



**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE RESPUESTA  
INMUNE ASOCIADOS A PROCESOS INFLAMATORIOS EN ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER (EA)**

KELLY YOJANNA CARDONA LONDOÑO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN BIOINFOMÁTICA Y BIOLOGÍA COMPUTACIONAL  
MANIZALES  
2017**

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DE RESPUESTA  
INMUNE ASOCIADOS A PROCESOS INFLAMATORIOS EN ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER (