expresión génica post transcripcional de genes endógenos. Así, tenemos que no solo los siARNs exógenos pueden silenciar la expresión génica. Los miARNs endógenos actúan como reguladores post transcripcionales de la expresión génica (Ying et al., 2006; Rana, 2007).

Los miARNs fueron primeramente observados en *Caenorhabditis elegans*, donde se pudo evidenciar que actuaban como moduladores de la expresión génica de diversos ARNm y así regulaban el desarrollo de estos organismos. Posteriormente, fueron observados en distintos organismos, incluido *Homo Sapiens* (Lagos-Quintana et al., 2003), con lo cual se podría inferir que se trata de una familia génica que ha evolucionado a partir de un gen ancestral de sARN (Ying et al., 2006).

Los procesos biológicos en los que se evidencia el accionar de los microARNs los posicionan en la vanguardia para su empleo tanto como posibles biomarcadores como para tratamientos de enfermedades. Desde desórdenes neurológicos hasta diversos tipos de cánceres, podrían ser tratados utilizando microARNs sintéticos, constituyendo una promisorio forma de terapia génica (Ying et al., 2006).

Los miARNs son moléculas de ARN de una longitud de entre 18-25 nucleótidos que resultan del procesamiento enzimático de precursores más extensos y actúan como reguladores de la expresión génica. El mecanismo de regulación depende de la unión del miARN a un determinado ARNm para lo cual requiere de la complementariedad de bases entre una secuencia en el extremo 5' del miARN (nucleótidos 2-7) denominada "seed" y un sitio de unión usualmente en el extremo 3'-UTR del ARNm. Una vez que se produce la interacción miARN-ARNm, la inhibición de la síntesis proteica puede ser llevada a cabo por bloqueo de la traducción o por degradación del mensajero mediante un proceso similar al llevado a cabo por los siARNs (Ying et al., 2006; Filipowicz et al., 2008; Carthew y Sontheimer, 2009). Particularmente en mamíferos, Guo y colaboradores (2010) demostraron mediante el empleo de la técnica "Ribosome profiling" que el principal mecanismo de regulación de la expresión génica por parte de miARNs es por degradación del ARNm. En este estudio se observó que tanto para miARNs exógenos como endógenos, la disminución de la síntesis proteica se vio correspondida en un 84% con el descenso de los niveles de ARNm.

### **I.3.1) microARNs en dominios neuronales**

Las prolongaciones neuronales (ya sean axones o dendritas) contienen una gran diversidad de ARNm y una activa síntesis proteica (síntesis local). Esto es de importancia, especialmente en las grandes neuronas para el desarrollo y el mantenimiento de la polaridad neuronal, la plasticidad sináptica, la regeneración y reparación (Jung et al., 2012).

En los axones y terminales nerviosas del SNC se encuentra una numerosa población de miARNs que desempeñan un rol en la regulación de la expresión génica post transcripcional (Schratt, 2009; Siegel et al., 2011; Olde Loohuis et al., 2012). Acorde con el rol que desempeñan los miARNs en la regulación de la expresión génica de forma post transcripcional y su vinculación con la síntesis proteica local en las prolongaciones neuronales, se ha observado que la abundancia y complejidad de miARNs en los axones (Natera-Naranjo et al., 2010) y dendritas (Kye et al., 2007) es mayor a la encontrada en el soma neuronal. Natera-Naranjo y colaboradores (2010) extrajeron la fracción de ARN exclusiva de axón a partir de cultivos de neuronas simpáticas. Posteriormente analizaron los niveles de miARNs mediante micro arreglos y lo corroboraron mediante Real Time PCR (RT-PCR). Lo mismo se hizo para la fracción somática de ARNs. Con este estudio determinaron que la riqueza en especies de miARNs en los axones es superior a la encontrada en los somas. Observaron también que un conjunto de miARNs se encuentran enriquecidos en los axones, tales como lo son el miR-15b, miR-16 y miR-221. Estos resultados dejan a entrever el posible transporte selectivo de



miARNs hacia el axón. Se ha detectado en axones en desarrollo y en los conos de crecimiento la presencia de componentes de la maquinaria de procesamiento de miARNs, como lo son Dicer, la proteína *Ago* y *fragile X mental retardation protein* (FMRP) (Hengst et al., 2006; Murashov et al., 2007). Esta observación sugiere la ocurrencia de un procesamiento local de los miARNs a nivel axonal.

Kye y colaboradores (2007) observaron niveles cuantitativos superiores en las dendritas de determinados miARNs, como lo son el miR-26a, miR-26b y miR-292-5p en comparación con dominios somáticos. Por otra parte se ha detectado un enriquecimiento de miARNs inmaduros en las dendritas (Smalheiser, 2008). Esta observación, conjuntamente con la detección de Dicer en los dominios post sinápticos de las dendritas, apoya la concepción de que los miARNs son localmente procesados en dichos dominios neuronales (Lugli et al., 2005, 2008).

La regulación de la expresión génica por medio de los miARNs no solo ocurre de forma directa tras la unión a su mensajero blanco, sino que también puede regular la expresión génica de forma indirecta. Los miARNs pueden regular la expresión de factores de iniciación de la traducción, con lo que potencian su capacidad regulatoria. Por ejemplo, uno de los miARNs más abundantes en los dominios de neuronas simpáticas es el miR-16, el cual tiene sitios de unión en los extremos 3'-UTR de los factores de iniciación de la traducción eIF2B2 y eIF4G2. Si se transfecta el precursor del miR-16 al axón, se reducen los niveles de dichos factores inhibiendo considerablemente la síntesis proteica (Kar et al., 2013).

El metabolismo energético en los axones es también influido por la acción de miARNs. Los genes nucleares *Cytochrome c-oxidase* (CoxIV) y *ATP synthase* (ATP5G1), de acción en las mitocondrias, son blancos de regulación del miR-338. Si se elevan los niveles axonales del miR-338, se produce un descenso en la expresión de CoxIV y ATP5G1, lo que conlleva a un descenso en los niveles de ATP y a un aumento en los niveles de las Especies reactivas de Oxígeno (ROS) (Aschrafi et al., 2008, 2012).

La acción conjunta de los miR-16 y miR-338 tiene efecto sobre la capacidad de crecimiento y ramificación de los axones (Aschrafi et al., 2008; Kar et al., 2013). No obstante, dicha capacidad se ve influida por otros miARNs. Por ejemplo, la inhibición local de miR-9 en neuronas corticales embrionarias facilita el crecimiento e inhibe la ramificación axonal (Dajas-Bailador et al., 2012). Tal efecto está mediado por la regulación de uno de sus blancos, la MAP1B.

### **I.3.2) microARNs en la regeneración nerviosa**

Los miARNs han sido documentados como participantes activos del proceso de regeneración nerviosa. El rol que desempeñan durante la regeneración trasciende la vinculación con los procesos en los que participa en condiciones fisiológicas normales. En cambio, adquiere notoriedad en otros aspectos regulativos de la fisiología del sistema nervioso en respuesta a una perturbación.

Wu y colaboradores (2011) demostraron que la maquinaria bio-sintética de los miARNs está involucrada en la regulación de la síntesis proteica en los axones de nervios periféricos lesionados. En este estudio, observaron una regulación diferencial de la expresión de los componentes de RISC y los “cuerpos P” dependiente de la lesión. Los cuerpos P han sido localizados en las varicosidades axonales que consisten en sitios de concentración de ARNm y síntesis proteica. En los cuerpos P ingresan ARNm asociados con miARNs y allí se produce su degradación enzimática. Wu y colaboradores (2011) observaron un aumento en el tamaño y número de cuerpos P y varicosidades axonales en axones de DRG luego de una lesión de nervio ciático. Este resultado sugiere que los cuerpos P localizados en las varicosidades regulan el proceso regenerativo al administrar los niveles de los distintos ARNm, lo que determina una expresión génica diferencial.

Otra evidencia de la trascendencia de los miARNs para el proceso de regeneración nerviosa es la aportada por los mismos autores en el 2012. En este estudio se evaluaron los efectos de la ablación genética de Dicer sobre el proceso de regeneración de nervio ciático en ratones y de la regeneración axonal en cultivos de neuronas de DRG. En ambos casos se vio que la delección de Dicer impactó sobre la capacidad de recuperación de la estructura y la función de los axones en regeneración (Wu et al., 2012).

Estudios han mostrado la ocurrencia de aumentos en los niveles de expresión de determinados miARNs luego de una lesión nerviosa. Por ejemplo se ha documentado en DRG el aumento en los niveles de expresión de miR-21 tras la lesión del nervio ciático. Dicho miARN tiene un papel en la promoción del crecimiento axonal tras la regulación del gen SPRY2 (Strickland et al., 2011). Conjuntamente, el miR-21 participa de la prevención de la muerte celular mediante la inhibición de FASLG, un ligando relacionado a la inducción de la apoptosis (Buller et al., 2010). Asimismo, ha sido documentado un incremento en los niveles de miR-29b que exhibe un efecto de protección neuronal. También se vio que inhibe la apoptosis neuronal tras regular negativamente diversos genes pro apoptóticos de la familia BH3-3 (Kole et al., 2011).

Por otra parte, se vio que durante la regeneración del nervio ciático, se observa un descenso en los niveles de expresión de determinados miARNs que contribuye al proceso de crecimiento axonal. Este es el caso de los miR-144, miR-145 y miR-214 que tienen acción inhibitoria del crecimiento axonal (Zhang et al., 2011).

Debido a que los fenómenos que ocurren a nivel de las Células de Schwann (CS) son trascendentes para el proceso regenerativo resulta de interés estudiar los niveles de expresión de miARNs en éstas células. En este marco, se han realizado estudios en los cuales se evalúa la participación de los miARNs durante la respuesta regenerativa en CS (Ver Viader et al., 2011 y Chang et al., 2013). Viader y colaboradores (2011) demostraron que ocurre una modulación del comportamiento de la CS por medio de miARNs en respuesta a una lesión nerviosa. En este estudio, se observó que la acción de los miARNs a nivel de la CS es fundamental para que se pueda producir la regeneración mediante la interacción con blancos relacionados con la diferenciación y proliferación neuronal. Ejemplos de los miARNs involucrados son los miR-34a y miR-140. El primero interactúa con reguladores positivos de la des-diferenciación y proliferación celular como lo son Notch1 y Ccnd1. El segundo, interactúa con el factor de transcripción Egr2, el cual es un importante regulador del proceso de mielinización.

Vale la pena aclarar que si bien es cierto que los miARNs pueden comenzar a expresarse en virtud de mecanismos locales, también es cierto que su influencia y regulación trasciende la regulación local a nivel del axón. Con el paso de las horas, la influencia del soma en los procesos que se suceden a nivel de la lesión aumenta y participa junto con el componente local en la diversidad de fenómenos que ocurren durante el proceso regenerativo.

### **I.3.2.1) Perfiles de expresión de miARNs durante regeneración de nervio ciático**

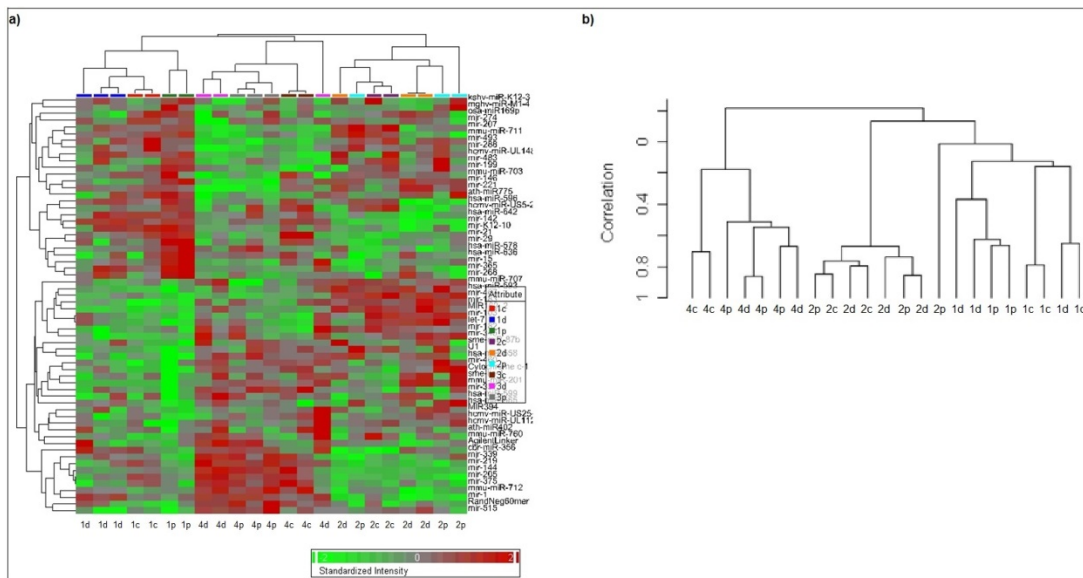
En el marco de la regeneración nerviosa, se ha desarrollado otros tipos de estudios en los cuales se evalúa a nivel masivo los cambios globales en los niveles de expresión de la población de miARNs luego de una lesión. Para realizar este tipo de estudios se puede emplear tanto RT-PCR como micro arreglos o secuenciación masiva de ARNs. Dentro de los trabajos previos hay dos que son de particular interés para este estudio, ambos llevados a cabo en condiciones de regeneración de nervio ciático. El primero de ellos es un estudio realizado en nuestro laboratorio en el cual se emplean micro arreglos para la evaluación de los perfiles de expresión de miARNs (no publicado). El

segundo consiste en el estudio llevado a cabo por Yu y colaboradores (2011), en el cual se evalúan mediante secuenciación masiva de ARNs los perfiles de expresión de miARNs.

En nuestro estudio previo se evalúan mediante micro arreglos los cambios relativos en las abundancias de miARNs y ARNm a diferentes tiempos luego de la lesión del nervio ciático. Para ello se seccionaron los nervios ciáticos de ratas y se colectaron a diferentes tiempos muestras de tejidos del cabo proximal y distal. Como controles se emplearon los nervios contralaterales. Los tiempos elegidos para el estudio fueron los Días 1, 2 y 4 luego de la lesión.

Para evaluar los niveles de expresión de miARNs, se emplearon chips de micro arreglos de la plataforma Agilent Oligo Arrays. Para evaluar los niveles de expresión de ARNm, se emplearon chips de micro arreglos de la plataforma Affymetrix. Por problemas durante el análisis de expresión en el caso de los ARNm, solo se pudo generar información correspondiente a los cabos proximales de los Días 1 y 2.

Los datos de expresión de miARNs fueron analizados a nivel global contemplando todas las condiciones estudiadas. Para ello se realizó una comparación múltiple empleando el test de ANOVA y se establecieron los niveles de significancia según  $Fold\ Changes \geq |2|$  y  $p\text{-Valores} < 0.05$ . Posteriormente se realizó un análisis de clusters empleando los miARNs expresados diferencialmente (**Figura 1**). Se realizó un cluster jerárquico para evaluar los patrones de expresión de los miARNs en las distintas condiciones y así poder ver los perfiles globales de expresión de los mismos (**Figura 1a**). Se pudo ver que hay conjuntos conspicuos de miARNs con expresión diferencial en los distintos días. Conjuntamente se puede ver que los niveles de expresión globales de cada día son similares entre las distintas condiciones dejando a entrever que ocurren fenómenos comunes ya sea en los cabos proximales, distales e inclusive en los nervios contralaterales no lesionados empleados como controles. Esta última observación sugiere la ocurrencia de una respuesta refleja frente a la lesión en el nervio contralateral no lesionado. De esta manera tenemos que tanto en el cluster jerárquico como en el dendrograma (**Figura 1b**), las distintas condiciones pertenecientes al mismo día se asocian entre sí.



**Figura 1.** Análisis de Clusters de los miARNs expresados diferencialmente. a) Clusters Jerárquico de miARNs expresados diferencialmente y con un p-Valor <0.05. Se observan conjuntos conspicuos de miARNs que varían su expresión en los distintos tiempos luego de la lesión. Conjuntamente se observa que las condiciones pertenecientes a los mismos días se agrupan entre sí dejando a entrever respuestas similares frente a la lesión. b) Dendrograma del experimento de Cluster usando correlación centrada y promedio de vinculación. Se observa que las condiciones pertenecientes a los mismos días se agrupan entre sí lo que indica que los niveles de expresión globales de los miARNs son similares entre las mismas.

Yu y colaboradores (2011) recurrieron al análisis por secuenciación masiva de ARNs pequeños para evaluar los perfiles de expresión de los miARNs. En este estudio, se demostró la alteración de los perfiles de expresión de miARNs en DRG y en el cabo proximal del nervio ciático de rata seccionado. Los tiempos evaluados fueron 1, 4, 7, y 14 días post lesión, considerando al día 0 (nervio sano) como control. Este trabajo también aportó información acerca de una sugerente correlación entre los patrones de expresión de ciertos miARNs y sus potenciales ARNm blancos. Para ello, los autores seleccionaron un número de miARNs con una variación en su expresión significativa y realizaron estudios de predicción de blancos (empleando las plataformas predictivas TargetScan y miRanda). Encontraron que algunos de los blancos potenciales de esos miARN codifican para componentes celulares implicados en procesos de reparación celular vinculados con la regeneración axonal. Entre éstos se incluye la neurogénesis, diferenciación neuronal, transporte mediado por vesículas, adhesión célula-célula y regulación negativa de la apoptosis. Posteriormente estudiaron mediante micro arreglos los cambios en los niveles de ARNm provocados por la axotomía y seleccionaron los genes que eran blancos putativos de los miARNs previamente seleccionados. Luego seleccionaron los pares miARNs-ARNm blancos inversamente correlacionados y nuevamente observaron que las funciones representadas se vinculaban con el

proceso de regeneración axonal. Es interesante destacar que no le dedicaron atención a las proteínas del citoesqueleto o asociadas a éstas, algunas de las cuales han sido documentadas como participantes del proceso de regeneración.

#### **I.4) Presentación del estudio**

En el estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo se analizaron los perfiles globales de expresión de miARNs considerando todas las condiciones estudiadas para los tres días pero no se profundizó en la dinámica de miARNs expresados diferencialmente en condiciones particulares. Tampoco se realizó en el mismo una predicción de blancos de miARNs ni se emplearon los datos de expresión de mARNs generados que pudiera aportar información acerca de las funciones que estarían siendo reguladas por miARNs. De esta manera nos resultó de interés profundizar en la dinámica de los niveles de expresión de miARNs durante el proceso de regeneración para lo cual consideramos de utilidad el empleo de los datos generados por Yu y colaboradores (2011). En dicho estudio se contemplan condiciones similares a las estudiadas en el nuestro pero abordadas empleando una metodología más precisa y sensible como lo es la secuenciación masiva de ARNs. De esta manera consideramos que la complementación de los resultados obtenidos luego del análisis de ambos sets de datos puede contribuir a una descripción más robusta de los fenómenos de regulación mediante miARNs que acontecen luego de la lesión.

Así entonces, se propuso la realización del análisis tanto de los sets datos de expresión de miARNs generados previamente por nuestro grupo de trabajo como el generado por Yu y colaboradores (2011). Conjuntamente, se analizó nuestro set de datos de expresión de ARNm y se intentó analizar los datos de expresión de ARNm producidos por Yu y colaboradores (2011) pero no se encuentran disponibles. Con estos análisis se buscó profundizar en el estudio de la dinámica de los miARNs y sus blancos predictivos luego de la lesión del nervio ciático. Se hizo énfasis en aquellos miARNs que tuvieran como posibles blancos a ARNm codificantes de proteínas estructurales o con funciones relacionadas a éstas. Esto se debe a que consideramos de particular importancia el estudio de la regulación y de la dinámica de las proteínas estructurales y asociadas a éstas, ya que la lesión implica una severa perturbación del citoesqueleto. El citoesqueleto es el soporte arquitectónico axonal y si no se altera su dinámica el axón en regeneración no podría prolongarse recuperando su estructura. Asimismo, tanto el citoesqueleto como proteínas motoras y otras proteínas con funciones asociadas, desempeñan un rol trascendental en el tráfico intracelular necesario durante un proceso regenerativo (Véase secciones **I.1.2.1** y **I.2**). Vale la pena destacar que éste conjunto de proteínas no

ha sido tomado en cuenta en estudios previos de la dinámica de miARNs y las vías que regulan, por lo que creemos necesaria la realización de estudios que aporte información biológica a su respecto.

## **1.5) Hipótesis de trabajo**

La regeneración axonal es un fenómeno con un fuerte componente de regulación local. Dentro de los factores que operan localmente, se encuentra la regulación ejercida por microARNs. Asimismo, las proteínas estructurales son de importancia para la integridad axonal y su regulación desempeña un papel trascendental en la regeneración. Por lo tanto, es posible que los microARNs modulen la regeneración axonal regulando la síntesis local de proteínas estructurales y otras proteínas que influyen en éstas.

## **1.6) Objetivos**

**1.6.1) Objetivo general:** Estudiar la influencia que tiene la regulación de la síntesis de proteínas del citoesqueleto llevada a cabo por microARNs sobre el proceso de regeneración nerviosa.

### **1.6.2) Objetivos específicos**

**1-** Generar información acerca de los microARNs involucrados en la regulación de la expresión de proteínas del citoesqueleto o relacionadas a éste durante el proceso de regeneración de nervio ciático. Para ello, entre otras cosas se buscará observar un comportamiento correlacionado entre los microARNs y sus ARNs mensajeros blanco codificantes de proteínas con la función de interés.

**2-** Adquirir una capacitación en el empleo de diferentes softwares y herramientas bioinformáticas necesarias para el análisis de datos tanto de micro arreglos de las distintas plataformas como de secuenciación masiva. Conjuntamente se espera desarrollar la capacidad necesaria para el manejo y procesamiento de otros datos en general de utilidad tanto para el presente como para futuros estudios.

## **II) Metodologías**

### **II.1) Herramientas empleadas**

#### **II.1.1) Herramientas para el análisis de datos de micro arreglos Affymetrix**

##### **II.1.1.1) Plataforma “mAdb”**

Los sets de datos de expresión generados mediante el empleo de micro arreglos de plataforma Affymetrix (en formato .cel) pueden ser analizados empleado el sistema “online” de ingreso restringido “Micro array database (mAdb)” generado por el “National Cancer Institute (NCI)” y el “Center for Information Technology (CIT)” del “National Institutes of Health (NIH)” (Greene et al., 2003). “mAdb” es un sistema basado en la web que permite el depósito, ordenamiento y análisis de datos de micro arreglos de forma escalable y modular. Los datos deben ser depositados en la plataforma para que de esa forma queden disponibles para su utilización. Se pueden filtrar los datos por calidad para así generar nuevos sets de datos disponibles para la aplicación de filtros adicionales o la realización de diversos análisis (Greene et al., 2003). Esto permite disminuir la cantidad de datos que deben ser depositados o extraídos de la plataforma, ya que posibilita originar nuevos archivos a partir de los originales.

Algunas de las prestaciones que ofrece el “mAdb” son “Análisis de Componentes Principales” (PCA), “Escalado Multidimensional” (MDS) y “Gráficos de dispersión (Scatter plots) interactivos”. Permite la realización de diversos tipos de comparaciones y tests entre dos o más condiciones, como lo son “Comparación Booleana”, “Test de T”, “Wilcoxon” y “Anova” (Greene et al., 2003).

La actual versión de “mAdb” emplea “R” versión 3.0.1 y el paquete “Affy” versión 1.38.1 para el análisis de datos de micro arreglos generados con la plataforma Affymetrix.



## II.1.2) Herramientas para el análisis de datos de micro arreglos Agilent de dos canales

### II.1.2.1) R environment

“R environment” (<http://www.r-project.org/>) es un conjunto integrado de servicios de softwares para la efectiva manipulación de datos y su almacenamiento, realización de cálculos y representación gráfica. El término “environment” hace referencia a que se caracteriza como un sistema totalmente planificado y coherente. Además de las herramientas necesarias para las funciones antes mencionadas, cuenta con un lenguaje de programación denominado “S” que incluye funciones recursivas y facilidades de entrada y salida de datos definidas por el usuario (Venables et al., 2014).

La plataforma R puede ser utilizada empleando el entorno R Studio, el cual permite una visualización más amigable de la línea de comandos (consola), el historial y los resultados generados conforme se realizan análisis. La consola de R studio tiene una serie de características que permiten una optimización del trabajo en R.

Todas las funciones de R y los set de datos se encuentran en los denominados “packages” (paquetes). Los nuevos paquetes disponibles en la web pueden ser descargados e instalados ejecutando el comando

```
>install.packages (“nombre del paquete”)
```

Para que las funciones de los paquetes estén disponibles y así poder utilizarlas, es necesario “cargar” los mismos. Para ello, se debe usar el siguiente comando

```
> library (“nombre del paquete”)
```

Conjuntamente, se debe indicar el directorio en el cual se encuentran los datos y demás archivos a emplear (Scripts y targets, los cuales se detallarán más adelante) durante el análisis y “establecerlo como directorio de trabajo”.

### **II.1.2.2) Limma**

Limma es un paquete de R generado por Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) que permite el análisis de datos de expresión génica provenientes tanto de micro arreglos (de canal simple o de dos colores) como de Secuenciación Masiva de ARN o RT-PCR. Una de sus características principales es la capacidad de emplear modelos lineales para calcular expresión diferencial en diseños de estudios multifactoriales. Esto es, ajusta modelos lineales para los datos de expresión de cada gen (Yang et al., 2003; Smyth, 2004). Esto permite analizar diversos experimentos como si fueran simples experimentos replicados. Para ello requiere del diseño de dos matrices. La primera es la matriz de diseño ("*design matrix*"), la cual representa los diferentes ARNs que han sido hibridados al micro arreglo (muestra control y problema). La segunda es la matriz de contraste ("*contrast matrix*"), en la cual se define la comparación que se desea realizar, empleando los coeficientes contemplados en los grupos definidos por la primera matriz (Smyth, 2005). Los datos de expresión para micro arreglos de dos canales pueden ser log-ratios o valores logarítmicos de intensidades. En caso de micro arreglos de canal simple, solamente pueden ser los segundos antes mencionados. Limma presenta características que permiten la realización de análisis estables, aun cuando se emplea un número pequeño de muestras (Smyth, 2004; Smyth et al., 2013).

Sí se desea analizar datos provenientes de plataformas Affymetrix, Limma debe ser usado conjuntamente con el paquete Affy. En caso de que se desee estudiar datos de micro arreglos de dos colores, puede usarse directamente Limma o emplearlo conjuntamente con el paquete Marray que provee prestaciones de gran utilidad para el pre procesamiento de datos (Smyth, 2005).

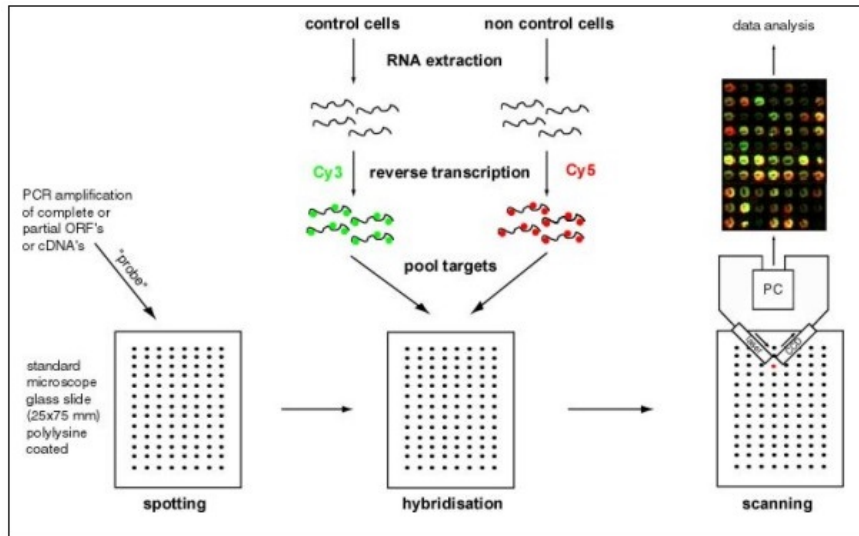
### **II.1.3) Micro Arreglos de dos canales: Transformación y Normalización de datos**

Los micro arreglos de ADN copia (cADN) permiten la evaluación de los niveles de expresión génica de forma relativa contemplando miles de genes simultáneamente (Schena et al., 1995).

Los fragmentos de cADN a evaluar, provenientes de dos tipos diferentes de muestras de ARNs (muestra control y problema) son diferencialmente marcados con moléculas fluorescentes (Cy3= verde, Cy5= rojo). Ambas muestras marcadas son posteriormente hibridadas a una placa que tiene asociadas sondas correspondientes a fragmentos de cADNs amplificados por PCR (ESTs). Las placas conteniendo poblaciones de sondas pueden ser obtenidas en el mercado o bien pueden ser

elaboradas específicamente por uno para responder preguntas biológicas particulares (Gibson y Muse, 2009).

El siguiente paso es la excitación de las moléculas fluorescentes empleando dos laser con longitudes de ondas específicas para cada fluorocromo. La relación entre ambas señales es calculada para cada EST y es indicativa de la cantidad relativa de transcripto para cada EST en la muestra (Gibson y Muse, 2009) (Ver **Figura 2**).



**Figura 2.** Principio del análisis por micro arreglos de cADN. Diseño de la placa de micro arreglos ("spotting"). Análisis de expresión de las muestras (muestra control y problema) marcadas diferencialmente con fluorocromos (Cy3 y Cy5) e hibridadas a la placa ("hibridisation"). Escaneo de las señales emitidas por las muestras hibridadas tras la excitación con dos laser de longitud de ondas específicas para cada fluorocromo ("scanning").

Las diferencias entre las señales crudas (sin transformar y normalizar) de las señales verde (G) y roja (R) no pueden interpretarse como tales. La relación entre las señales G y R ( $T_i = R_i/G_i$ ) permite visualizar cuáles genes están más expresados en alguno de los dos canales (que poseen diferentes muestras). Sin embargo esto tiene una desventaja y es que los genes que están sobre expresados o sub expresados son tratados de forma diferencial. Por ejemplo, genes que están sobre expresados en un factor de 2, poseen un  $T_i=2$ , mientras que aquellos que están sub expresados en un factor de 2, poseen un  $T_i= 0,5$ . De modo que se procede a la transformación de los  $T_i$  a una escala logarítmica de base 2 que permite ajustar los valores de forma simétrica en torno al 0 produciendo un espectro continuo de valores (Quackenbush, 2002; Gibson y Muse, 2009).

Posteriormente se recurre a la normalización de los datos, en donde se ajustan las intensidades de hibridación individuales para balancearlas y así poder realizar comparaciones biológicas significativas (Quackenbush, 2002).

Todos los set de datos de micro arreglos deben ser normalizados para así remover los sesgos experimentales. El más común es la diferencia global en la media de las intensidades de fluorescencia de las muestras. Esto puede atribuirse a diferencias en las cantidades de ARNm usado como templado o a diferencias en la sensibilidad de detección de la señal fluorescente de alguno de los colorantes usados para el marcado de las muestras (Gibson y Muse, 2009).

Existen diversos métodos para Normalizar sets de datos y su elección depende entre otros factores, del tipo de plataforma de micro arreglos empleada para su obtención (Agilent y Affymetrix, por ejemplo) y del tipo de muestras evaluadas (ADN copia de ARNs pequeños o de ARNs mensajeros) (Ver Quackenbush, 2002; Zahurak et al., 2007; Brock et al., 2013).

## **II.1.4) Herramientas para el análisis de datos de Secuenciación masiva de ARNs**

### **II.1.4.1) CLC Genomics Workbench**

CLC Genomics Workbench (<http://www.clcbio.com>) es un software que permite el análisis de datos de secuenciación de última generación. Dentro de sus prestaciones, permite la realización de estudios de expresión génica, ensamblado y visualización de genomas y estudios de estructuras secundarias de ARNs.

Los datos de secuenciación deben ser importados al programa para dar comienzo al análisis. Lo primero que se realiza es el filtrado de las lecturas generadas tras la secuenciación (“trimming”). El filtrado puede realizarse según calidad y longitud de las lecturas, para lo cual pueden establecerse diferentes parámetros de significancia. En este paso se filtran también las secuencias adaptadoras empleadas para la secuenciación. A partir del set de datos filtrados se puede comenzar con el análisis de los datos que puede ser entre otras cosas, un ensamblaje de genoma o identificación de los ADNc secuenciados en un estudio de expresión. En el caso del estudio de expresión, lo que se debe realizar luego del filtrado de las lecturas es la identificación de los genes representados por las mismas, los cuales corresponden a los genes que se estuvieran expresando. Para esto se procede al alineamiento o “mapeo” de las lecturas, ya sea con una base de datos de referencia o bien

empleando un genoma para este propósito. Una vez alineadas las lecturas se puede dar comienzo al análisis de expresión. Lo primero que se debe realizar es el diseño de un “Experimento”, en el cual se especifican las condiciones a evaluar y el tipo de comparación que se desea realizar entre dichas condiciones (Test de Student pareado o despareado para dos condiciones, o Test de ANOVA para condiciones múltiples).

Si se desea analizar particularmente datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños, este software cuenta con un *pipeline* específico para su análisis. Con dicho *pipeline* se puede seguir una serie de pasos que permiten filtrar las lecturas de secuenciación, contarlas y anotarlas usando la base de datos de referencia de microARNs miRBase. También es posible usar la base de datos que uno desee, la cual debe ser depositada en un directorio en el programa. Al igual que con la metodología básica para el análisis de datos de secuenciación del software, lo primero que se debe realizar es la importación al programa de los datos de secuenciación. El análisis comienza con el filtrado y cuantificado de las lecturas. Esto se logra empleando el primer paso del *pipeline* para ARNs pequeños: “Extract and count”. En este paso se procede, entre otras cosas, a la eliminación de las lecturas de baja calidad y a la remoción los adaptadores empleados para la secuenciación. Aquí se deben indicar los parámetros que se desea emplear así como también el tipo de adaptador que se empleó para la secuenciación de las muestras. Mediante este paso se identifican las secuencias diferentes en la muestra (“tags”) y se cuantifica el número de lecturas que pertenecen a cada una. El segundo paso consiste en la descarga desde el servidor de la base de datos miRBase más actualizada. Paso opcional, ya que es posible importar la base de datos que uno desee para dar lugar al tercer nivel del *pipeline*. Este tercer paso es el “Annotating and merging small RNA samples” en el cual se procede a la anotación de las lecturas tras ser comparada con una base de datos de referencia, por defecto miRBase. En este paso se debe seleccionar las especies que uno desee tener en cuenta para la anotación. Este es el paso final del pre-procesamiento de los datos de secuenciación de ARNs pequeños. Una vez realizada esta etapa se puede proceder a la realización de análisis de expresión como se mencionó anteriormente comenzando con el diseño del experimento para la posterior realización de los estudios de expresión.

### **II.1.5) Plataformas para la búsqueda predictiva de blancos de miARNs**

La interacción miARN-ARNm requiere de la complementariedad de bases dada entre una secuencia mínima en el extremo 5’ del miARN (nucleótidos 2-7) denominada “seed” y un sitio de unión en el extremo 3’-UTR del ARNm. Debido a la corta extensión de los “seeds”, frecuentemente se

encuentran varios sitios de unión dentro de los 3'-UTR. Esto hace que las distintas plataformas predictivas detecten sitios de unión en cientos de 3'-UTR de ARNm, lo que puede conducir a sesgos en las predicciones de blancos y torna desafiante la búsqueda (Bartel, 2009; Freidman et al., 2009; Eacker, 2009).

Los distintos métodos de búsqueda predictiva de blancos de miARNs emplean similares algoritmos basados en conocimientos previos acerca de las propiedades de la interacción miARN-ARNm (ver revisión Dweep et al., 2013). Los métodos de predicción evalúan las interacciones entre los K-mer de los miARNs con los extremos 3'-UTR de los ARNm. Los k-mer corresponden a secuencias nucleotídicas que pueden ser empleadas para la identificación de otras secuencias específicas basándose en el principio de complementariedad de bases de Watson y Crick (Dweep et al., 2011). En el caso de los miARNs, estos corresponden a los ya denominados “seeds” los cuales son las secuencias 5' terminales de las moléculas de miARNs involucradas en el “targeting” de genes (Dweep et al., 2013). Los K-mer pueden ser 8mer, 7mer-m8 o 7mer-1A. En el primer caso, existe una complementariedad exacta en las posiciones 2-8 del miARN maduro (secuencia “seed” más la posición 8) seguido por una “A” (Ver **Figura 3**). En el caso de 7mer-m8, existe una complementariedad exacta en las posiciones 2-8 del miARN maduro (secuencia “seed” más la posición 8). Finalmente, en el caso de 7mer-1A, existe una perfecta complementariedad en las posiciones 2-7 del miARN maduro (secuencia “seed”) seguido por una “A”. (Ver revisión Peterson et al., 2014).

<b>Conserved</b>		
	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match
Position 24-31 of HOOK3 3' UTR	5' ...UGUCAAGCAUACUUCUGUUACA...	
mo-miR-194	3' AGGUGUACCUCAACGACAAUGU	8mer

**Figura 3.** Sitio de unión conservado del rno-miR-194 en el extremo 3'-UTR del ARNm de Hook3. Se muestra la posición y el tipo de interacción nucleotídica entre ambas moléculas de ARN simple hebra. Unión del tipo 8 mer. Nótese la A desapareada en el ARNm contigua al último nucleótido que participa de la interacción. Imagen extraída de TargetScan.

### **II.1.5.1) miRWalk**

miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) es una base de datos de miARNs que permite obtener cuáles son sus genes blancos, basándose en la detección de los sitios de unión tanto predictivos como validados, ya sea de ratón, rata o humanos. Es una herramienta ampliamente empleada en la actualidad (ver: Dweep et al., 2013; Zaravinos et al., 2014; Zhang et al., 2014) ya que provee prestaciones novedosas que aumentan su utilidad. Por ejemplo ha desarrollado un algoritmo en el cuál la predicción de los sitios de unión contempla las secuencias completas de todos los genes conocidos (Dweep et al., 2011).

Se compone de dos módulos: El módulo de blancos predictivos y el Módulo de blancos validados. El primero de éstos es actualizado cada 6 meses mientras que el segundo se actualiza mensualmente. Esto permite la obtención información actualizada, muy importante para un área en constante desarrollo (Dweep et al., 2011).

### **II.1.5.2) TargetScan**

TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) es una base de datos que permite la búsqueda predictiva de blancos de miARNs, ya sea tanto si pertenecen a familias ampliamente conservadas o pobremente conservadas, entre muchas especies. Asimismo, a partir de un ARNm permite detectar cuáles son los miARNs que participarían en su regulación, basándose en los sitios de unión en sus 3'-UTR.

Tras la realización de una búsqueda predictiva, los resultados se expresan en un ranking determinado bien por la eficacia de “targeting” predicha (context + scores) o por la probabilidad de “targeting” conservado ( $P_{CT}$ ). El primero expresa la probabilidad de que un blanco sea efectivamente contactado. Los scores para este parámetro provienen de resultados experimentales (Grimson et al., 2007; Garcia et al., 2011). En el caso de  $P_{CT}$ , primeramente se determina la conservación del 3'-UTR a lo cual le sigue el análisis de k-mer específicos. Los 3'-UTR pueden tener varios sitios de unión, por lo que los resultados expresan una serie de  $P_{CT}$ , correspondientes a cada uno de ellos (Friedman et al., 2009).

## **II.2) Procedimientos experimentales**

### **II.2.1) Búsqueda de correlación en los niveles de expresión entre ARNm codificantes para proteínas estructurales y miARNs con sitios de unión en los mismos**

#### **II.2.1.1) Análisis de datos de expresión de ARNm obtenidos con micro arreglos de plataforma Affymetrix**

En esta sección se analizaron los datos de expresión de ARNm generados previamente por nuestro grupo de trabajo. Las condiciones evaluadas en dicho estudio fueron los Cabos Proximales de nervio ciático lesionado para los Días1 y 2 luego de la lesión. Cada condición se ve representada por tres réplicas biológicas por lo que el set de datos se compone de seis archivos.

Debido a que los datos fueron generados empleando micro arreglos Affymetrix, los archivos (en formato .cel) pueden ser analizados mediante la plataforma “mAdb”.

#### **Depósito de datos en la plataforma “mAdb” y pre-procesamiento**

Se depositó el conjunto de datos compuesto por seis archivos en la plataforma “mAdb”.

El pre procesamiento comenzó con la creación de un set de datos en formato “mAdb” a partir de los datos de Affymetrix depositados. En este paso, se emplean diferentes algoritmos para condensar la información, transformar y normalizar los datos. Para la normalización de datos se optó por el empleo del método RMA.



## **Cálculo de expresión diferencial**

En esta sección se evaluó la variación en los niveles de ARNm entre los Días 1 y 2 luego de la lesión.

Lo primero que se hizo fue generar los grupos correspondientes a las condiciones a evaluar. Para ello, los seis archivos depositados se separaron en las dos condiciones que representan. El grupo A se compone de los datos correspondientes al Día 2, mientras que el grupo B se compone por los datos correspondientes al Día 1.

Una vez establecidos los grupos, se utilizó la herramienta “comparación de grupos” y se decidió realizar un cálculo de “T-test” empleando “*pooled variance*”.

Los resultados de la comparación de grupos fueron extraídos de la plataforma en forma de tabla conteniendo entre su información las diferencias en los niveles de expresión entre condiciones (Fold Change) y p-Valores asociados a las mismas. A partir de dicha tabla, se seleccionaron aquellos ARNm que varían su expresión según  $\text{Fold changes} \geq |2|$  y que presentaran un p-Valor  $< 0.05$ . Una vez seleccionado este grupo de mensajeros, se generaron dos listas en las cuales se diferencian aquellos mensajeros que presentan un comportamiento ascendente o descendente entre los Días 1 y 2 ( $\text{Fold changes} \geq 2$  y  $\leq -2$ , respectivamente).

## **Búsqueda de los ARNm expresados diferencialmente que codifican para proteínas estructurales**

Se realizaron comparaciones entre las listas de mensajeros generadas en el paso anterior, con una lista de proteínas estructurales obtenida de la base de datos “UniProt/SwissProt” a través del portal “ExPASy”. De aquí en más a dicha lista se le denominará “UniProtKB (Citoesqueleto)”.

Los cruzamientos se realizaron mediante el empleo de la plataforma online de libre acceso contenida en el sitio web “Bioinformatics & Evolutionary Genomics” (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/beg>) y que permite la visualización de los mismos por medio de Diagramas de Venn.

Los ARNm que codifican para proteínas estructurales se seleccionaron para continuar con el estudio.

## **Búsqueda de los miARNs con sitios de unión en los ARNm seleccionados**

A partir de los genes expresados diferencialmente que corresponden a proteínas estructurales, se realizó una búsqueda predictiva para detectar los miARNs que pudieran actuar como reguladores de su expresión. Para ello, se empleó la base de datos “TargetScan”.

Con el empleo de “TargetScan” se buscaron cuáles miARNs tienen sitios de unión en los extremos 3'-UTR de los ARNm seleccionados. Se decidió considerar únicamente aquellos miARNs que pertenecieran a familias ampliamente conservadas dentro de los Vertebrados.

Estos miARNs fueron estudiados en la siguiente sección. En ésta se evalúan los perfiles de expresión de los miARNs previamente obtenidos en nuestro laboratorio. Particularmente, se evaluó el comportamiento de estos miARNs en las mismas condiciones analizadas en el caso de los ARNm. Con esto se busca observar la ocurrencia de correlaciones entre los comportamientos de los ARNm y de los miARNs que predictivamente actuarían como reguladores de su expresión. La evaluación de los comportamientos de estos miARNs es solo una parte del análisis realizado en la siguiente sección.

### **II.2.1.2) Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con micro arreglos Agilent de dos canales**

En esta sección se procedió al análisis de los datos de expresión de miARNs generados previamente por nuestro grupo de trabajo. Se evaluaron las mismas condiciones analizadas en el estudio de expresión de ARNm: “cabo proximal Día 1” y cabo proximal Día 2”. Cada condición está representada por tres réplicas biológicas.

Los datos de expresión fueron generados con micro arreglos Agilent de dos colores y pueden ser analizados empleando el ambiente R y el paquete Limma.

### **Lectura de archivos y pre-procesamiento de datos**

Para la lectura de los archivos se debe diseñar una matriz en un archivo de texto (“matriztargets.txt”) que contenga los nombres de los archivos a analizar. En dicha matriz se establecen tanto las condiciones experimentales a evaluar como las réplicas biológicas y se

especifica qué tipo de muestras fueron medidas en los canales Cy3 y Cy5 (ya sea muestra problema o muestra control).

Luego de la lectura de los archivos se procede al pre-procesamiento de los datos teniendo en cuenta los resultados observados en el estudio realizado por Zahurak y colaboradores (2007) y por Brock y colaboradores (2013). En el primero se evalúan las distintas metodologías y procedimientos existentes para el pre-procesamiento de datos de micro arreglos Agilent. Mientras tanto en el segundo se evalúa, a partir de un compendio especial de paquetes de R, las diferentes herramientas para el análisis de datos de micro arreglos para miARNs. Luego de analizar los métodos posibles para el pre-procesamiento de los datos, se decidió realizar únicamente transformación logarítmica de base dos de los datos y realizar normalizaciones dentro y entre micro arreglos. Se decidió no realizar correcciones por “background” ya que no presentaron buenos resultados según Zahurak y colaboradores (2007). Para la normalización de las señales dentro de los micro arreglos se optó por el empleo del método “loess”, el cual es recomendado para este tipo de datos por Zahurak y colaboradores (2007). Para la normalización entre micro arreglos se optó por el método por “quantiles”, recomendado por Brock y colaboradores (2013) para datos de micro arreglos de dos colores en análisis de miARNs.

Para evaluar la influencia de las normalizaciones se realizaron gráficos de MvsA antes y después de las normalizaciones para visualizar sus efectos sobre los sets de datos tal como propone Zahurak y colaboradores (2007). Los gráficos de MvsA consisten en gráficos de dispersión en los cuales M representa el logaritmo en base dos de las relaciones de las intensidades R y G, mientras que A representa la media del logaritmo en base 2 de las intensidades R y G. R y G representan las intensidades de las señales en los canales rojos y verdes, respectivamente.

$$-M = \log_2(R/G)$$

$$-A = 1/2 * \log_2(R * G)$$

### **Procesamiento de datos: cálculo de expresión diferencial**

Luego del pre-procesamiento de datos se debe diseñar una matriz en la que se indique a qué condiciones pertenecen los distintos archivos de micro arreglos empleados. Una vez diseñada la matriz, se procedió al cálculo de expresión diferencial.

Para comenzar con el cálculo de expresión diferencial se debe ejecutar la función *"lmFit"*, la cual ajusta modelos lineales para los diferentes genes contenidos en el conjunto de los datos. Posteriormente se emplea la función *"makeContrasts"* para construir la matriz de contraste en la que se establecen los parámetros a contrastar. En la matriz de contraste se especifica la comparación que se pretende realizar: "cabo proximal Día 2 versus cabo proximal Día 1".

Finalmente, se ejecuta la función *"contrasts.fit"*, la cual computa los coeficientes estimados y los errores estándar para los sets de datos a partir de un modelo lineal ajustado a los mismos. La función *"eBayes"* realiza los test estadísticos de "T", "F" y "log-odds" para el cálculo de expresión diferencial según Bayes empírico. La tabla con los resultados se obtiene ejecutando la función *"write.table"*.

### **Selección de miARNs para proseguir con los estudios**

A partir de la tabla que contiene la información del cálculo de expresión diferencial se seleccionaron aquellos miARNs que presentaran un Fold Change  $\geq |1.8|$ . Únicamente se tomaron en cuenta aquellos miARNs que presentaran p-Valores  $< 0.05$ .

La pregunta que se quiere responder con este análisis es si existe una correlación entre los niveles de expresión de los ARNm seleccionados y los niveles de expresión de los miARNs que poseen sitios de unión en sus extremos 3'-UTR y por lo tanto potencialmente podrían actuar como sus reguladores.

Con este fin, se elaboraron dos listas en las cuales se expresan aquellos miARNs que presentaron un aumento o un descenso en sus niveles de expresión.

### **II.2.1.3) Búsqueda de correlación entre los comportamientos de ARNm y miARNs**

En esta sección se evaluó si existe una correlación entre los comportamientos de los ARNm expresados diferencialmente que codifican para proteínas estructurales y los comportamientos de los miARNs con sitios de unión en sus extremos 3'-UTR.

Para ello se evaluó si alguno/s de los miARNs con sitios de unión en los extremos 3'-UTR de los ARNm de interés presenta un comportamiento inverso al que se observa para dicho ARNm. Con este fin se realizaron comparaciones entre las listas de miARNs predichos por TargetScan correspondientes a los ARNm que presentan un aumento o un descenso en sus niveles de expresión y las listas de miARNs obtenidas experimentalmente que presentan un descenso o un aumento en sus niveles de expresión, respectivamente.

Las comparaciones se realizaron mediante el empleo de la plataforma online de libre acceso contenida en el sitio web “Bioinformatics & Evolutionary Genomics” (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/beg>) que permite la visualización de los resultados por medio de Diagramas de Venn.

## **II.2.2) Búsqueda de miARNs expresados diferencialmente en el Cabo proximal de nervio ciático seccionado y evaluación de la representación de la función estructural dentro de sus blancos predictivos**

### **II.2.2.1) Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con microarreglos Agilent de dos canales**

En esta sección se continuó con el análisis de los datos de expresión de miARNs generados previamente por nuestro grupo de trabajo.

Las condiciones evaluadas en éste estudio son los cabos proximales y distales de los nervios ciáticos lesionados. Los días contemplados fueron Día 1, 2 y 4 posteriores a la lesión. Cada día cuenta con un control correspondiente a muestras de nervio ciático contralateral no lesionado.

Los datos correspondientes a muestras de cabo proximal y distal se ven representados por tres réplicas, mientras que aquellos correspondientes a los controles presentan dos réplicas. De esta manera tenemos que el set de datos se compone de veinticuatro archivos. Los datos fueron

generados con micro arreglos Agilent de dos colores y pueden ser analizados empleando el ambiente R y el paquete Limma.

La lectura de archivos y pre-procesamiento de datos se llevó a cabo según se describe en la sección **II.2.1.2**.

El cálculo de expresión diferencial se realizó según se describe en la sección **II.2.1.2** contemplando las siguientes comparaciones: cabo proximal versus control y cabo distal versus control para cada día en particular.

### **Selección de miARNs para proseguir con los estudios**

A partir de la tabla que contiene la información del cálculo de expresión diferencial se seleccionaron aquellos miARNs que en las comparación cabo proximal versus control presenten un Fold Change  $\geq |1.8|$  (significativo) y que al mismo tiempo presenten un Fold Change entre 1.8 y -1.8 (no significativo) para las comparación cabo distal versus control”. En todas las comparaciones, se estableció un filtro de p-Valor  $< 0.05$ .

Estas comparaciones se realizaron para evaluar el comportamiento de los miARNs con expresión diferencial exclusivamente en el cabo proximal del nervio ciático seccionado en cada día de evolución luego de la lesión. De esta primera lista generada se seleccionaron aquellos miARNs que estuvieran representados en más de un día.

### **Búsqueda predictiva de blancos de miARNs e identificación de genes codificantes para proteínas estructurales dentro de los mismos**

Con los miARN seleccionados en la sección anterior se procedió a la realización de análisis predictivo de blancos. A partir de éstos, se evaluó la representación de ARNm codificantes para proteínas estructurales. Este análisis permite tener una noción del nivel de regulación local de la síntesis de proteínas estructurales mediada por miARNs exclusivamente en el cabo proximal de nervio ciático lesionado.

Para la búsqueda predictiva de blancos de miARNs se empleó la plataforma online de libre acceso “miRWalk”. Una vez encontrados los blancos putativos de los miARNs en evaluación, se descargaron las listas de los mismos que sirvieron para dar paso a la segunda parte de esta sección.

Con el fin de ver la representación de la función estructural, se realizaron comparaciones de las listas correspondientes de blancos de los miARNs con la lista “UniProtKB (Citoesqueleto)”.

Las comparaciones se realizaron empleando la plataforma online contenida en el sitio web “Bioinformatics & Evolutionary Genomics”.

### **II.2.2.2) Análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños**

Los datos de secuenciación generados por Yu y colaboradores (2011) fueron obtenidos de la plataforma SRA del NCBI y su código de acceso es SRP005400. Para su análisis se empleó el software CLC Genomics Workbench que posee un pipeline para el análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños.

Se realiza éste análisis para comparar éstos resultados con aquellos obtenidos tras el análisis de los datos generados previamente por nuestro grupo de trabajo. Con esto se busca obtener información más robusta aportada por dos experimentos independientes en los que se emplean dos metodologías diferentes para análisis transcriptómicos.

#### **Pre-procesamiento de datos**

Para el pre-procesamiento de los datos se siguieron dos estrategias diferentes, cada una empleando dos bases de datos de miARNs como referencia para el mapeo de lecturas.

Las bases de datos empleadas fueron la base de datos de miARNs miRBase y la base de datos de ARNs pequeños Rfam, la cual fue empleada en el estudio de Yu y colaboradores. Debido a que es una base de datos de ARNs pequeños se debió realizar un filtrado de la misma para obtener únicamente la lista correspondiente a miARNs. Para ello se diseñó un “script” en PYTHON. La lista de miARNs generada a partir de la Rfam fue importada al CLC Genomics Workbench con lo cual queda disponible para su utilización.

### **Estrategia 1.**

La primera estrategia consistió en el empleo del *pipeline* para análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños del software CLC Genomics Workbench.

Lo primero que se realizó fue la importación de los datos al programa para dar comienzo a su análisis. El primer paso en el pre-procesamiento de los datos es la eliminación de las lecturas de baja calidad y la remoción de los adaptadores. Para ello se debe realizar el paso de “Extract and count” del *pipeline*. En este paso se debió especificar el tipo de adaptadores empleados y la acción que se deseaba realizar (remover adaptadores o enmascararlos). La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina empleando los adaptadores estándar para la misma, lo cual fue especificado en este paso. Se probaron las dos opciones para desestimar los adaptadores (remoción y enmascaramiento). Conjuntamente, en este paso se da la identificación de “tags” y cuantificación de lecturas asignadas a cada uno (Ver sección **II.1.4.1**).

Finalmente se realizaron los mapeos empleando las dos bases de datos. Para ello se realizó el paso “Annotating and merging small RNA samples” del *pipeline* de ARNs pequeños (Ver sección **II.1.4.1**) y se indicaron por separado las dos referencias a emplear en los mapeos.

### **Estrategia 2.**

Esta estrategia consistió en el pre-procesamiento de los datos empleando la metodología básica para análisis de datos de secuenciación del CLC Genomics Workbench. Se siguió esta estrategia ya que es una forma más amplia de procesar las lecturas que podría impedir que se discrimine un número de lecturas más allá de aquellas que no cumplen con los filtros aplicados de calidad y tamaño. Se espera que aquellas lecturas que no cumplan con las características básicas que identifican a los ARNs pequeños sean igualmente tomadas en cuenta. Con esto esperamos aumentar el número total de lecturas a mapear, lo cual podría influir en los resultados de los mapeos.

Luego de importar el set de datos se realizó el “trimming” por calidad y tamaño de las lecturas así como también la remoción de los adaptadores. Los parámetros de longitud de lecturas establecidos fueron como mínimo 18 nucleótidos y como máximo 30 nucleótidos, el cual es un rango amplio que permite la identificación de miARNs (usualmente 22-25 nucleótidos). Los adaptadores empleados para la secuenciación fueron adaptadores estándar Illumina.



Finalmente se realizó el “mapeo” de las lecturas empleando las dos bases de datos de referencia como en la Estrategia 1.

### **Evaluación de la identidad de las lecturas.**

Para verificar los resultados de los mapeos se decidió realizar una nueva prueba adicional con el fin de evaluar cuáles son los porcentajes de las lecturas que corresponden a otros tipos de ARNs.

Para ello se obtuvo el conjunto total de transcritos de rata del sitio FTP de la plataforma NCBI. Con esta nueva referencia se realizaron nuevos mapeos. Primero se mapearon las lecturas totales de cada día contra la base de datos de miARNs miRBase y se seleccionaron aquellas lecturas que no mapearon para proseguir con el análisis. De esta manera se discriminan las lecturas que corresponden a miARNs. Con el conjunto de lecturas que no mapearon, se procedió a realizar un nuevo mapeo empleando como referencia el conjunto total de transcritos de rata.

Esta prueba brinda información acerca de los distintos tipos de ARNs que fueron secuenciados por Yu y colaboradores (2011).

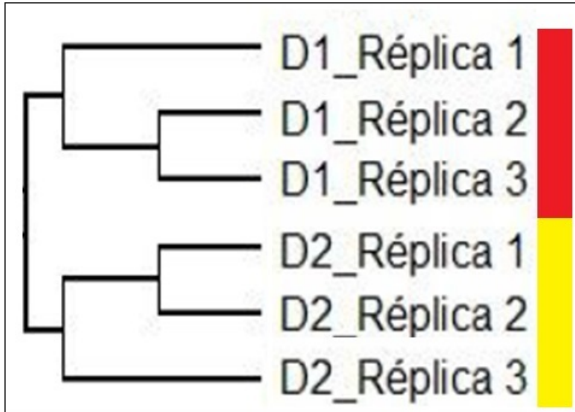
## **III) Resultados**

### **III.1) Búsqueda de correlación en los niveles de expresión entre ARNm codificantes para proteínas estructurales y miARNs con sitios de unión en los mismos**

#### **III.1.1) Análisis de datos de expresión de ARNm obtenidos con micro arreglos de plataforma Affymetrix**

En esta sección se analizaron los datos de expresión de ARNm generados previamente por nuestro grupo de trabajo. Las condiciones evaluadas en dicho estudio fueron los cabos proximales de nervio ciático lesionado para los Días 1 y 2 luego de la lesión. Cada condición se ve representada por tres réplicas biológicas por lo que el set de datos se compone de seis archivos.

El análisis de los datos de expresión de ARNm comenzó con el pre-procesamiento de los datos. Durante éste, se procedió a la transformación de los valores de las intensidades a una escala logarítmica y luego a la normalización de los datos empleando el método por RMA. Para visualizar el ordenamiento de los micro arreglos se realizó un Dendrograma en el cual se pudo ver que las réplicas biológicas correspondientes a los Días 1 y 2 se agrupan entre sí (**Figura 3**). En los dendrogramas se asocian entre sí los set de datos con valores más parecidos, en este caso los niveles de expresión de las réplicas biológicas.

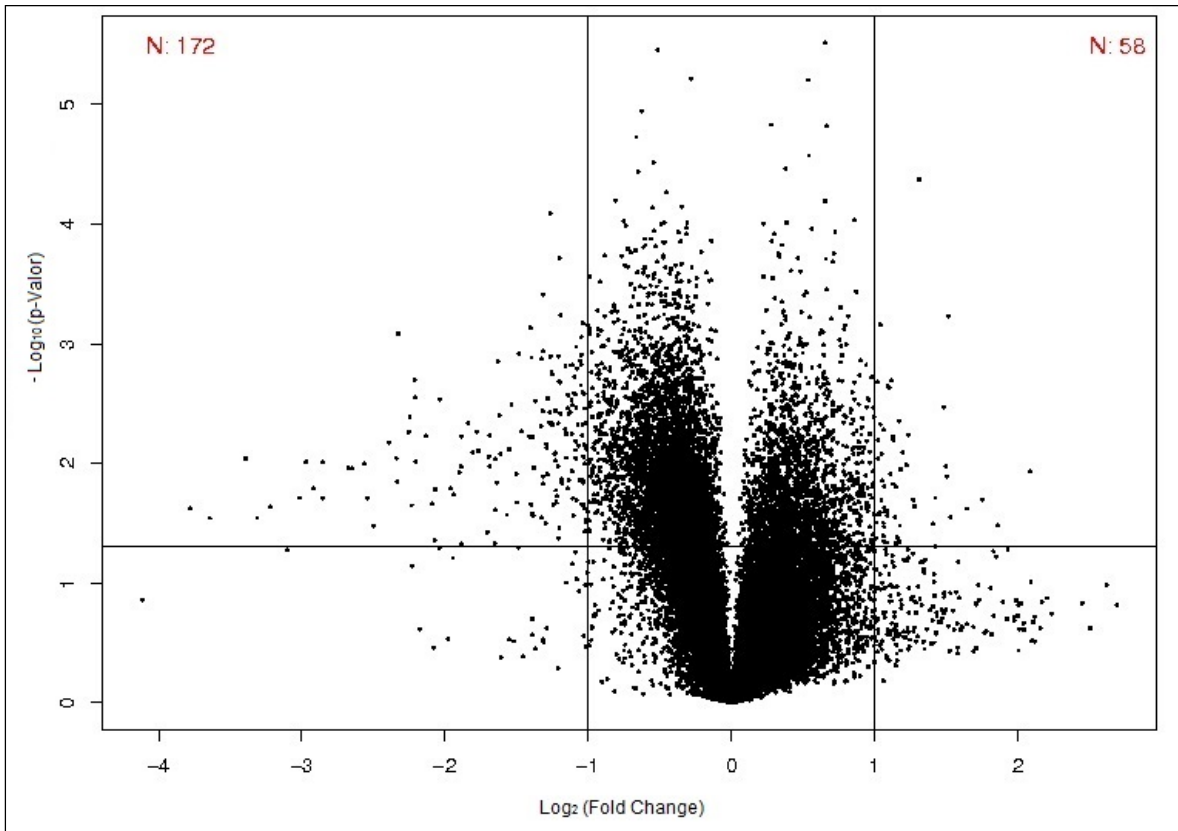


**Figura 3.** Análisis de clusters de los datos de micro arreglos.

Se detalla el ordenamiento de los datos correspondientes a las réplicas biológicas de las dos condiciones evaluadas. D1: Día 1; D2: Día 2. Se observa que las réplicas biológicas correspondientes al mismo día se asocian entre sí.

### **Procesamiento de datos: Cálculo de expresión diferencial**

Se realizó el cálculo de expresión diferencial de ARNm en el cabo proximal entre los Días 1 y 2. Para la visualización de los resultados, se realizó un “Volcano plot” (**Figura 4**). En dicho gráfico, se colocaron barras para señalar el conjunto de sondas que se encuentran entre los valores de significancia establecidos tanto para la diferencia en los niveles de expresión entre condiciones (Fold Change) ( $\pm 2$ ) como para el p-Valor (0.05). En el mismo se puede ver que hay un número de 172 sondas (correspondientes a 64 ARNm diferentes) que descienden su nivel de expresión entre los Días 1 y 2 luego de la lesión, mientras que hay un número de 58 sondas (correspondientes a 32 ARNm diferentes) que presentan un aumento en sus niveles de expresión.



**Figura 4.** Volcano plot. Se grafican los datos del análisis de expresión diferencial entre los Días 1 y 2. El Fold Change se expresa en Logaritmo en base 2, mientras que el p-Valor se expresa en -Logaritmo en base 10. Las barras colocadas señalan los límites de significancia establecidos para los valores de Fold Change ( $\pm 2$ ) y p-Valor (0.05). N: número de sondas encontrados en cada cuadrícula. Se observa un N=58 correspondiente a las sondas que presentan un aumento en sus niveles de expresión y un N=172 correspondiente a las sondas que descienden sus niveles de expresión.

En las siguientes tablas se detallan los mARNs que presentaron una expresión diferencial entre los Días 1 y 2.

**Tabla 1.** Lista de ARNm con aumento en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2 luego de la lesión.

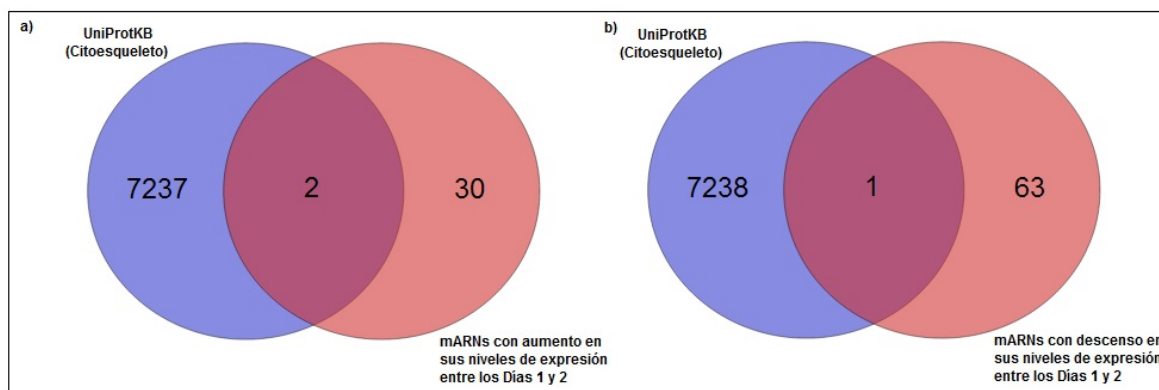
Gen	Log2 (Fold Change)
Hook3	2.51
Col11a1	1.51
Gramd3	1.50
Prrx1	1.50
Gucy1b3	1.48
Zc3h13	1.42
Myo18a	1.42
Mybl1	1.41
Alkbh5	1.27
Zdhhc21	1.23
Scarb1	1.22
Tie1	1.17
Gpcpd1	1.13
LOC361346	1.12
LOC102554200	1.12
Ncoa3	1.12
Rad54l	1.11
Clec14a	1.10
Net1	1.09
Ctdspl2	1.09
Ppp2r5c	1.07
Topbp1	1.07
Elk3	1.07
Xpo4	1.07
Abcg3l3	1.06
Itsn2	1.05
LOC100151767	1.04
Whsc1	1.04
Rcbtb2	1.02
Soat1	1.02
Cnot6l	1.02
Cdk12	1.01

**Tabla 2.** Lista de ARNm con descenso en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2 luego de la lesión.

Gen	Log2 (Fold Change)	Gen	Log2 (Fold Change)
LOC685796	-3.39	Lppr4	-1.19
LOC102554740	-2.92	Ppp1r1c	-1.16
LOC102552061	-2.33	Olr1361	-1.15
LOC102557419	-2.25	Gabpb1	-1.14
Nol4	-2.21	Wt1	-1.13
LOC102549278	-2.09	Kcnq3	-1.12
LOC102556028	-2.07	Spdya	-1.11
Rn5s	-1.96	Rsf1	-1.11
LOC102551188	-1.94	Mzb1	-1.11
LOC102556515	-1.90	Col19a1	-1.10
Akr1d1	-1.84	Wnt5a	-1.10
LOC286991	-1.65	Sv2b	-1.09
Ppp1r8	-1.64	Tbc1d4	-1.08
Elavl2	-1.63	Mau2	-1.08
Dppa3	-1.57	Rad50	-1.07
Scg5	-1.54	Rgs7	-1.05
LOC100912517	-1.48	Slc30a3	-1.05
Cdk14	-1.40	Slc15a1	-1.05
LOC100911353	-1.38	Pdzd8	-1.04
RGD1562704	-1.37	Arpp21	-1.04
Epha6	-1.33	Drd1	-1.04
Tmem132c	-1.29	Hao1	-1.04
Ctsm	-1.29	Snhg11	-1.04
Onecut2	-1.27	Ptprs	-1.03
Kcnc2	-1.27	Lrfn1	-1.03
Dmrt2	-1.27	Tp63	-1.03
Ugt2b	-1.25	Tgoln2	-1.03
Slc24a4	-1.24	Pax9	-1.03
Glrb	-1.23	Cpg1	-1.02
Ccl28	-1.21	Slco1b2	-1.02
Zic4	-1.20	Serpib2	-1.02
Hrasls	-1.20	Tmem71	-1.00

## Búsqueda de los ARNm con expresión diferencial que codifican para proteínas estructurales

Para identificar cuáles de los mensajeros que tienen una expresión diferencial entre los Días 1 y 2 codifican para proteínas estructurales se realizaron comparaciones entre las listas de mensajeros con la lista de proteínas del citoesqueleto “UniProtKB (Citoesqueleto)”. Las comparaciones se realizaron por separado entre la lista “UniProtKB (Citoesqueleto)” y las listas de mensajeros que aumentan o descienden sus niveles de expresión. Los resultados de las mismas se visualizan mediante diagramas de Venn (**Figura 5**).

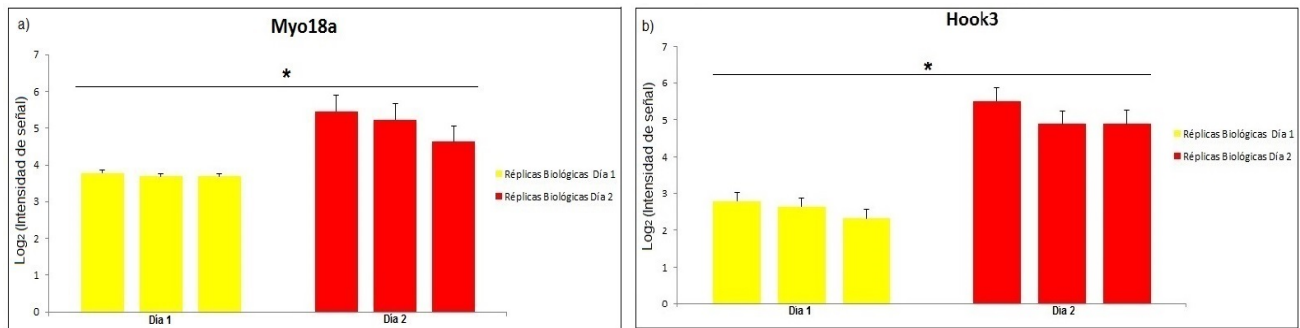


**Figura 5.** Visualización de los resultados de las comparaciones entre la lista de proteínas relacionadas al citoesqueleto “UniProtKB (Citoesqueleto)” y las listas de mensajeros que presentan un aumento (a) o un descenso en sus niveles de expresión (b).

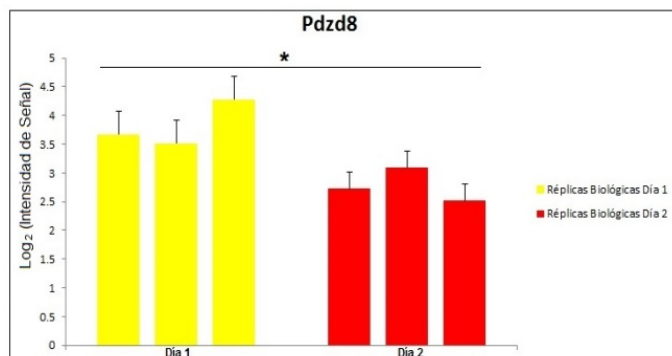
Las intersecciones de las listas representan aquellos ARNm que varían su expresión de acuerdo a uno de los dos comportamientos observados y que a su vez presentan una función relacionada al citoesqueleto. Así entonces, tenemos que del conjunto de ARNm que aumentan su expresión, dos de éstos corresponden a proteínas con funciones relacionadas al citoesqueleto. Se trata de la Miosina 18a (Myo18a) (Fold Change=2.67) y de la proteína de unión a microtúbulos Hook 3 (Hook3) (Fold Change=5,7). Asimismo, del conjunto de ARNm que desciende su expresión, solo uno de ellos corresponde a proteínas con la función en evaluación, el gen *PDZ domain containing protein 8* (PDZD8, alternativamente conocido como PDZK8) (Fold Change= -2.1).

En las siguientes figuras se muestran los niveles de expresión de los ARNm seleccionados en las tres réplicas biológicas para los Días 1 y 2. Los niveles de expresión son considerados a partir de las intensidades de las señales. En la **Figura 6** se puede observar un aumento en los niveles de expresión entre los Días 1 y 2 de los ARNm de Myo18a y Hook3. En cambio, en la **Figura 7** se puede observar que los niveles de expresión de Pdzd8 presentan un descenso entre los Días 1 y 2.

Los resultados observados en estas figuras se encuentran en línea con los resultados de los cálculos de expresión y las magnitudes de los Fold Changes.



**Figura 6.** Niveles de expresión de ARNm que presentan un aumento en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2. Cada día está representado por tres réplicas biológicas. En ambos gráficos, las réplicas de color amarillo corresponden al Día 1 mientras que aquellas réplicas de color rojo corresponden al Día 2. Las intensidades de señal se encuentran en escala logarítmica de base 2. Ambos gráficos presentan los desvíos estándar calculados para cada día y cada gen y son significativos estadísticamente (\*= p-Valor <0.05). a) Gráfico correspondiente al comportamiento presentado por Myo18a. b) Gráfico correspondiente al comportamiento presentado por Hook3.



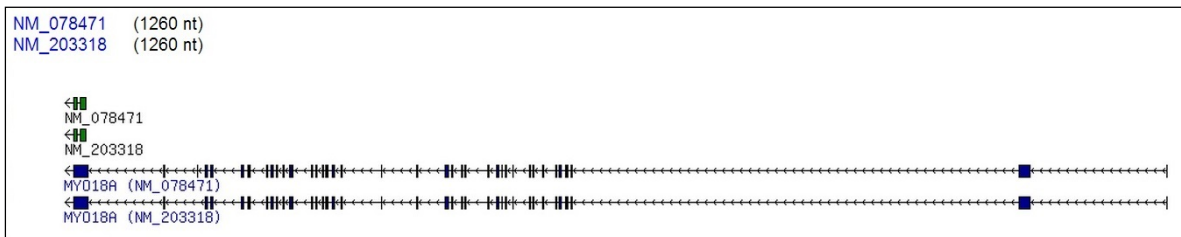
**Figura 7.** Niveles de expresión del ARNm de Pdzd8. Cada día está representado por tres réplicas biológicas. En color amarillo se muestran las réplicas correspondientes al Día 1 mientras que en color rojo se muestran las réplicas correspondientes al Día 2. Las intensidades de señal se encuentran en escala logarítmica de base 2. Cada día presenta representado el desvío estándar. El gráfico es significativo estadísticamente (\*= p-Valor <0.05).

Los genes previamente descritos, fueron seleccionados para proseguir con el análisis.

## Búsqueda de los miARNs con sitios de unión en los ARNm seleccionados

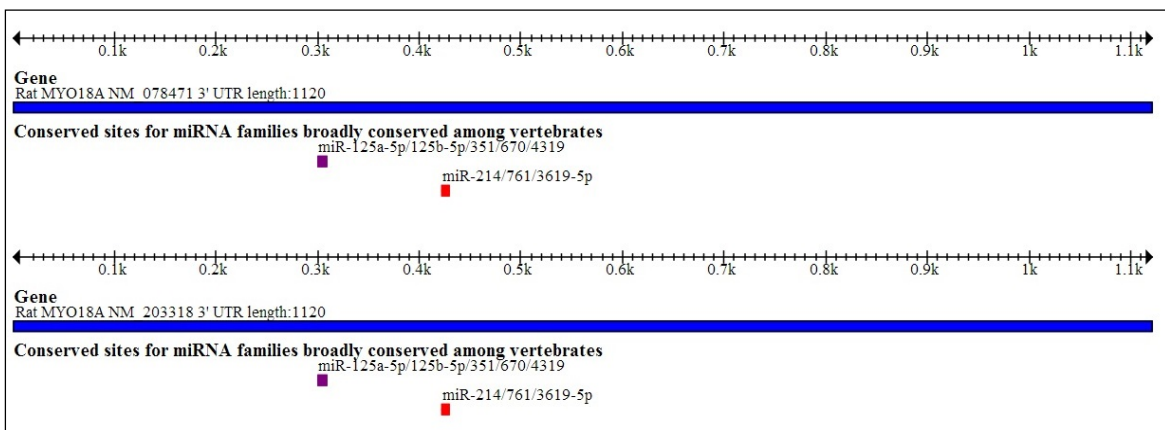
Para identificar los miARNs que presentan sitios de unión en los extremos 3'-UTR de los ARNm de Myo18a, Hook3 y Pdzd8, se empleó la plataforma de predicción TargetScan. La identificación de sitios de unión para miARNs en los ARNm indica que tales genes pueden ser potencialmente regulados por miARNs.

Se comenzó con la evaluación de Myo18a. Este gen posee dos posibles transcritos que presentan variaciones de sus extremos 3'-UTR, lo cual potencialmente podría variar los sitios de unión para miARNs (**Figura 8**).



**Figura 8.** Variantes de transcritos del gen Myo18a con diferencias en los extremos 3'-UTR. Los transcritos son NM\_078471 y NM\_203318, ambos con 1260 nucleótidos de longitud.

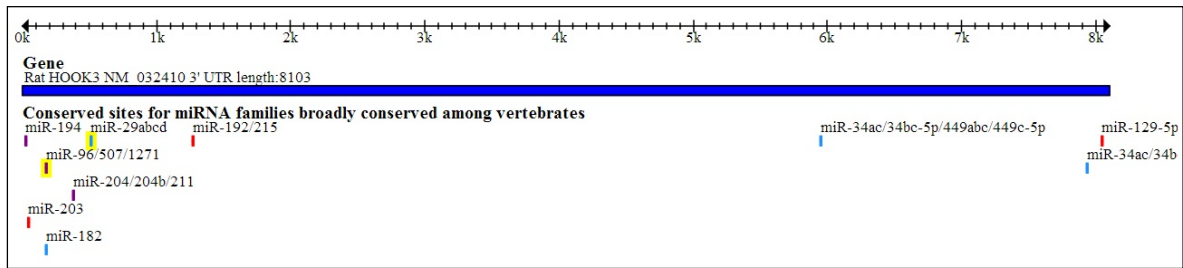
Tras seleccionar los dos posibles transcritos se observa que no presentan diferencias en los sitios de unión para miARNs y ambos se comportan como potenciales blancos de unión para los mismos miARNs (**Figura 9**).



**Figura 9.** Sitios de unión de miARNs en los extremos 3'-UTR de las dos variantes de transcritos del gen Myo18a. Solamente se detallan los sitios de unión para familias de miARNs conservadas entre vertebrados. Ambos transcritos presentan sitios de unión para los mismos miARNs.

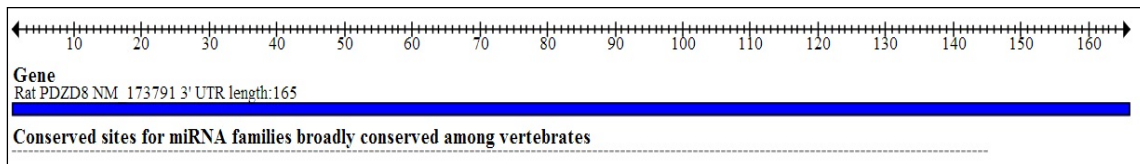


Posteriormente se evaluaron los sitios de unión de miARNs en el extremo 3'-UTR de Hook3. En este caso, solo se encuentra una variante de transcripto (**Figura 10**).



**Figura 10.** Sitios de unión de miARNs en el extremos 3'-UTR del único transcripto del gen Hook3. Solamente se detallan los sitios de unión para familias de miARNs conservadas entre vertebrados.

Finalmente, se evaluaron los sitios de unión de miARNs en el extremo 3'-UTR en el ARNm del gen Pdzd8. En este caso, se observó que el extremo 3'-UTR de este mensajero no presenta sitios de unión para ninguna familia conservada de miARNs (**Figura 11**).



**Figura 11.** El extremos 3'-UTR del único transcripto del gen Pdzd8 no posee sitios de unión de miARNs pertenecientes a familias conservadas entre vertebrados.

En la siguiente tabla se resumen los resultados del estudio predictivo empleando TargetScan de los miARNs con sitios de unión en los extremos 3'-UTR de los genes en estudio. Se contemplan únicamente aquellos miARNs conservados con apareamientos del tipo 8mer o 7mer-m8 (Ver sección **II.1.5**) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** miARNs conservados con sitio de unión en los 3'-UTR de los transcritos de los genes de interés. Apareamiento: posición y tipo de interacción entre los nucleótidos del miARN y el sitio de unión.

Gen	miARN	Apareamiento
<b>Myo18a</b>	miR-351	8mer
	miR-125b-5p	8mer
	miR-125a-5p	8mer
	miR-761	7mer-m8
	miR-214	7mer-m8
<b>Hook3</b>	miR-96	8mer
	miR-204	8mer
	miR-211	8mer
	miR-194	8mer
	miR-215	8mer
	miR-192	8mer
	miR-96	7mer-m8
	miR-203	7mer-m8
	miR-129	7mer-m8
<b>Pdzd8</b>	X	X

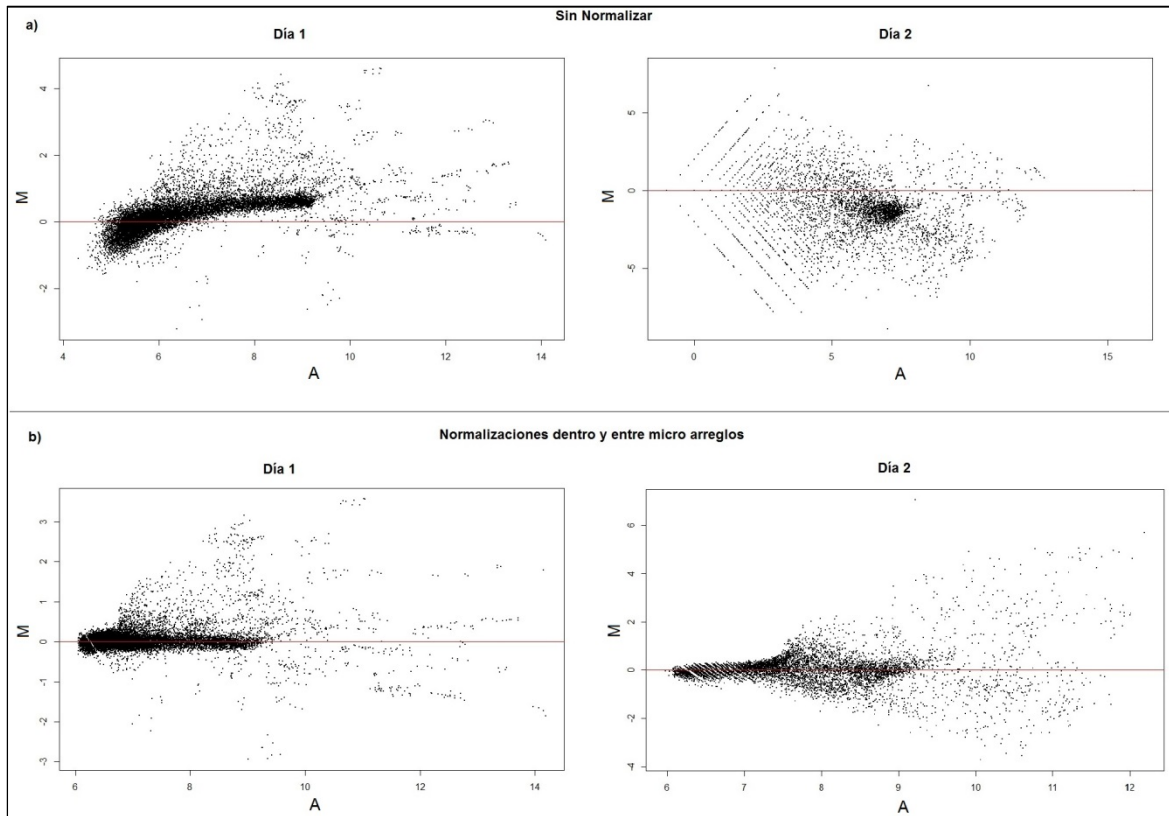
### III.1.2) Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con micro arreglos de plataforma Agilent de dos canales

#### Pre-procesamiento de datos

Se realizó el pre-procesamiento de los datos de expresión de miARNs obtenidos por Sotelo-Silveira y colaboradores empleando micro arreglos de dos canales de la plataforma Agilent.

Se realizaron gráficos de MvsA para el set de datos completos tanto antes como después de las normalizaciones de los mismos (dentro y entre micro arreglos). La **Figura 12** contiene a modo de

ejemplo los gráficos de MvsA para una réplica biológica del Día 1 y del Día 2 tanto antes como después de las normalizaciones. Con éstos se puede visualizar la influencia de las normalizaciones sobre el set de datos. Si se comparan los gráficos antes (**Figura 12a**) y después de las normalizaciones (**Figura 12b**), se puede ver que en el segundo caso los datos presentan una menor dispersión y mayor tendencia a ajustarse a la media del valor de M.

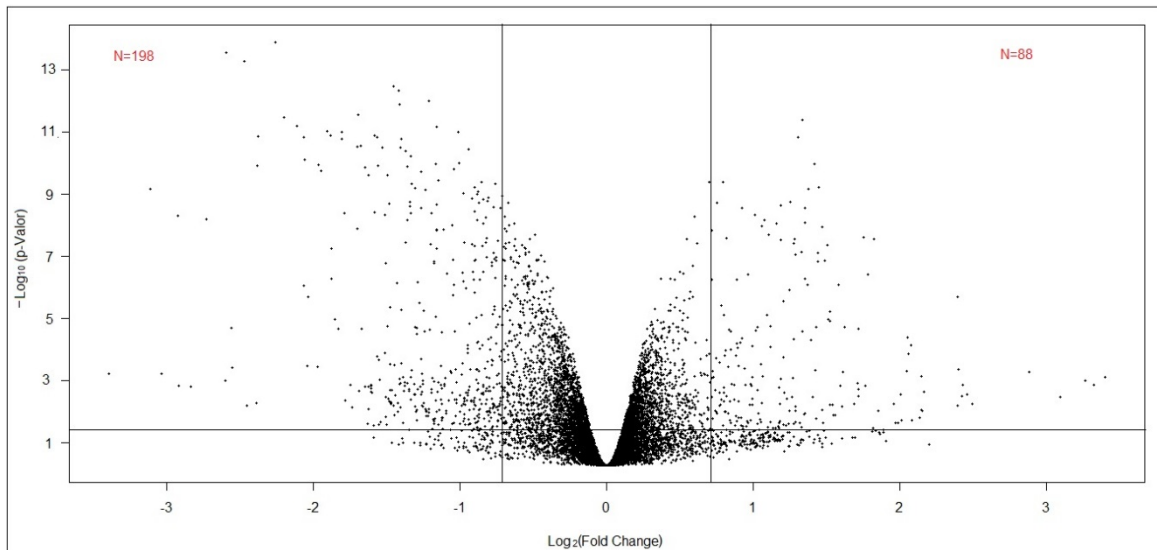


**Figura 12.** Gráficos de MvsA para una réplica biológica de Día 1 y de Día 2. La línea roja indica la media de M en función del promedio de intensidades. a) Gráficos de MvsA antes de la normalización de datos. b) Gráficos de MvsA luego de la normalización de datos dentro y entre micro arreglos. Si se comparan los gráficos de MvsA obtenidos en a) y b) se puede ver que las normalizaciones de los datos disminuye la dispersión de los valores de intensidad los cuales tienden a ajustarse en mayor medida a una recta correspondiente a la media de M (línea roja).

### Procesamiento de datos: cálculo de expresión diferencial

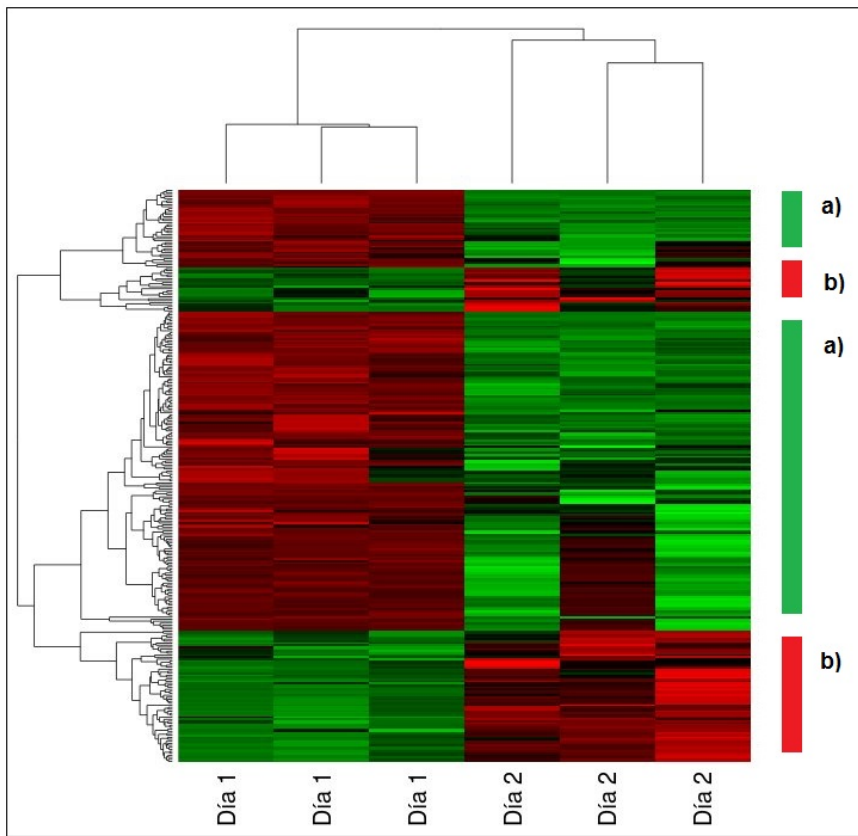
Se realizó el cálculo de expresión diferencial de miARNs en el cabo proximal entre los Días 1 y 2 luego de la lesión. Para visualizar el resultado del mismo se realizó un “Volcano plot” (**Figura 13**). En dicho gráfico, se colocaron barras para señalar el conjunto de sondas que se encuentran entre los valores de significancia establecidos tanto para el Fold Change ( $\pm 1.8$ ) como para el p-Valor (0.05). En el mismo se puede ver que hay un número de 198 sondas (correspondientes a 76 miARNs) que

descienden su nivel de expresión entre las condiciones evaluadas, mientras que hay un número de 88 sondas (correspondiente a 22 miARNs) que presentan un aumento en sus niveles de expresión.



**Figura 13.** Volcano plot. Se grafican los resultados del análisis de expresión diferencial entre las condiciones cabo proximal Día 2 y cabo proximal D1. El Fold Change se expresa en Logaritmo en base 2, mientras que el p-Valor se expresa en  $-\text{Logaritmo}$  en base 10. Las barras colocadas corresponden a los límites de significancia establecidos para los valores de Fold Change ( $\pm 1.8$ ) y p-Valor (0.05). N: número de sondas encontradas en cada cuadrícula. Se observa un N=88 correspondiente a las sondas que presentan un aumento en sus niveles de expresión y un N=198 correspondiente a las sondas que descienden sus niveles de expresión.

A partir de las sondas que cumplen con los valores de significancia establecidos (N=286) se extrajeron los valores de intensidad normalizados y se realizó un Cluster Jerárquico (Heatmap) (**Figura 14**). Con éste se puede visualizar las diferencias globales en los niveles de expresión de miARNs entre los Días 1 y 2. En el mismo se puede ver que las réplicas biológicas correspondientes a los mismos días se agrupan entre sí, lo que indica que presentan patrones globales de expresión similares. Conjuntamente se pueden detectar diferencias en los niveles de expresión de miARNs entre ambas condiciones que se señalan por las barras “a” y “b”. Las barras “a” señalan las regiones del Heatmap en la cual se encuentran aquellos miARNs que presentan un descenso en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2. Las barras “b” señalan las regiones del Heatmap en la cual se encuentran aquellos miARNs que presentan un aumento en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2 luego de la lesión.



**Figura 14.** Cluster Jerárquico de las condiciones “Cabo Proximal Día 2” (Día2) y “Cabo Proximal Día1” (Día1). Las réplicas biológicas correspondientes a los mismos días se asocian entre sí, lo que indica que presentan patrones globales de expresión similares. Se pueden ver diferencias globales en los niveles de expresión de miARNs entre los Días 1 y 2. **a)** Estas barras señalan la región del Heatmap en la cual se observa un descenso en los niveles globales de expresión de miARNs entre los Días 1 y 2. **b)** Estas barras señalan la región del Heatmap en la cual se observa un aumento en los niveles globales de expresión de miARNs entre los Días 1 y 2.

En las siguientes tablas se detallan las listas de miARNs que presentaron una expresión diferencial entre los Días 1 y 2 luego de la lesión.

**Tabla 4.** Lista de miARNs que presentan un aumento en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2.

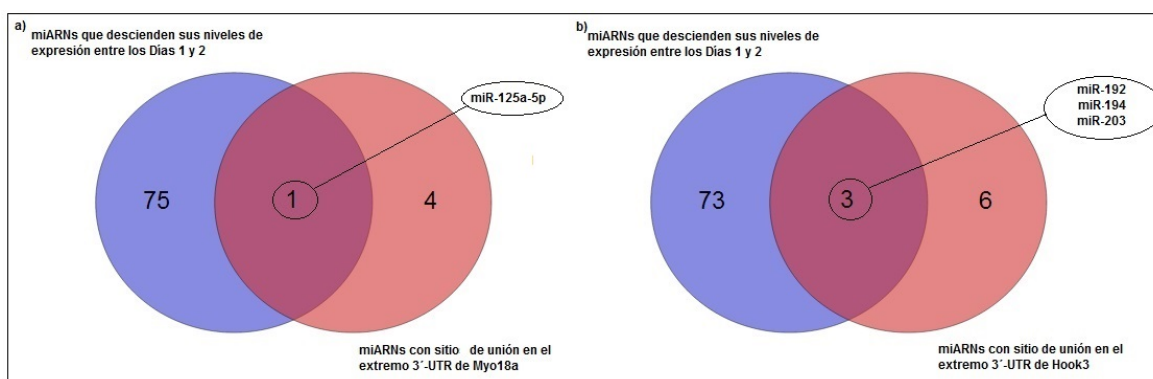
Nombre miARN	Log2 (Fold Change)
miR-682	2.43
miR-338	2.15
miR-690	2.06
let-7b	1.79
miR-219	1.72
miR-1	1.60
miR-201	1.52
let-7a	1.47
miR-138	1.47
let-7d	1.43
let-7f	1.43
miR-103	1.39
let-7c	1.29
miR-125b	1.28
cel-miR-229	1.27
miR-99	1.21
miR-720	1.20
miR-172	1.18
miR-329	1.12
miR-17	1.11
miR-709	1.07
let-7e	1.06
miR-22	1.00
miR-1214	0.98
let-7i	0.89
miR-24	0.89
miR-K12-10	0.87
miR-744	0.85

**Tabla 5.** Lista de miARNs que presentan un descenso en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2.

Nombre miARN	Log2(Fold Change)	Nombre miARN	Log2(Fold Change)
miR-127	-3.39	miR-124a	-1.27
miR-85	-3.04	miR-246	-1.27
miR-124a	-2.92	miR-395	-1.26
miR-817	-2.92	miR-219	-1.25
miR-658	-2.83	miR-1211	-1.24
miR-193	-2.73	miR-7a	-1.22
miR-763	-2.60	miR-144	-1.21
miR-27a	-2.55	miR-10a	-1.20
miR-34c	-2.39	miR-322	-1.20
miR-128a	-2.11	miR-235	-1.19
miR-21	-2.04	miR-101	-1.18
miR-133a	-2.04	miR-19	-1.15
miR-128b	-1.97	miR-39	-1.13
miR-181	-1.89	miR-132	-1.13
miR-15	-1.79	miR-325	-1.13
miR-2c	-1.69	miR-31	-1.10
miR-17	-1.67	miR-449b	-1.09
miR-681	-1.62	miR-451	-1.07
miR-1	-1.62	miR-239b	-1.06
miR-126	-1.56	miR-801	-1.05
miR-36	-1.55	miR-29a	-0.98
miR-296	-1.55	miR-208	-0.95
miR-124b	-1.50	miR-154	-0.93
miR-30e-5p	-1.50	miR-596	-0.93
miR-9	-1.47	miR-203	-0.93
miR-199	-1.45	miR-191	-0.90
miR-145	-1.43	miR-205b	-0.90
miR-125a-5p	-1.41	miR-194	-0.90
miR-202	-1.41	miR-8	-0.90
miR-290	-1.40	miR-407	-0.89
miR-263	-1.38	miR-441	-0.89
miR-282	-1.37	miR-192	-0.89
miR-341	-1.36	miR-143	-0.88
miR-302	-1.35	miR-30a-5p	-0.88
miR-23	-1.35	miR-686	-0.88
miR-46	-1.33	miR-142a-5p	-0.87
miR-25	-1.31	miR-420	-0.86
miR-419	-1.31	miR-30d	-0.85
miR-345	-1.29	miR-450	-0.85

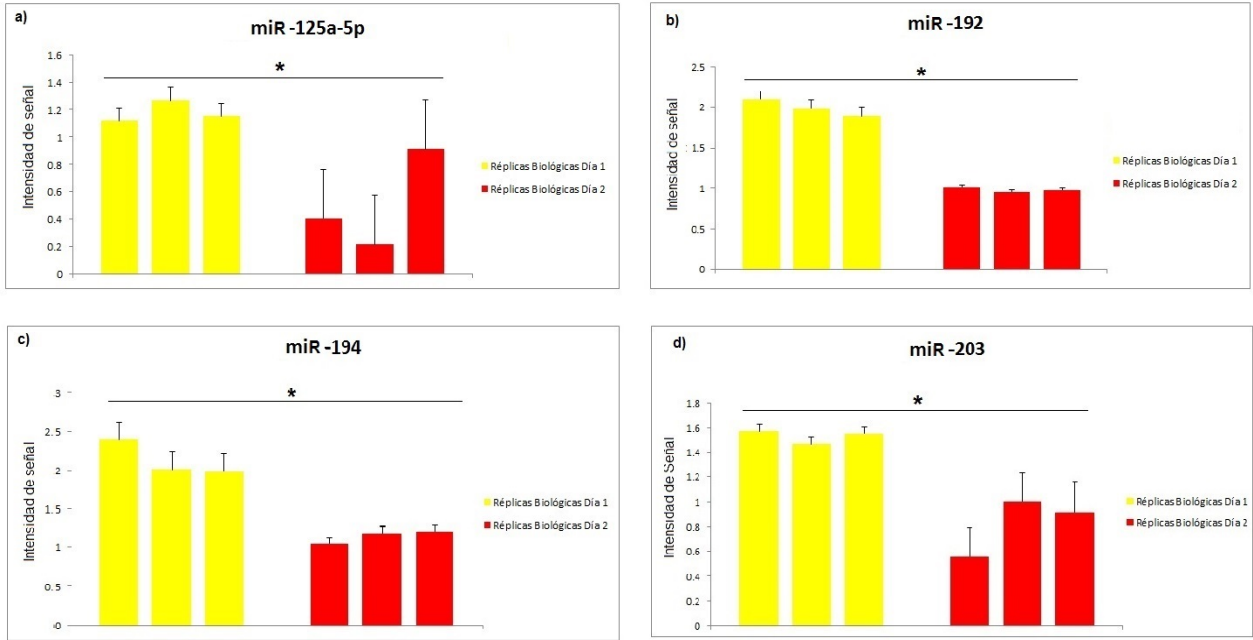
### III.1.3) Búsqueda de correlación entre los comportamientos de ARNm y miARNs

En esta sección se evaluó si existe una correlación en los niveles de expresión de los ARNm codificantes para Myo18a y Hook3 y alguno de los miARNs que poseen sitios de unión en sus extremos 3'-UTR. Los ARNm codificantes para Myo18a y Hook3 presentaron un aumento en sus niveles de expresión, por lo tanto se buscó observar un descenso en los niveles de expresión de alguno de los miARNs que poseen sitios de unión en dichos ARNm. Para ello se realizaron comparaciones entre las listas de miARNs con sitios de unión en los ARNm de interés y los miARNs obtenidos experimentalmente que presentan un descenso en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2. En la siguiente figura se detalla los resultados (**Figura 15**).



**Figura 15.** Visualización de las comparaciones entre la lista de miARNs que experimentaron un descenso en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2 luego de la lesión y las listas de miARNs predichos con TargetScan que tienen sitios de unión en los extremos 3'-UTR de los ARNm de interés. a) Evaluación de los miARNs con sitio de unión en el 3'-UTR de Myo18a. b) Evaluación de los miARNs con sitio de unión en el 3'-UTR de Hook3.

En la siguiente figura se muestran los comportamientos de los niveles de expresión para los miARNs con sitios de unión en los extremos 3'-UTR de Myo18a y Hook3 que presentan un descenso en sus niveles de expresión en nuestras muestras. La **Figura 16a** muestra el comportamiento para el único miARN con sitio de unión en Myo18a que en nuestro estudio presenta un descenso en sus niveles de expresión. Se trata del miR-125a-5p. Las **Figuras 16b-d** muestran los comportamientos para los tres miARNs con sitios de unión en Hook3 que en nuestro estudio presentan un descenso en sus niveles de expresión. Se trata de miR-192, miR-194 y miR-203. Los resultados observados en esta figura están en línea con el resultado del cálculo de expresión diferencial y con las magnitudes de los Fold Changes.



**Figura 16.** Niveles de expresión de los miARN con sitios de unión en los ARNm de interés que presentaron un descenso en sus niveles de expresión entre los Días 1 y 2. Cada día está representado por tres réplicas biológicas. En todos los gráficos, las réplicas de color amarillo corresponden al Día 1 mientras que aquellas réplicas de color rojo corresponden al Día 2. Todos los gráficos presentan los desvíos estándar calculados para cada día y cada miARN y son significativos estadísticamente (\* = p-Valor <0.05). a) Gráfico correspondiente al comportamiento del miR-125a-5p con sitio de unión en Myo18a. b) Gráfico correspondiente al comportamiento del miR-192 con sitio de unión en Hook3. c) Gráfico correspondiente al comportamiento del miR-194 con sitio de unión en Hook3. d) Gráfico correspondiente al comportamiento del miR-203 con sitio de unión en Hook3.



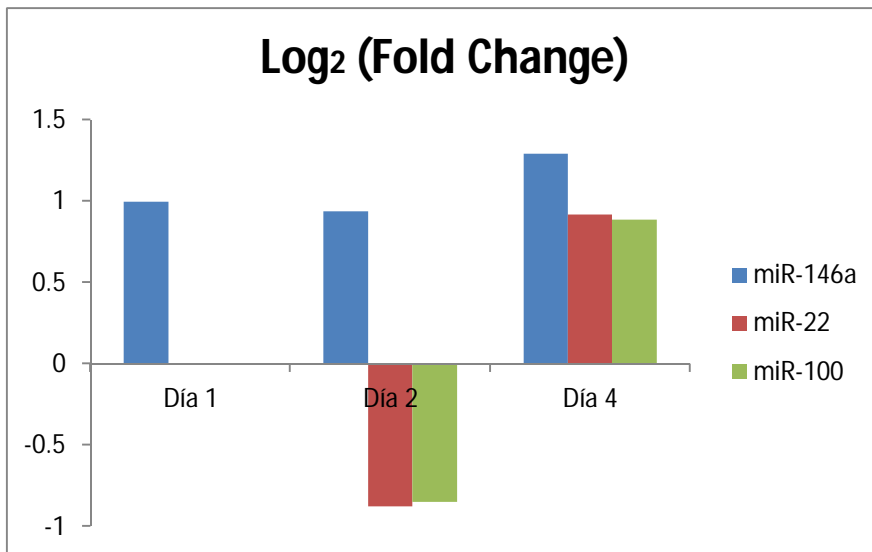
## **III.2) Búsqueda de miARNs expresados diferencialmente en el cabo proximal de nervio ciático seccionado y evaluación de la representación de la función estructural dentro de sus blancos predictivos**

### **II.2.1) Análisis de datos de expresión de miARNs obtenidos con micro arreglos de plataforma Agilent de dos canales**

En esta sección se continuó con el análisis de los datos de expresión de miARNs generados previamente por nuestro grupo de trabajo. A partir de éstos se realizó una búsqueda de los miARNs que se expresan diferencialmente en el cabo proximal del nervio ciático seccionado. En esta instancia se empleó el set de datos completos que contempla las condiciones cabo proximal y cabo distal para los días 1, 2 y 4 luego de la lesión. Como controles se emplearon para cada día, muestras correspondientes a los nervios contralateral sin lesionar.

Para determinar cuáles son los miARNs que se expresan diferencialmente en el cabo proximal se realizaron las comparaciones cabo proximal versus control y cabo distal versus control. A partir de los resultados de las mismas, se seleccionaron aquellos miARNs que presentaran Fold Changes significativos ( $\geq 1.8$ ) únicamente en la primera comparación. La variación significativa en la primera comparación indica que determinado miARN se expresa diferencialmente en el cabo proximal. No obstante, no puede discriminar entre aquellos miARNs que también se expresan diferencialmente en el cabo distal y por lo tanto que no son exclusivos del cabo proximal. Para discriminar a aquellos miARNs que podrían variar conjuntamente en el cabo distal se realiza la comparación cabo distal versus control y se seleccionan únicamente aquellos que no se expresan diferencialmente entre estas condiciones.

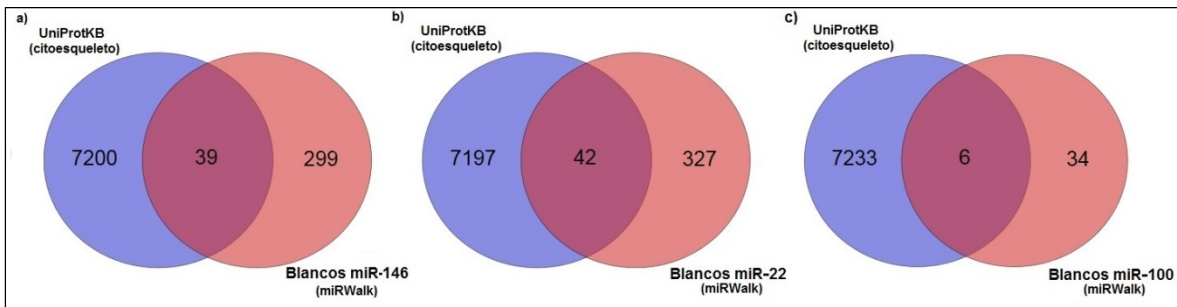
A partir de ese grupo de miARNs, se seleccionaron para continuar con el estudio, aquellos que se encontraron representados en más de un día. Los resultados se detallan en la **Figura 17**. En esta se puede ver que luego de filtrar aquellos miARNs que presentaran una variación significativa en la comparación cabo distal y control, únicamente tres miARNs presentan Fold Changes significativos para la comparación entre cabo proximal y control. Se trata de miR-146, miR-22 y miR-100. Únicamente el miR-146 se expresa diferencialmente en los tres días evaluados. Los otros miARNs solo se expresan diferencialmente en los Días 2 y 4 luego de la lesión, presentando una amplia variación entre los mismo de forma tal que invierten en signo sus Fold Changes.



**Figura 17.** miARNs expresados diferencialmente exclusivamente en el cabo proximal del nervio lesionado en al menos dos días. En la figura se grafican en escala logarítmica de base dos los Fold Changes correspondientes a las comparaciones cabo proximal versus control para cada día. Se observa que únicamente miR-146 se expresa diferencialmente en los tres días evaluados. Los miR-22 y miR-100 solamente se expresan diferencialmente en los días 2 y 4. Sin embargo presentan una gran variación entre dichos días invirtiendo el signo del Fold Change. Los valores de Fold Changes graficados son significativos estadísticamente ( $p$ -Valores  $<0.05$ ) para los cálculos de Test de Student.

### **Búsqueda predictiva de blancos de miARNs e identificación de genes codificantes para proteínas estructurales dentro de los mismos**

En esta sección se procedió a la búsqueda predictiva de blancos para los miARNs seleccionados en la sección anterior. Posteriormente, las listas de blancos obtenidas para cada miARN fueron comparadas con la lista “UniProtKB (Citoesqueleto)”. Con esto se pudo identificar el número de genes codificantes para proteínas estructurales dentro del conjunto de blancos de cada miARN evaluado (**Figura 18**). En dicha figura se puede observar que los blancos predictivos para los tres miARNs evaluados consisten en más de un 10% en ARNm codificantes para proteínas estructurales.



**Figura 18.** Visualización de la representación de proteínas del citoesqueleto o con funciones asociadas a éste, entre los blancos predictivos obtenidos con “miRWalk” para los tres miARNs de interés. UniProtKB (citoesqueleto) es una lista de referencia de proteínas citoesqueléticas o asociadas a éstas, obtenida de la base de datos “UniProtKB/Swiss-Prot” del portal online de libre acceso “ExpASY”. Los blancos predictivos para los tres miARNs evaluados consisten en más de un 10% en ARNm codificantes para proteínas estructurales. a) Evaluación de los blancos del mir-146. b) Evaluación de los blancos del mir-22. c) Evaluación de los blancos del mir-100.

### III.2.2) Análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños

En esta sección se analizaron los datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños generados por Yu y colaboradores (2011). Los datos fueron obtenidos de la plataforma SRA del NCBI y su código de acceso es SRP005400.

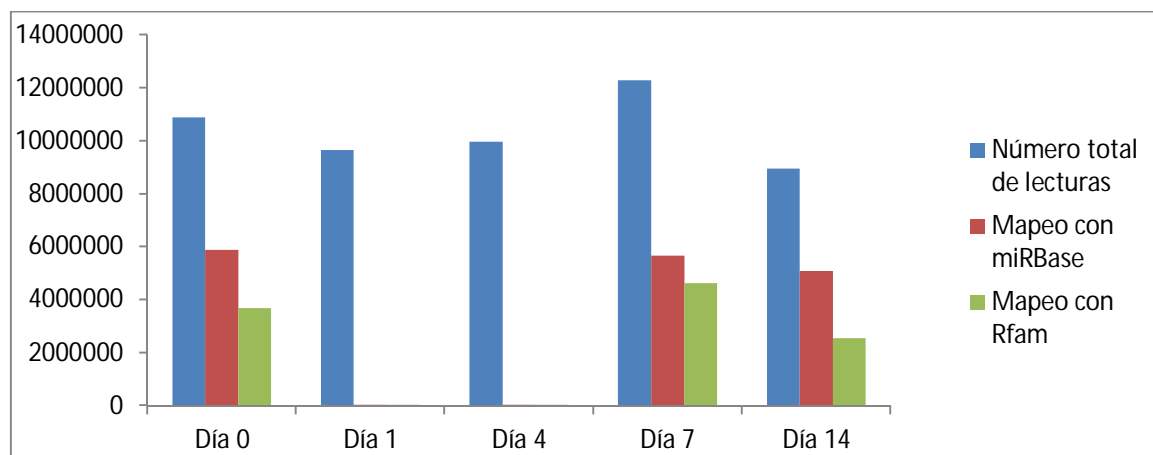
Se realizó éste análisis para comparar sus resultados con aquellos obtenidos tras el análisis de los datos generados previamente por nuestro grupo de trabajo. Con esto se busca obtener información más robusta aportada por dos experimentos independientes en los que se emplean dos metodologías diferentes para análisis transcriptómicos.

Para el análisis de los datos se empleó el software CLC Genomics Workbench y se siguieron dos estrategias diferentes. Cada estrategia fue llevada a cabo empleando dos bases de datos de miARNs de referencia. Las referencias empleadas fueron la base de datos de miARNs miRBase y la base de datos de ARNs pequeños “Rfam”. Esta segunda base de datos fue empleada en el estudio de Yu y colaboradores (2011). Debido a que se trata de una base de datos de ARNs pequeños, se debió realizar un filtrado de la misma para obtener únicamente la lista correspondiente a miARNs. Para ello se diseñó un “script” en PYTHON.

## Estrategia 1

La primera estrategia consistió en el empleo del *pipeline* para análisis de datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños del software CLC Genomics Workbench. Luego del filtrado de lecturas de baja calidad, remoción de adaptadores e identificación de “tags” únicos y su cuantificación, se procedió al mapeo de lecturas empleando las dos bases de datos como referencia.

Los porcentajes de los mapeos de las lecturas empleando las dos bases de datos de referencia presentan grandes diferencias entre aquellos correspondientes a los Días 1 y 4 y los correspondientes a los días 0, 7 y 14. Los Días 1 y 4 presentan un número reducido de lecturas mapeadas en ambas bases de datos. Teniendo en cuenta que se trata de un experimento de secuenciación masiva de ARNs pequeños, esos porcentajes están muy por debajo de lo esperable. En cambio, los porcentajes de lecturas mapeadas en los Días 0, 7 y 14 se encuentran dentro de lo esperado para este tipo de análisis (**Figura 19**) (**Tabla 6**).



**Figura 19.** Resultados del mapeo de lecturas durante el pre-procesamiento de los datos siguiendo el *pipeline* para análisis de ARNs pequeños del CLC Genomics Workbench. Se muestra el mapeo de las lecturas empleado dos bases de datos diferentes: miRBase y Rfam. La primera es una base de datos de miARNs. La segunda es una base de datos de ARNs pequeños que se filtró para que contenga únicamente miARNs. Se observa que el mapeo en los Días 0, 7 y 14 alcanza valores significativos al emplear ambas bases de datos, aunque hay un número mayor de lecturas mapeadas al emplear la base de datos miRBase. Se observa que en los Días 1 y 4 el mapeo con ambas bases de datos es próximo a 0.

**Tabla 6.** Resumen de los resultados obtenidos durante el mapeo de las lecturas con las bases de datos miRBase y Rfam siguiendo el *pipeline* para análisis de datos de secuenciación de ARNs pequeños del CLC Genomics Workbench.

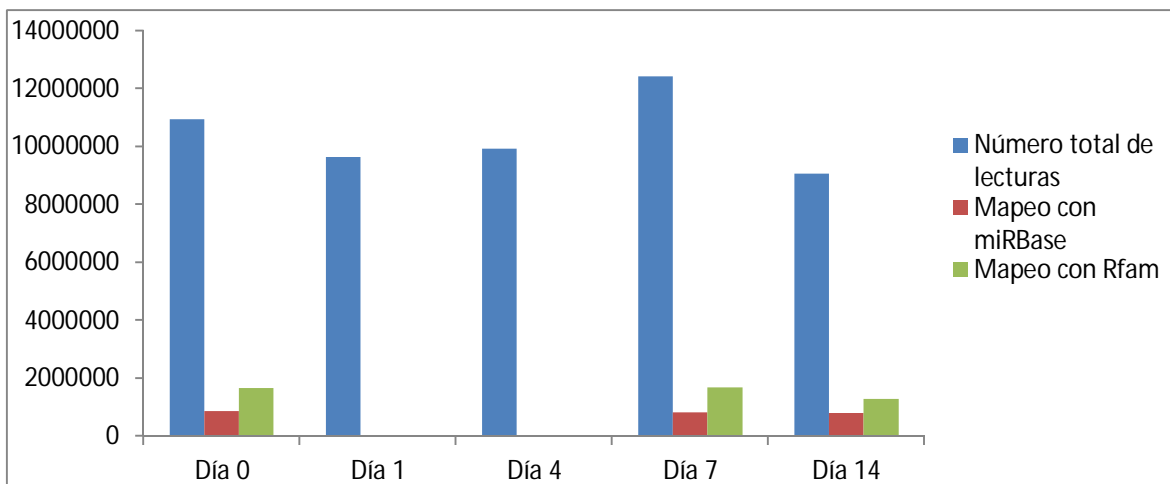
Día	Número total de lecturas	Número de lecturas mapeadas con miRBase	Porcentaje	Número de lecturas mapeadas con Rfam	Porcentaje
Día 0	10891328	5895943	54.13	3688840	33.87
Día 1	9656879	2197	0.02	2182	0.02
Día 4	9966063	180	0.00	869	0.01
Día 7	12287147	5663914	46.10	4637287	37.74
Día 14	8957368	5078857	56.70	2546549	28.43

Tras obtener estos resultados, se planteó la realización de un nuevo análisis siguiendo una segunda estrategia para tratar de dilucidar si estos resultados dispares se deben a errores en el pre-procesamiento de los datos o a errores en los datos correspondientes a los Días 1 y 4 depositados en el SRA por Yu y colaboradores (2011).

## Estrategia 2

La segunda estrategia consistió en el pre-procesamiento de los datos empleando la metodología básica para análisis de datos de secuenciación del CLC Genomics Workbench. Se siguió esta estrategia ya que es una forma más amplia de procesar las lecturas que podría impedir que se discrimine un número de lecturas más allá de aquellas que no cumplen con los filtros aplicados, como puede ser por calidad y tamaño. Con esto esperamos aumentar el número total de lecturas a mapear, lo cual podría influir en los resultados de los mapeos.

Se importaron los datos, se realizó el filtrado de lecturas de baja calidad y de dimensiones que no corresponden a aquellas que presentan los miARNs (menos de 18 nucleótidos y más de 30 nucleótidos) y se removieron los adaptadores. Posteriormente se procedió a mapear los datos de secuenciación contra las dos bases de datos. Los resultados fueron similares a los obtenidos mediante la primera estrategia. Se observa que el porcentaje de lecturas mapeadas en los Días 1 y 4 son próximos a 0, lo cual está por debajo del porcentaje esperable para el mapeo de este tipo de datos (**Figura 20**) (**Tabla 7**).



**Figura 20.** Resultados del mapeo de lecturas durante el pre-procesamiento de los datos siguiendo la metodología básica del CLC Genomics Workbench para el análisis de datos de secuenciación. Se muestra el mapeo de las lecturas empleado dos bases de datos diferentes: miRBase y Rfam. La primera es una base de datos de miARNs. La segunda es una base de datos de ARNs pequeños que se filtró para que contenga únicamente miARNs. Se observa que el mapeo en los Días 0, 7 y 14 alcanza valores significativos al emplear ambas bases de datos, aunque hay un número mayor de lecturas mapeadas al emplear la base de datos miRBase. Se observa que en los Días 1 y 4 el mapeo con ambas bases de datos es próximo a 0.

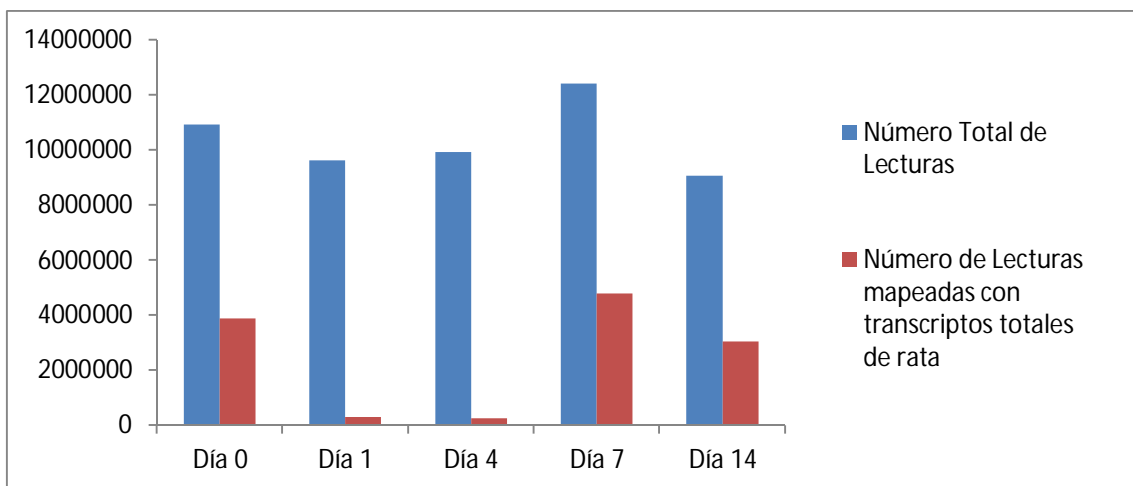
**Tabla 7.** Resumen de los resultados obtenidos durante el mapeo de las lecturas con las bases de datos miRBase y Rfam siguiendo la metodología básica para análisis de datos de secuenciación del CLC Genomics Workbench.

Día	Número total de lecturas	Número de lecturas mapeadas con miRBase	Porcentaje	Número de lecturas mapeadas con Rfam	Porcentaje
Día 0	10936083	881016	8.06	1676721	15.33
Día 1	9634891	15278	0.16	2229	0.02
Día 4	9929508	13223	0.13	1860	0.02
Día 7	12434542	820974	6.60	1693640	13.62
Día 14	9073376	795926	8.77	1282434	14.13

### Evaluación de la identidad de las lecturas.

En esta sección se decidió realizar una nueva prueba para evaluar si los datos de los Días 1 y 4 podían corresponder a datos de Secuenciación de otros tipos de ARNs. Para ello se obtuvo el conjunto total de transcritos de rata del sitio FTP de la plataforma NCBI. Con esta referencia se realizaron nuevos mapeos. Primero se mapearon las lecturas totales de cada Día contra la base de datos de miARNs miRBase y se seleccionaron aquellas lecturas que no mapearon para proseguir con el análisis. De esta manera se discriminan las lecturas que corresponden a miARNs. Con el conjunto de lecturas que no mapearon, se procedió a realizar un nuevo mapeo empleando como

referencia el conjunto total de transcritos de rata. El resultado obtenido continuó presentando el mismo patrón observado en los anteriores mapeos (**Figura 21**). Se observa que para los Días 0, 7 y 14 el mapeo de lecturas contra la base de datos de transcritos totales de rata se encuentra por encima del 30% en todos los caso. Debido a que se trata de Secuenciación masiva de ARNs pequeños y teniendo en cuenta que previamente fueron filtrados los miARNs, los porcentajes observados posiblemente correspondan a las demás clases de miARNs pequeños. Sin embargo, para los Días 1 y 4 los porcentajes de mapeos son inferiores al 3% (**Tabla 8**).



**Figura 21.** Resultados del mapeo de lecturas empleando como referencia la base de datos del conjunto total de transcritos de rata obtenidos del sitio FTP de la plataforma NCBI. Previamente se filtraron las lecturas por tamaño y calidad y se removieron adaptadores. Posteriormente se discriminaron aquellas lecturas que presentaran un mapeo con la base de datos miRBase. Este pre-procesamiento se llevó a cabo siguiendo la metodología básica para el análisis de datos de secuenciación del CLC Genomics Workbench. Se observa que para los Días 0, 7 y 14 el número de lecturas mapeadas es significativo mientras que no lo es para los Días 1 y 4.

**Tabla 8.** Resumen de los resultados del mapeo de lecturas empleando como referencia el conjunto total de transcritos de rata.

Día	Número total de lecturas	Número de lecturas mapeadas con los transcritos totales de rata	Porcentaje
Día 0	10936083	3887399	35.55
Día 1	9634891	288493	2.99
Día 4	9929508	252764	2.55
Día 7	12434542	4786046	38.49
Día 14	9073376	3053336	33.65

Si tomamos en conjunto este resultado con los observados en los mapeos anteriores, en los cuales el porcentaje de miARNs observados en los Días 1 y 4 era próximo al 0%, podemos decir que los datos depositados por Yu y colaboradores para los días mencionados no corresponden a datos de secuenciación de ARNs. Esto se debe a que no solo el mapeo de miARNs no fue significativo sino que tampoco fue significativo el mapeo con la base de datos del set completo de ARNs celulares de rata (transcriptos totales de rata).

Con estos resultados concluimos que había algún problema con los datos, lo que nos impulsó a ponernos en contacto con los autores vía correo electrónico. Se le escribió en varias ocasiones al “autor de contacto” pero no tuvimos respuesta alguna. Debido a que son precisamente los días 1 y 4 los que presentan mayor interés para nosotros ya que son los únicos que tenemos en común debimos abandonar nuestra idea original de complementar nuestros resultados con los obtenidos por Yu y colaboradores (2011).



## IV) Discusión

### IV.1) Búsqueda de correlación inversa entre ARNm codificantes para proteínas estructurales y miARNs con sitios de unión en los mismos

Los resultados mostraron que existe una correlación inversa entre los niveles de expresión de Myo18a y Hook3 con algunos de los miARNs que potencialmente regulan su expresión. En el caso de Myo18a, se encontró una correlación inversa con los niveles de expresión del miR-125a-5p. En cuanto a Hook3, se pudo ver una correlación inversa con los niveles de expresión de tres de sus miARNs potencialmente reguladores: miR-192, miR-194 y miR-203 (**Figura 13**).

La observación de una correlación inversa entre los comportamientos de los ARNm de los genes Myo18a y Hook3 con algunos de los miARNs que predictivamente regulan su expresión, se ve potenciada por el hecho de que los análisis de expresión de ambos tipos de ARNs fueron llevados a cabo a partir de las mismas muestras biológicas. De esta manera tenemos que en las mismas muestras de nervio lesionado se observan variaciones en los niveles de expresión inversamente correlacionadas entre pares miARN-ARNm blancos, observación característica del mecanismo predominante de regulación de la expresión génica mediada por miARNs (Guo et al., 2010).

Las Miosinas son una superfamilia de proteínas que funcionan como motores moleculares. Acorde con su función, contienen un dominio motor que cataliza la hidrólisis de ATP y la unión a Actina (Sellers, 2000). Particularmente, Myo18a presenta un dominio N-terminal único compuesto por un módulo de andamiaje de tipo PDZ, un sitio de unión a Actina y un motivo IQ que consiste en una secuencia para la dimerización. El motivo IQ permite que Myo18a forme dímeros que contendrán dos sitios de unión a Actina, lo cual promueve la estabilización del *cross-linking* de los filamentos de Actina y colaboraría con la re-organización del citoesqueleto de Actina (Isogawa et al., 2005). Para que se produzca la protrusión del cono de crecimiento es necesario que los filamentos de Actina presenten un comportamiento dinámico a nivel de los mismos (Zhou et al., 2004; Li et al., 2012). De esta manera tenemos que los dímeros de Myo18a colaborarían con la elongación del axón en regeneración al favorecer la re-organización del citoesqueleto de Actina.

Byron y colaboradores (2012) observaron por inmunofluorescencia que Myo18a está co-localizada con los filamentos de actina y con Integrinas  $\beta 1$  en los pliegues de membrana. Como se mencionó en la Introducción, las Integrinas son intermediarias entre las señales presentes en la matriz extracelular y el citoesqueleto pero requieren de la participación de otras proteínas. Las señales

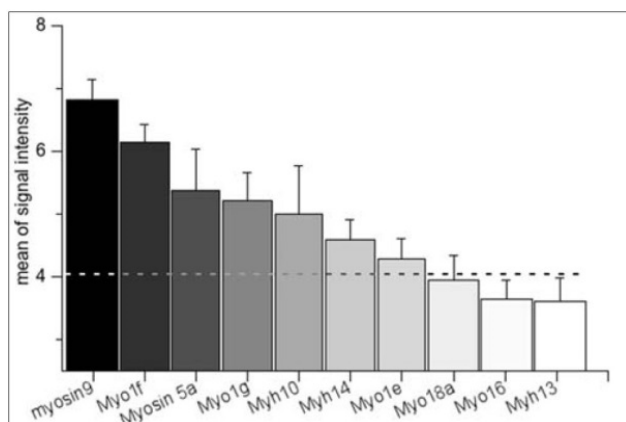
presentes en el medio extracelular son imprescindibles para que se produzca el proceso de regeneración ya que entre otras cosas participan del guiado de los brotes axonales. Dentro de las proteínas necesarias para se produzca una interacción entre Integrinas y citoesqueleto se encuentra la Miosina X (MyoX). Esta proteína media la interacción entre las colas citoplasmáticas de las Integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$  con los filamentos de Actina y participa del proceso de adhesión celular y crecimiento de filopodios (Miranti y Brugge, 2002; Zhang et al., 2004). Conjuntamente se ha visto que participa del proceso de extensión de neuritas mediado por la interacción de la Integrina  $\beta 1$  y la Laminina perteneciente a la matriz extracelular (Plantman et al., 2013). En este marco, la Myo18a podría estar participando tal como lo hace MyoX, de los fenómenos de transducción de señales desde el medio externo al medio interno a través de la interacción entre matriz extracelular e Integrinas  $\beta 1$ , promoviendo la prolongación del axón regenerante.

La observación realizada por Byron y colaboradores (2012) se ve apoyada por la localización de Myo18a en los pliegues de membrana de células epiteliales cancerígenas, en los cuales dicha proteína se une a PAK2 y regula la formación de los pliegues de membrana, reorganización del citoesqueleto de Actina y migración celular (Hsu et al., 2010). Asimismo, se ha visto que Myo18a se asocia con la Ezrina, proteína que participa de la unión de la membrana plasmática a los filamentos de Actina (Matsui et al., 2011). Esta observación sugiere que la conexión entre dichas proteínas posibilita la interacción de la Myo18a con los sitios de adhesión de Integrinas dejando entrever que Myo18a desempeña un rol importante en la migración celular a través de complejos de adhesión específicos de heterodímeros de Integrinas (Matsui et al., 2011; Byron et al., 2012).

Se ha descrito que Myo18a se encuentra co-localizada con el Aparato de Golgi (AG) en distintos tipos celulares (Furusawa et al., 2000; Mori et al., 2003; Mori et al., 2005) lo cual se ve posibilitado por su interacción con GOLPH3, que permite unir las membranas del AG al citoesqueleto de Actina (Dippold et al., 2010). Dippold y colaboradores (2010) demostraron que Myo18a no solo participa del posicionamiento del AG sino que también es fundamental para que dicho organelo no se condense y pierda funcionalidad. Esta observación fue lograda mediante la inhibición de Myo18a empleando ARNs pequeños de interferencia (siARN) tanto en células HeLa como HEK 293. Los resultados fueron similares a los obtenidos mediante la inhibición selectiva de GOLPH3.

Nuestra observación de la presencia del mRNA de Myo18a en dominios axonales se encuentra en línea con su detección en dichos dominios llevada a cabo por miembros de nuestro grupo de trabajo (Calliari et al., 2014). En este estudio se analizaron los datos de expresión generados por Gummy y colaboradores (2011) en el cual se evalúa mediante micro arreglos el transcriptoma axonal de neuronas sensitivas en cultivo. Calliari y colaboradores (2014) pudieron ver que Myo18a se

encuentra entre las diez Miosinas más abundantes en dominios axonales aunque su nivel no es de los más significativos (**Figura 22**) (Calliari et al., 2014).



**Figura 22.** Abundancia relativa de los ARNm codificantes de Miosinas en extractos axonales. Solo se muestran las diez Miosinas más abundantes. La línea punteada representa el nivel de la señal background que presentan los chips de Affymetrix. Imagen extraída de Calliari y colaboradores (2014).

Conjuntamente, a partir de un análisis previo de los datos de secuenciación masiva del transcriptoma axonal de neuronas sensitivas en cultivo generados por Minis y colaboradores (2014) pudimos detectar que Myo18a se encuentra presente en niveles significativos en el axoplasma de neuronas en crecimiento. Esto apoya la observación hecha por Calliari y colaboradores (2014) aunque relativiza su detección próxima al límite de significancia. Esta discordancia en cuanto a los niveles de Myo18a puede deberse a las diferencias existentes entre la sensibilidad de un estudio transcriptómico por medio de micro arreglos y otro estudio por medio de secuenciación masiva.

Debido a que dichos trabajos se llevaron a cabo a nivel de los axones de neuronas en cultivo, se puede afirmar que Myo18a se localiza en dominios axonales. Si se complementan estos resultados previos con los nuestros, podemos decir que es posible que la variación de los niveles de expresión de Myo18a entre los Días 1 y 2 en los cabos proximales de nervios ciáticos lesionados se deba a fenómenos que acaecen a nivel neuronal. En esta línea, la observación de una correlación entre Myo18a y el miR-125a-5p permite postular la ocurrencia de un fenómeno de regulación local mediado por microARN.

La familia de las proteínas Hook consiste en un conjunto de proteínas de unión a microtúbulos que median la interacción entre éstos y las membranas de diferentes compartimientos celulares. Mediante dicha unión participan en el posicionamiento de diferentes organelos celulares. Las distintas proteínas Hook de mamíferos varían en los compartimientos celulares que posicionan, sin embargo todas comparten una alta similitud en los dominios de unión a microtúbulos. En particular, Hook 3 participa en el posicionamiento del AG mediante la interacción con microtúbulos. Hook3 se encuentra enriquecido en membranas del cis-Golgi *in vivo*. No obstante, se encuentra localizado en la región juxtanclear luego del tratamiento con Brefelding A en células de la línea Vero, lo que indica un posicionamiento independiente del AG. Conjuntamente, si se sobre expresa Hook3 se observa una disrupción del AG, lo que indicaría que no solo participa del posicionamiento sino que también es definitorio para el mantenimiento de su estructura (Walenta et al., 2001).

Hook3 es el homólogo en mamíferos de ZYG-12 descrito en *Caenorhabditis elegans*. Dicha proteína participa en la asociación del centrosoma con el núcleo (Malone et al., 2003). El centrosoma tiene un rol importante durante el proceso del desarrollo neuronal, participando de fenómenos tales como el establecimiento de la diferenciación neuronal y neurogénesis. Asimismo, debido a que el centrosoma funciona como centro organizador de microtúbulos (MTOC), es indispensable para el establecimiento de la polaridad neuronal (Higginbotham y Gleeson, 2007). Estudios por microscopía electrónica mostraron que el centrosoma se compone de dos centriolos y el material pericentriolar. La mayoría de las funciones centrosomales son llevadas a cabo a nivel del material pericentriolar. Dentro de éstas se destaca la nucleación y anclaje de microtúbulos (Rieder et al., 2001). Se ha visto que en mamíferos Hook3 es reclutada hacia el material pericentriolar a través de una interacción con PCM1. Si se interrumpe dicha interacción se reduce la capacidad de ensamblaje del centrosoma, lo que limita la funcionalidad del mismo e impide la organización del citoesqueleto de microtúbulos. De hecho, el silenciamiento de Hook3 o bloqueo de su interacción con PCM1 resulta en una sobre producción de neuronas (Ge et al., 2010). Como se mencionó en la Introducción, durante el proceso regenerativo es necesario que los microtúbulos se encuentren estabilizados en dominios somáticos mientras que requieren de una dinámica a nivel de los axones que permita un crecimiento eficiente (Zhou y Snider, 2006). En este contexto, es posible que Hook3 participe al menos de la estabilización somática de los microtúbulos a partir de su función regulatoria del citoesqueleto de microtúbulos basada en la interacción con PCM1.

Con el fin de detectar si Hook3 se localiza en el axoplasma se volvieron a evaluar los resultados de nuestro análisis previo de los datos de secuenciación masiva del transcriptoma axonal generados por Minis y colaboradores (2014). Con esto pudimos ver que Hook3 se encontraba muy próximo al

límite de significancia establecido por los autores por lo que no podemos confirmar su presencia en dominios axonales. Si a éste resultado se lo relaciona con la descripción del posicionamiento pericentriolar de Hook3 en neuronas (Ge et al., 2010) y juxtannuclear en células Vero (Walenta et al., 2011), se podría decir que dicho ARNm detectado en nuestro estudio tiene su origen en la Célula de Schwann (CS). En este contexto, dos panoramas adquieren notoriedad. En el primer caso, puede que tanto el origen como la localización del ARNm sea glial. Esto es posible ya que el estudio realizado previamente por nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo a nivel de nervio ciático por lo que las muestras empleadas corresponden tanto a neuronas como a CS. En el segundo panorama puede que el origen del ARNm sea glial, pero su localización sea axonal. Esto sería posible debido a la ya descrita capacidad de la CS de transferir ARNs y ribosomas al axón (Ver sección **I.2**). Este segundo escenario resulta de mayor interés para nosotros ya que no solo se enmarca en una temática ampliamente abordada por nuestro grupo de trabajo (transferencia de ARNs y ribosomas de la CS a los axones) sino que también se alinea con nuestra motivación principal de evaluar los fenómenos neuronales que ocurren en respuesta a una lesión. La realización de un estudio de hibridación *in situ* para determinar la localización del ARNm de Hook3, tanto en condiciones fisiológicas normales como durante la regeneración, puede contribuir a dilucidar el origen y localización de dicho ARNm.

Resulta interesante la observación de que ambas proteínas Myo18a y Hook3 tienen dentro de sus funciones la participación en el posicionamiento y mantenimiento de la estructura del AG. Myo lo hace mediante la interacción con el citoesqueleto de Actina mientras que Hook3 mediante la interacción con microtúbulos. El AG es el organelo celular en el cual se realiza la mayor síntesis de carbohidratos en las células. No solo participa de la síntesis de dichas moléculas, sino que también participa en la clasificación y modificación de proteínas sintetizadas en el Retículo endoplásmico. De esta manera, proteínas provenientes de dicho organelo adquieren modificaciones que dan lugar a la formación de glicoproteínas. De hecho, la mayoría de los glúcidos sintetizados en el AG se asocian a proteínas en forma de cadenas de oligosacáridos. Una vez finalizados los carbohidratos o proteínas glicosiladas se exportan a los diferentes compartimentos celulares o a la membrana plasmática (Alberts et al., 2004). Debido a que uno de los destinos de los productos sintetizados o modificados en el AG es la membrana celular, su posicionamiento y modulación de su estructura regulada por Myo18a y Hook3 puede estar vinculado con el proceso de síntesis de membrana plasmática necesaria durante el proceso de crecimiento axonal.

La detección de únicamente tres ARNm codificantes para proteínas del citoesqueleto o relacionadas a éste (Myo18a, Hook3 y Pdzd8), aun habiendo empleado como referencia una extensa lista de proteínas (“UniProtKB (citoesqueleto)”) es menor de la que se esperaba. Esto puede deberse a que los días estudiados (Día 1 y 2) se encuentran acotados temporalmente, de modo que las diferencias en los niveles de expresión de los mismos no alcanzaron valores significativos en dicho intervalo de tiempo. Posiblemente muchos de los cambios inducidos por la lesión pueden haberse manifestado a partir del momento de la misma alcanzando valores significativos en el primer día pero a partir de éste presentar una variación más moderada que explicaría nuestros resultados. Es posible también que la inducción de la variación de los niveles de expresión sea moderada aún desde el momento de la lesión y que alcance valores significativos con el transcurso de tiempos mayores de los que estudiamos. Lo que no cabe duda es que la lesión induzca cambios en la expresión de genes relacionados con el citoesqueleto ya que la trascendencia del mismo para el proceso de regeneración es de suma relevancia. Acorde con esta línea, Jiménez y colaboradores (2005) realizaron un estudio proteómico para evaluar los cambios en los niveles de proteínas en nervios ciáticos de rata luego de la lesión. En este trabajo se estudiaron tiempos mayores luego de la lesión para evaluar los niveles de proteínas, comenzando con el Día 5 luego de la misma. Los otros puntos temporales estudiados fueron el Día 10 y 35. En cuanto al citoesqueleto, los autores pudieron detectar ya desde el Día 5 por ejemplo, la variación de los niveles de proteínas tales como TUBB, VIM, TPMsK3 y TPM4. Asimismo, como se describió en la sección **I.1.2.1**, luego de la lesión se induce un aumento en los niveles de expresión de los genes de Actina y de la subunidad liviana de los neurofilamentos (Sotelo-Silveira et al., 2000; Bomze et al., 2001).

Nuestro estudio pudo aportar información acerca de la variación de los niveles de ARNm codificantes para proteínas del citoesqueleto o relacionadas a éste entre los Días 1 y 2. Si bien se trata de un espacio temporal acotado, la información biológica obtenida describe los fenómenos que acontecieron en nuestro estudio de expresión. Conjuntamente, la información aportada por este estudio no se refiere únicamente al comportamiento de los niveles de expresión de tres ARNm sino que también aporta información acerca de la regulación de los niveles de los mismos mediada por miARNs. Estos resultados obtenidos sientan las bases para la realización de estudios posteriores en los cuales se evaluarán los niveles tanto de los ARNm y de los miARNs que detectamos en nuestro estudio que están inversamente correlacionados.

## **IV.2) Búsqueda de miARNs expresados diferencialmente en el cabo proximal de nervio ciático seccionado y evaluación de la representación de la función estructural dentro de sus blancos predictivos**

La segunda propuesta para el análisis de los datos de expresión de miARNs generados previamente por nuestro grupo de trabajo consistió en la búsqueda de los miARNs expresados diferencialmente en los cabos proximales de nervios ciáticos seccionados. A partir de aquellos miARNs con expresión diferencial sostenida en el tiempo, se buscó evaluar su contribución a la regulación de fenómenos locales de síntesis de proteínas estructurales.

Con el fin de detectar aquellos miARNs que se expresaran diferencialmente se realizaron las comparaciones cabo proximal versus control y cabo distal versus control. La primera comparación permite filtrar aquellos miARNs presentes en condiciones normales, al tiempo que permite descartar aquellos que pudieran presentar una alteración inducida por la lesión, como podría ser un proceso inflamatorio. Existe la posibilidad de que ocurriera una reacción refleja en el nervio contralateral no lesionado (empleado como control), lo cual pudo habernos hecho perder información de miARNs expresados diferencialmente respecto a condiciones normales. Esta posibilidad se ve apoyada por el análisis de Cluster realizado previamente en el cual se observa que los controles presentan perfiles de expresión más similares a aquellos observados en los cabos proximales y distales de cada día que lo que son respecto a los demás controles (**Figura 1**). La segunda comparación permite seleccionar a aquellos miARNs que varían específicamente en el segmento distal. Los miARNs pueden variar su expresión aún en el cabo distal ya que hay mecanismos locales de regulación post transcripcionales, como lo es la regulación a nivel del procesamiento que determina su maduración a partir de pre-miARNs. Asimismo, recuérdese la previamente descrita capacidad de la Célula de Schwann de aportar ARNs y ribosomas a los axones (Ver sección **I.2**). También es necesario mencionar que ambos cabos del axón lesionado -proximal y distal- presentan dos procesos fisiológicos diferentes. Mientras que el cabo proximal se encuentra en un proceso de regeneración, el cabo distal se encuentra en un proceso de Degeneración Walleriana (Ver sección **I.1**).

De los miARNs detectados expresados diferencialmente en los cabos proximales se seleccionaron aquellos que estuvieran presentes en más de un día, lo que indicaría una expresión diferencial sostenida en el tiempo y se realizó una búsqueda predictiva de blancos (**Figuras 17 y 18**). Con esto, se pudo ver que la proporción de blancos correspondientes a ARNm codificantes para proteínas con la función de interés superó en todos los casos el 10%. Este porcentaje significativo es un indicativo

de una potencial regulación local de la síntesis de proteínas del citoesqueleto o relacionadas a éste mediada por miARNs a nivel del cabo proximal de nervio ciático seccionado. Esto se encuentra en línea con la descripción de la ocurrencia de síntesis local de proteínas en los dominios axonales abordada en la sección **I.2**. Asimismo, la regulación local de la síntesis de proteínas estructurales a nivel de los axones adquiere notoriedad cuando se la relaciona con la trascendencia del citoesqueleto en los fenómenos que ocurren durante el proceso regenerativo. En este contexto, existen diferencias entre los fenómenos somáticos y axonales de regulación de la síntesis de proteínas estructurales, basados en diferencias en los procesos que ocurren en ambos dominios neuronales. Un ejemplo de esto es la anteriormente descrita (Sección **I.1.2.1**) necesidad de estabilización de los microtúbulos en las proximidades somáticas pero manteniendo una dinámica en el extremo axonal que permita la prolongación del cono de crecimiento. Esto se logra con una concentración diferencial de la proteína GSK-3 $\beta$  en los dominios considerados, la cual regula la actividad de diferentes proteínas de unión a microtúbulos como lo es la MAP1b (Zhou y Snider, 2006; Trivedi et al., 2005). Lo mismo ocurre con los filamentos de Actina. En general, es necesario que el citoesqueleto presente una re-organización de sus componentes para que se forme el cono de crecimiento y se produzca la elongación axonal. Este proceso involucra a distintas proteínas del citoesqueleto y asociadas a éste, dentro de las que se destacan las proteínas motoras (Ver sección **I.1.2.1**). En este contexto, se puede decir que la regulación post transcripcional de la síntesis de proteínas mediada por miARNs puede dar cuenta de alguno de los fenómenos que ocurren en los dominios neuronales.

En esta etapa del estudio se intentó complementar los resultados obtenidos tras el análisis de nuestros datos de expresión de miARNs con los resultados del análisis de los datos de expresión de miARNs generados por Yu y colaboradores (2011). Dicho set de datos consistía en un recurso de interés para nuestros propósitos debido a que en ese estudio se había investigado el proceso de regeneración empleando una tecnología más sensible como lo es la secuenciación masiva de ARNs. Sin embargo durante el pre-procesamiento de los mismos obtuvimos resultados que indicaron que las secuencias depositadas en la base de datos SRA de la plataforma NCBI correspondientes a los Días 1 y 4 no correspondían a lecturas de secuenciación masiva de ARNs pequeños. Para llegar a esa conclusión realizamos varias pruebas durante el análisis que incluyó el seguimiento de dos estrategias diferentes para el pre-procesamiento de datos empleando dos bases de datos de referencia en cada una para el mapeo de genes. Asimismo se realizó una prueba adicional para estudiar si la identidad de las lecturas pertenecientes a los Días 1 y 4 podía corresponder a otra población de ARNs celulares diferente a los ARNs pequeños. Para ello se realizó un nuevo mapeo de lecturas empleando como base de datos de referencia los transcritos totales de rata obtenido del



sitio FTP de la plataforma NCBI. Con eso se pudo ver que las lecturas correspondientes a los Días 1 y 4 tampoco presentaron niveles significativos de identidad respecto al conjunto de transcritos totales de rata, lo que indicaría que las secuencias pertenecientes a dichos días no corresponden a lecturas de secuenciación de ARNs de rata. El hecho de que únicamente dos de los días estudiados presentaran estos resultados mientras que los otros tres días presentara mapeos de genes dentro de los parámetros esperados indica que las metodologías empleadas para su análisis son al menos correctas, aunque podrían no ser las más apropiadas. Los autores recurrieron a una herramienta predictiva para la identificación de los miARNs mientras que nosotros recurrimos al mapeo de las lecturas empleando dos bases de datos como referencia. Sin embargo nuestros resultados obtenidos para los análisis de los Días 1 y 4 no pueden ser únicamente atribuidos a una incapacidad por reconocer miARNs en las lecturas debido a que no se encontraron en las bases de datos empleadas. Muchos de los miARNs que los autores identificaron expresados diferencialmente en los Días 1 y 4 están ampliamente documentados en la bibliografía, de modo que su identificación no requeriría de una herramienta predictiva, especialmente considerando que se empleó una actualizada base de datos de miARNs (miRBase).

En conjunto, los resultados obtenidos para cada una de los estudios realizados con este set de datos indican que aquellos correspondientes a los Días 1 y 4 no son datos de secuenciación de ARNs pequeños o de algún otro tipo de ARNs contemplados en el conjunto de transcritos totales de rata. Posiblemente los autores hayan cometido un error durante el depósito de los datos en la plataforma SRA. Por esta razón nosotros luego de haber realizado todas las pruebas descritas para evaluar los datos disponibles, nos comunicamos con el “autor de contacto” vía correo electrónico esperando una actualización de los mismos para poder proseguir con su análisis, pero no tuvimos su respuesta. De esta manera se decidió ponerle fin al análisis de los mismos ya que proseguir con éstos carecía de sentido. A pesar de que los datos de Yu y colaboradores (2011) eran una fuente de información importante y enriquecedora para nuestro estudio, consideramos que proseguir el mismo empleando únicamente nuestros datos era también válido y confiable. Es cierto que la sensibilidad que presentan los análisis de expresión por micro arreglos no es tan buena como la que presentan aquellos de secuenciación. También es cierto que el empleo de una sola fuente de información no es tan robusto como el empleo de dos fuentes a la hora de evaluar los resultados. No obstante, este análisis representa una primera instancia de un estudio mayor, en el cual se pondrán a prueba algunos resultados obtenidos *in silico* mediante el empleo de herramientas de la Biología molecular.

### **IV.3) Aprendizaje del empleo de herramientas bioinformáticas de utilidad para la realización de análisis transcriptómicos y procesamientos de datos en general**

El estudio comenzó con un período de evaluación de las distintas herramientas para el análisis de datos de micro arreglos. Durante esta etapa se formularon las preguntas biológicas que se querían responder y a partir de éstas se buscaron cuáles serían las herramientas más apropiadas para su abordaje. Durante esta etapa se estudió una serie de softwares tales como “Multi experiment viewer (MEV)” (<http://www.tm4.org/>), “BRB array tools” (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) y “Genespring” (<http://biology.chem.agilent.com/>). Conjuntamente se evaluó la plataforma “mAdb” y el “ambiente R”. Finalmente se decidió que estas últimas opciones serían las más acertadas en nuestras circunstancias para el análisis de los datos de micro arreglos Affymetrix y Agilent, respectivamente. Por ejemplo, uno de los factores que nos impulsó a emplear el “ambiente R” (usando el paquete “Limma”) para el análisis de los datos de micro arreglos Agilent, fue la posibilidad de saber cuáles señales de intensidad se emplearían para los cálculos de expresión diferencial y así poder tener una mejor interpretación de los resultados.

El procesamiento de datos no solo se refirió al empleo de los distintos softwares necesarios para el análisis de datos de expresión obtenidos tanto por micro arreglos como por secuenciación masiva de ARNs. En cambio, se debió aprender a utilizar otras herramientas necesarias para el procesamiento de datos en general. Por ejemplo, se debió aprender el manejo de Excel necesario para la evaluación de los resultados de los cálculos de expresión diferencial y su representación gráfica. Con el mismo propósito, se debió alcanzar un manejo básico de la línea de comandos del sistema operativo Linux, empleado por ejemplo para el filtrado, ordenamiento y comparación de las listas de genes.

En cuanto al análisis de los datos de secuenciación masiva de ARNs pequeños, además del empleo del software CLC Genomics Workbench, se debió aprender una serie de comandos básicos del “Símbolo del sistema” de “Windows” y del lenguaje de programación “PYTHON”. El “Símbolo del sistema” se empleó para la conversión del formato original “.sra” del set de datos de Yu y colaboradores (2011) al formato “.fastq” que puede ser leído por el CLC Genomics Workbench. Adicionalmente, se debió generar un “script” en “PYTHON” para el procesamiento de la lista de ARNs pequeños obtenida de la base de datos “Rfam” para emplearla como referencia en el mapeo de genes.

En las primeras etapas del trabajo no solo se pudo aprender acerca del manejo de las distintas plataformas para el análisis de datos y las utilidades que ofrecen, sino que también fue un período de reflexión que, acompañado con la búsqueda bibliográfica terminó definiendo los pasos a seguir en el transcurso de la pasantía.

## **V) Conclusiones y perspectivas**

El citoesqueleto presenta comportamientos diferenciales en los distintos dominios neuronales que posibilitan la ocurrencia de un proceso regenerativo. Para que se produzca ese comportamiento es necesaria la ocurrencia de fenómenos de regulación post transcripcionales. Dentro de éstos, la regulación de la expresión génica mediada por miARNs ha sido ampliamente documentada en la literatura. Sin embargo, los miARNs no han sido vinculados con la regulación de los componentes del citoesqueleto durante el proceso de regeneración lo que promovió nuestro interés por la realización de un estudio que aporte información al respecto.

En este estudio, se logró obtener información acerca de la participación de los miARNs en la regulación de la síntesis local de proteínas del citoesqueleto y asociadas a éste. Se pudo ver la influencia de los miARNs en la regulación de la expresión génica a partir de datos experimentales de perfiles de expresión de miARNs y ARNm. Asimismo, se emplearon datos experimentales para realizar una evaluación predictiva de la influencia de los miARNs sobre la síntesis de proteínas estructurales que sienta las bases para la realización de estudios posteriores, como lo es la verificación por medio de PCR en tiempo real de correlaciones entre miARNs y ARNm de interés. Conjuntamente, se podría analizar la influencia de los miARNs sobre la síntesis proteica de forma más directa mediante la evaluación de los niveles de proteínas por Western Blot.

Este estudio se enmarca dentro de un proyecto mayor de investigación contemplado dentro de una Beca de Iniciación ANII en el cual se pondrán a prueba mediante herramientas de Biología Molecular algunos de los resultados obtenidos. En éste se evaluarán los miARNs y ARNm con comportamientos observados de interés y se realizarán nuevos estudios de expresión para confirmar los resultados obtenidos.

## VI) Glosario de siglas empleadas

Aparato de Golgi: AG

cADN: ADN copia

ARNi: ARN de interferencia

dsARNs: ARNs de doble hebra

ARNm: ARN mensajeros

miARN: micro ARN

rARNs: ARNs ribosomales

sARN: ARNs pequeños

siARNs: ARNs pequeños de interferencia

snARNs: ARNs nucleolares pequeños

ssARN: ARN de simple hebra

tARNs: ARNs de transferencia

CS: Célula de Schwann

DRG: Ganglio de la raíz dorsal

DW: Degeneración Walleriana

MAP1B: *microtubule-associated protein 1B*

PARPs: Placas ribosomales periaxoplásmicas

RT-PCR: Real Time PCR (PCR en tiempo real o cuantitativa)

RAG: Genes asociados a la regeneración

RISC: Complejo de silenciamiento por ARNs

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

## VII) Bibliografía

- Aloyo VJ., Zwiers H., Gispen WH. (1982)** B-50 protein kinase and kinase c in rat brain. *Prog. Brain Res.* 56:303–315
- Alvarez J., Torres JC. (1985)** Slow axoplasmic transport: a fiction? *J. Theor. Biol.* 7; 112 (3):627-51
- Alvarez J., Giuditta A., Koenig E. (2000)** Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity, and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Prog. Neurobiol.* 62:1– 62
- Aschrafi A., Kar AN., Natera-Naranjo O., Macgibeny MA., Gioio AE., Kaplan B. (2012)** MicroRNA-338 regulates the axonal expression of multiple nuclear-encoded mitochondrial mRNAs encoding subunits of the oxidative phosphorylation machinery. *Cell.Mol.Life.Sci.* 6: 4017–4027
- Aschrafi A., Schwechter AD., Mameza MG., Natera-Naranjo O., Gioio AE., Kaplan B. (2008)** MicroRNA-338 regulates local cytochrome oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 28: 12581–12590
- Bahr M., Przyrembel C. (1995)** Myelin from peripheral and central nervous system is a non permissive substrate for retinal ganglion cell axons. *Exp. Neurol.* 134:87–93
- Barres BA., Jacobson MD., Schmid R., Sendtner M., Raff MC. (1993)** Does oligodendrocyte survival depend on axons? *Curr. Biol.* 3:489–97
- Bartel DP. (2009)** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* **136:** 215–233
- Becerra JL., Puckett WR., Hiester ED., Quencer RM., Marcillo AE. (1995)** MR-pathologic comparisons of wallerian degeneration in spinal cord injury. *Am. J. Neuroradiol.* 16:125–33
- Beirowski B. (2013)** Concepts for regulation of axon integrity by enwrapping glia. *Front Cell Neurosci.* 7:256
- Benech C., Sotelo JR., Menendez J., Correa-Luna R. (1982)** Autoradiographic study of RNA and protein synthesis in sectioned peripheral nerves. *Exp Neurol.* 76: 72–82
- Benson MD., Romero MI., Lush ME., Lu QR., Henkemeyer M. (2005)** Ephrin-B3 is a myelinbased inhibitor of neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:10694–99
- Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon GJ. (2001)** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409: 363–366
- Bomze HM., Bulsara KR., Iskandar BJ., Caroni P., Skene JH. (2001)** Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons. *Nat Neurosci.* 4:38–43
- Bosse F., Hasenpusch-Theil K., Kury P., Muller HW. (2006)** Gene expression profiling reveals that peripheral nerve regeneration is a consequence of both novel injury-dependent and reactivated developmental processes. *J. Neurochem.* 96: 1441–1457

- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. (2004)** Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat. Med.* 10:2–9
- Buss A., Brook GA., Kakulas B., Martin D., Franzen R. (2004)** Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain.* 127:34–44
- Brock GN., Mukhopadhyay P., Pihur V., Webb C., Greene R. M., Pisano MM. (2013)** MmPalateMiRNA, an R package compendium illustrating analysis of miRNA microarray data. *Source Code Biol. Med.* 8:8(1):1
- Buller B., Liu X., Wang X., Zhang RL., Zhang L., Hozeska-Solgot A., et al. (2010)** MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J.* 277: 4299–4307
- Bulsara KR., Iskandar BJ., Villavicencio AT., Skene JH. (2002)** A new millennium for spinal cord regeneration: growth-associated genes. *Spine.* 27:1946–1949
- Byron A., Humphries JD., Craig SE., Knight D., Humphries MJ. (2012)** Proteomic analysis of  $\alpha\beta 1$  integrin adhesion complexes reveals  $\alpha$ -subunit-dependent protein recruitment. *Proteomics.* 12: 2107–2114
- Calliari A., Farías J., Puppo A., Canclini L., Mercer JA., Munroe D., Sotelo JR., Sotelo-Silveira JR. (2014)** Myosin Va Associates With mRNA in Ribonucleoprotein Particles Present in Myelinated Peripheral Axons and in the Central Nervous System. *Dev. Neurobiol.* 74: 382–396
- Carthew RW. y Sontheimer EJ. (2009)** Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 136:642–655
- Chang L., Viader A., Varghese N., Payton J., Milbrandt J., Nagarajan R. (2013)** An integrated approach to characterize transcription factor and microRNA regulatory networks involved in Schwann cell response to peripheral nerve injury. *BMC Genomics.* 6:14:84
- Chen MS., Huber AB., Van der Haar ME., Frank M., Schnell L. (2000)** Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature.* 403:434–39
- Chen ZL., Yu WM., Strickland S. (2007)** Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 30:209–233
- Cheng L., Khan M., Mudge AW. (1995)** Calcitonin gene-related peptide promotes Schwann cell proliferation. *J. Cell Biol.* 129:789–796
- Christie KJ. y Zochodne D. (2013)** Neuroscience forefront review peripheral axon regrowth: new molecular approaches. *Neuroscience.* 240: 310–324
- Coggins PJ., Zwiers H. (1991)** B-50 (GAP-43): biochemistry and functional neurochemistry of a neuron-specific phosphoprotein. *J. Neurochem.* 56:1095–1106
- Coleman MP. y Perry VH. (2002)** Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.* 25:532–537

- Court F., Hendriks W., MacGillavry H., Alvarez J., Minnen JV. (2008)** Schwann Cell to Axon Transfer of Ribosomes: Toward a Novel Understanding of the Role of Glia in the Nervous System. *J. Neurosci.* 28(43):11024–11029
- Court F., Midha R., Cisterna B., Grochmal J., Shakhbazau A., Hendriks W., Minnen JV. (2011)** Morphological Evidence for a Transport of Ribosomes from Schwann Cells to Regenerating Axons. *Glia.* 59(10):1529-1539
- Dajas-Bailador F., Bonev B., Garcez P., Stanley P., Guillemot F., Papalopulu N. (2012)** microRNA-9 regulates axón extensión and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat.Neurosci.* 15:697–699
- David S., Braun PE., Jackson DL., Kottis V., McKerracher L. (1995)** Laminin overrides the inhibitory effects of peripheral nervous system and central nervous system myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J. Neurosci. Res.* 42:594–602
- Dippold HC., Ng. MM., Farber-Katz SE., Lee SK., Kerr ML., Peterman MC., Sim R., Wiharto PA., Galbraith KA., Madhavarapu S., Fuchs GJ., Meerloo T., Farquhar MG., Zhou H., Field SJ. (2009)** GOLPH3 bridges phosphatidylinositol-4-phosphate and actomyosin to stretch and shape the Golgi to promote budding. *Cell* 139:337–351
- Elbashir SM., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001)** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411: 494–498
- Erturk A., Hellal F., Enes J., Bradke FJ. (2007)** Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *Neurosci.* 27: 9169-9180
- Filipowicz W., Bhattacharyya SN., Sonenberg N. (2008)** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs:are the answers insight? *Nat. Rev. Genet.* 9: 102–114
- Fire A., Xu S., Montgomery MK., Kostas SA., Driver S E., Mello CC. (1998)** Potent and specific genetic interference by double- stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806–811
- Fu SY., Gordon T. (1997)** The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol. Neurobio.l* 14:67–116
- Furusawa T., Ikawa S., Yanai N., Obinata M. (2000)** Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270:67–75
- Gallo G., Letourneau PC. (1998)** Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *J Neurosci.* 18 (14):5403-5414
- Ge X., Frank CL., Calderon de Anda F., Tsai LH. (2010)** Hook3 Interacts with PCM1 to Regulate Pericentriolar Material Assembly and the Timing of Neurogenesis. *Neuron.* 65: 191–203
- George R., Griffin JW. (1994)** Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp. Neurol.* 129:225–236

- Ghabriel MN. y Allt G. (1979)** The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. I. A quantitative teased fiber study. *Acta Neuropathol.* 48:93–93
- Gibson G. y Muse S. (2009)** Gene expression and the transcriptome. Chap. 4. Pp.191-253 in *A Primer of Genome Science*, Third edition. *Sinauer Associates, Inc. Publishers*
- Giuditta A., Menichini E., Perrone-Capano C., Langella M., Martin R., Castigli E., Kaplan BB. (1991)** Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurosci Res.* 28(1):18-28
- Giuditta A., Kaplan BB., van Minnen J., Alvarez J., Koenig E. (2002)** Axonal and presynaptic protein synthesis: New insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* 25:400–404
- GrandPre T., Nakamura F., Vartanian T., Strittmatter SM. (2000)** Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature.* 403:439–44
- Greene JM., Asaki E., Bian X., Bock C., Castillo S. et al. (2003)** The NCI/CIT MicroArray Database (mAdb) System –Bioinformatics for the Management and Analysis of Affymetrix and Spotted Gene Expression Microarrays. *AMIA 2003 Symposium.* Pág. 1066
- Griffin JW., George EB., Hsiesh ST., Glass JD. (1995)** Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. Pp. 3750–3790 in *The Axon: Structure, Function and Pathophysiology.* Kocsis JD., Sytys PK., ed. SGWaxman, New York: Oxford Univ. Press.
- Griffin JW., George R., Lobato C., Tyor WR., Yan LC. (1992)** Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J. Neuroimmunol.* 40:153–65
- Gumy LF., Yeo GSH., Tung Y-CL., Zivraj KH., Willis D., Coppola G., Lam BY., Twiss JL., Holt CE., Fawcett JW. (2011)** Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA.* 17:85–98
- Hall S. (2005)** The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br.* 87(10):1309-1319
- Hammarberg H., Wallquist W., Piehl F., Risling M., Cullheim S. (2000)** Regulation of laminin-associated integrin subunit mRNAs in rat spinal motoneurons during postnatal development and after axonal injury. *J. Comp. Neurol.* 428: 294–304
- Han MH., Plao YJ., Guo DW., Ogawa K. (1989)** The role of Schwann cells and macrophages in the removal of myelin during Wallerian degeneration. *Acta Histochem. Cytochem.* 22:161–72
- Hellal F., Hurtado A., Ruschel J., Flynn K., et al. (2011)** Microtubule stabilization reduces scarring and enables axon regeneration after spinal cord injury. *Science.* 18: 331(6019): 928–931
- Hengst U., Cox LJ., Macosko EZ., Jaffrey SR. (2006)** Functional and selective RNA interference in developing axons and growth cones. *J. Neurosci.* 26: 5727–5732
- Higginbotham HR. y Gleeson JG. (2007)** The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* 30: 276–283



- Hirata K., Mitoma H., Ueno N., He J., Kawabuchi M. (1999)** Differential response to macrophage subpopulations to myelin degradation in the injured sciatic nerve. *J. Neurocytol.* 28:685–95
- Holtzman E. y Novikoff AB. (1965)** Lysosomes in the rat sciatic nerve following crush. *J. Cell Biol.* 27:651–669
- Hsu RM., Tsai MH., Hsieh YJ., Lyu PC. et al. (2010)** Identification of MYO18A as a novel interacting partner of the PAK2/\_PIX/GIT1 complex and its potential function in modulating epithelial cell migration. *Mol. Biol. Cell.* 21: 287– 301
- Isogawa Y., Kon T., Inoue T., Ohkura R., et al. (2005)** The N-terminal domain of MYO18A has an ATP-insensitive actin-binding site. *Biochemistry.* 44: 6190–6196
- Jimenez C., Stam F., Li K. et al. (2005)** Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration. *Mol. Cell. Proteomics.* 4(2):120-132
- Jung H., Yoon BC. Holt CE. (2012)** Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat.Rev.Neurosci.* 13:308–324
- Kar AN., Macgibeny MA., Gervasi NM., Gioio AE., Kaplan BB. (2013)** Intra- axonal synthesis of eukaryotic translation initiation factors regulates local protein synthesis and axon growth in rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 33:7165–7174
- Koenig E. (1991)** Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat in vitro. *Mol. Cell Neurosci.* 2:384–394
- Koenig E., Martin R. (1996)** Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner axon. *J. Neurosci.* 16:1400 –1411
- Koenig E., Martin R., Titmus M., Sotelo-Silveira JR. (2000)** Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J Neurosci.* 20: 8390–8400
- Kole AJ., Swahari V., Hammond SM., Deshmukh M. (2011)** miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3- only genes to restrict apoptosis. *GenesDev.* 25: 125–130
- Kun A., Otero L., Sotelo-Silveira JR. Sotelo JR. (2007)** Ribosomal distributions in axons of mammalian fibers. *J. Neurosci. Res.* 85: 2087–2098
- Kye MJ., Liu T., Levy SF., Xu NL., Groves BB., Bonneau R., et al. (2007)** Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA.* 13: 1224–1234
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J., Borkhardt A., Tuschl T. (2003)** New microRNAs from mouse and human. *RNA.* 9:175–179
- Lemons ML. y Condic ML. (2008)** Integrin signaling is integral to regeneration. *Exp. Neurol.* 209: 343–352

- Li S., Liu Q., Wang Y., Gu Y., Liu D., Wang C., Ding G., Chen J., Liu J., Gu X. (2013)** Differential Gene Expression Profiling and Biological Process Analysis in Proximal Nerve segments after Sciatic Nerve Transection. *PLoS ONE*. 8(2): e57000
- Li S., Yu B., Wang S., Gu Y., Yao D., Wang Y., Qian T., Ding F., Gu X. (2012)** Identification and functional analysis of novel micro-RNAs in rat dorsal root ganglia after sciatic nerve resection. *J. Neurosci. Res.* 90:791–80100
- Lieberman AR. (1971)** The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* 14:49–124
- Liu WQ., Martinez JA., Durand J., Wildering W., Zochodne DW. (2009)** RGD-mediated adhesive interactions are important for peripheral axon outgrowth in vivo. *Neurobiol. Dis.* 34:11–22
- Liu X., Zhu S., Wang T., Hummers L., Wigley FM., Goldschmidt-Clermont PJ., Dong C. (2005)** Paclitaxel modulates TGFbeta signaling in scleroderma skin grafts in immunodeficient mice. *PLoS Med.* 2(12):e354
- Lugli G., Larson J., Martone M., Jones Y., Smalheiser NR. (2005)** Dicer and eIF2c are enriched at post synaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain- dependent manner. *J. Neurochem.* 94: 896–905
- Lugli G., Torvik VI., Larson J., Smalheiser NR. (2008)** Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J. Neurochem.* 106: 650–661
- Makwana M. y Raivich G. (2005)** Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS. J.* 272:2628–2638
- Malone CJ., Misner L., Le Bot N., Tsai MC., Campbel JM., Ahringer J., White JG. (2003)** The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell.* 115: 825–836
- Matsui K., Parameswaran N., Bagheri N., Willard B., et al. (2011)** Proteomics analysis of the ezrin interactome in B cells reveals a novel association with Myo18a. *J. Proteome Res.* 10: 3983–3992
- McKerracher L., David S., Jackson DL., Kottis V., Dunn RJ. (1994)** Identification of myelin associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron.* 13:805–11
- McQuarrie I. y Lund L. (2009)** Intra-axonal Myosin and Actin in nerve regeneration. *Neurosurgery.* 65:93-96
- Miklossy J., Van der Loos H. (1991)** The long-distance effects of brain lesions: visualization of myelinated pathways in the human brain using polarizing and fluorescence microscopy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50:1–15
- Minis A., Dahary D., Manor O., Leshkowitz D., Pilpel Y., Yaron A. (2014)** Subcellular Transcriptomics—Dissection of the mRNA Composition in the Axonal Compartment of Sensory Neurons. *Dev. Neurobiol.* 74: 365–381

- Miranti CK., Brugge JS. (2002)** Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 4: 83–90
- Moreau-Fauvarque C., Kumanogoh A., Camand E., Jaillard C., Barbin G. (2003)** The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J. Neurosci.* 23:9229–9239
- Mori K., Furusawa T., Okubo T., Inoue T., Ikawa S., Yanai N., Mori KJ., Obinata M. (2003)** Genome structure and differential expression of two isoforms of a novel PDZ-containing myosin (MysPDZ) (Myo18A). *J. Biochem.* 133:405–413
- Mori K., Matsuda K., Furusawa T., Kawata M., Inoue T., Obinata M. (2005)** Subcellular localization and dynamics of MysPDZ (Myo18A) in live mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 326:491–498
- Mukhopadhyay G., Doherty P., Walsh FS., Crocker PR., Filbin MT. (1994)** A novel role for myelin associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron.* 13:757–767
- Murashov AK, Chintalgattu V, Islamov RR, Lever TE, Pak ES, Sierpinski PL, Katwa LC, Van Scott MR. (2007)** RNAi pathway is functional in peripheral nerve axons. *FASEB. J.* 21: 656–670
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990)** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 2: 279–289
- Nathaniel EJ., Pease DC. (1963)** Regenerative changes in rat dorsal roots following Wallerian degeneration. *J. Ultrastruct. Res.* 52:533–549
- Natera-Naranjo O., Aschrafi A., Gioio AE., Kaplan BB (2010)** Identification and quantitative analyses of micro RNAs located in the distal axons of sympathetic neurons. *RNA* 16: 1516–1529
- Nixon RA. (1980)** Protein degradation in the mouse visual system. I. Degradation of axonally transported and retinal proteins. *Brain Res.* 200:69–83
- Nixon RA., Logvinenko KB. (1986)** Multiple fates of newly synthesized neurofilament proteins: evidence for a stationary neurofilament network distributed nonuniformly along axons of retinal ganglion cell neurons. *J. Cell Biol.* 102:647–659
- Olde-Loohuis NF., Kos A., Martens GJ., VanBokhoven H., NadifKasri N., Aschrafi A. (2012)** MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell.Mol.LifeSci.* 69: 89–102
- Plantman S., Novikova L., Novikov L., Hammarberg H., Wallquist W., Kellerth JO., Cullheim S. (2005)** Integrin messenger RNAs in the red nucleus after axotomy and neurotrophic administration. *Neuroreport.* 16: 709–713
- Plantman S., Zelano J., Novikova L., Novikov L., Cullheim S. (2013)** Neuronal myosin-X is upregulated after peripheral nerve injury and mediates laminin-induced growth of neurites. *Mol. Cell. Neurosci.* 56: 96–101
- Prinjha R., Moore SE., Vinson M., Blake S., Morrow R., et al. (2000)** Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature.* 403:383–384

- Quackenbush J. (2002)** Microarray data normalization and transformation. *Nat. Genet.* 32:496-501
- Rana TM. (2007)** Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 23–36
- Rasool M., Malik A., Qazi A., et al. (2013)** Current view from Alzheimer disease to type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol. Dis. Drug Targets.* 3(3):533-542
- Rieder CL., Faruki S., Khodjakov A. (2001)** The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* 11: 413–419
- Rossor AM., Polke JM., Houlden H., Reilly MM. (2013)** Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Rev. Neurol.* 9(10):562-571
- Saugstad JA. (2010)** microRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, Neuroprotection and neurodegeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30: 1564–1576
- Schratt GM. (2009)** microRNAs at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 842– 849
- Schratt GM., Tuebing F., Nigh EA., Kane CG., Sabatini ME., Kiebler M., et al. (2006)** A brain specific micro RNA regulates dendritic spine development. *Nature.* 439: 283–289
- Sellers JR. (2000)** Myosins. A diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496: 3–22
- Shen YJ., DeBellard ME., Salzer JL., Roder J., Filbin MT. (1998)** Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol. Cell Neurosci.* 12:79–91
- Schena M., Shalon D., Davis RW., Brown PO. (1995)** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 20:270(5235):467-470
- Sellers JR. (2000)** Myosins. A diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* 1496: 3–22
- Siegel G., Saba R., Schratt G. (2011)** microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21: 491–497
- Smalheiser NR. (2008)** Synaptic enrichment of microRNAs in adult mouse forebrain is related to structural features of their precursors. *Biol. Direct* 3:44. doi:10.1186/1745-6150-3-44
- Smyth G. (2004)** Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* Article 3
- Smyth G. (2005)** Limma: linear models for microarray data. Pp. 397-420 in *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Gentleman R., Carey V., Dudoit S., Irizarry R., Huber W., Springer, New York
- Smyth G., Ritchie M., Thorne N., Wettenhall J., Shi W. (2013)** Limma: Linear Models for Microarray Data User's Guide (Now Including RNA-Seq Data Analysis). Bioinformatics Division, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia

- Smith PD., Sun F., Park KK., Cai B., Wang C., Kuwako K., Martinez- Carrasco I., Connolly L., He Z. (2009)** SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. *Neuron*. 64:617–623
- Sotelo JR., Canclini L., Kun A., Sotelo-Silveira J., Calliari A., Cal K., Bresque M., DiPaolo A., Farias J., Mercer J. (2013)** Glia to Axon RNA Transfer. *Dev Neurobiol*. 74(3):292-302
- Sotelo JR., Kun A., Benech JC., Giuditta A., Morillas J., Benech CR. (1999)** Ribosomes and polyribosomes are present in the squid giant axon: an immunocytochemical study. *Neuroscience*. 90(2):705-715
- Sotelo-Silveira JR., Calliari A., Kun A., Benech JC., Sanguinetti C., Chalar C., Sotelo JR. (2000)** Neurofilament mRNAs are present and translated in the normal and severed sciatic nerve. *J. Neurosci. Res*. 62: 65–74
- Sotelo-Silveira J., Calliari A., Kun A., Koenig E., Sotelo JR. (2008)** RNA Trafficking in Axons. *Traffic*. 7: 508–515
- Sotelo-Silveira JR., Crispino M., Puppo A., Sotelo JR., Koenig E. (2008)** Myelinated axons contain b-actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *J. Neurochem*. 104: 545–557
- Stoll G., Griffin JW., Li CY., Trapp BD. (1989)** Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol*. 18:671–683
- Strickland IT., Richards L., Holmes FE., Wynick D., Uney JB., Wong LF. (2011).** Axotomy- induced miR-21 promotes axon growth in adult dorsal root ganglion neurons. *PLoS ONE* 6:e23423.doi: 10.1371/journal.pone.0023423
- Strittmatter SM., Igrashi M., Fishman MC. (1994)** GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *J. Neurosci*. 14:5503–5513
- Svemmingsen AF. y Dahlin LB. (2013)** Repair of the Peripheral Nerve—Remyelination that Works. *Brain Sci*. 3: 1182-1197
- Szpara ML., Vranizan K., Tai YC., Goodman CS., Speed TP., Ngai J. (2007)** Analysis of gene expression during neurite outgrowth and Regeneration. *BMC Neurosci*. 8:100
- Tan I., Yong J., Dong J. M., Lim L., Leung T. (2008)** A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell*. 135: 123–136
- Tetzlaff W., Zwiers H., Lederis K., Cassar L., Bisby MA. (1989)** Axonal transport and localization of B-50/GAP-43-like immunoreactivity in regenerating sciatic and facial nerves of the rat. *J. Neurosci*. 9:1303–1313
- Toth CC., Willis D., Twiss JL., Walsh S., Martinez JA., Liu WQ., Midha R., Zochodne DW. (2009)** Locally synthesized calcitonin gene-related peptide has a critical role in peripheral nerve regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 68:326–337

- Trapp BD., Hauer P., Lemke G. (1988)** Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J. Neurosci.* 8:3515–21
- Trivedi N., Marsh P., Goold RG., Wood-Kaczmar A., Gordon-Weeks PR. (2005)** Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *J. Cell Sci.* 118:993–1005
- Tuszynski MH., Steward O. (2012)** Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron.* 74:777–791
- Vallat JM., Mathis S., Funalot B. (2013)** The various Charcot-Marie-Tooth diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 26(5):473-480
- Vance JE., Campenot RB., Vance DE. (2000)** The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486:84–96
- Vargas ME., Barres BA. (2007)** Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu. Rev. Neurosci.* 30:153–179
- Venable WN., Smith DM. (2014)** Notes on R: A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. *R Version 3.0.3 manual*
- Viader A., Chang L., Fahrner T., Nagarajan R., Milbrandt J. (2011)** MicroRNAs modulates Schwann Cell response to nerve injury by reinforcing transcriptional silencing of dedifferentiation-related genes. *J. Neurosci.* 31(48):17358-17369
- Walenta JH., Didier AJ., Liu X., Krämer H. (2001)** The Golgi-associated Hook3 Protein Is a Member of a Novel Family of Microtubule-binding Proteins. *J. Cell Biol.* 152(5):923-934
- Waller A. (1850)** Experiments on the section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 140: 422-429
- Wallquist W., Zelano J., Plantman S., Kaufman SJ., Cullheim S., Hammarberg H. (2004)** Dorsal root ganglion neurons up-regulate the expression of laminin-associated integrins after peripheral but not central axotomy. *J. Comp. Neurol.* 480: 162–169
- Wang JT., Medress ZA., Barres BA. (2012)** Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J. Cell Biol.* 196: 17–18
- Wang KC., Koprivica V., Kim JA., Sivasankaran R., Guo Y., et al. (2002)** Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature.* 417:941–944
- Werner A., Willem M., Jones LL., Kreutzberg GW., Mayer U., Raivic G. (2000)** Impaired axonal regeneration in alpha7 integrin-deficient mice. *J. Neurosci.* 20:1822–1830
- Westermann S., Weber K. (2003)** Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev. Mol Cell Biol.* 12:938-947

- White FV., Toews AD., Goodrum JF., Novicki DL., Bouldin TW., et al. (1989)** Lipid metabolism during early stages of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve. *J. Neurochem.* 52:1085–92
- Williams PL. y Hall SM. (1971)** Prolonged in vivo observations of normal peripheral nerve fibres and their acute reactions to crush and deliberate trauma. *J. Anat.* 108:397–408
- Wu D. y Murashov AK. (2013)** Molecular mechanisms of peripheral nerve regeneration: emerging roles of microRNAs. *Front. Physiol.* 4:55
- Wu D., Raafat A., Park E., Clemens S., Murashov AK. (2012)** Dicer-microRNA pathway is critical for peripheral nerve regeneration and functional recovery in vivo and regenerative axonogenesis in vitro. *Exp. Neurol.* 233(1):555-565
- Wu D., Raafat M., Pak E., Hammond S., Murashov AK. (2011).** MicroRNA machinery responds to peripheral nerve lesion in an injury- regulated pattern. *Neuroscience.* 190: 386–397
- Yang YH. y Speed TP.(2003)** Design and analysis of comparative microarray experiments, Pp 35–91in Statistical Analysis of Gene Expression Microarray Data. Speed TP. *Chapman & Hall/CRC Press*
- Ying S., Chang D., Miller J., Lin S. (2006)** The micro RNA: Overview of the RNA gene that modulates gene functions. Pp. 1-18 in Micro RNA protocols. Ying S. *Humana Press*, Totowa, New Jersey
- Yu B., Zhou S., Wang Y., Ding G., Ding F., Gu X. (2011)** Profile of MicroRNAs following Rat Sciatic Nerve Injury by Deep Sequencing: Implication for Mechanisms of Nerve Regeneration. *Plos One.* 6:1-10
- Zahurak M., Parmigiani G., Yu W., Scharpf R., Berman D., Schaeffer E., Shabbeer S., Cope L. (2007)** Pre-processing Agilent microarray data. *BMC Bioinformatics.* doi:10.1186/1471-2105-8-142
- Zhang H., Berg JS., Li Z., Wang Y., Lang P., Sousa AD., Bhaskar A., Cheney RE., Stromblad S. (2004)** Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 6: 523–531
- Zhang R., Zhang Q., Niu J., Lu K., Xie B., Cui D., Xu S. (2014)** Screening of microRNAs associated with Alzheimer's disease using oxidative stress cell model and different strains of senescence accelerated mice. *J. Neurol. Sci.* 338(1): 57-64
- Zhang H, Zheng S., Zhao J., Zhao W., Zheng L. et al. (2011)** MicroRNAs 144, 145, and 214 are down-regulated in primary neurons responding to sciatic nerve transection. *Brain res.*1383: 62–70
- Zhou FQ. y Snider WD. (2006)** Intracellular control of developmental and regenerative axon growth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361:1575–1592
- Zhou FQ., Zhou J., Dedhar S., Wu YH., Snider WD. (2004)** NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron.* 42:897–912
- Zochodne DW., Allison JA., Ho W., Ho LT., Hargreaves K., Sharkey KA. (1995)** Evidence for CGRP accumulation and activity in experimental neuromas. *Am. J. Physiol.* 268:584–590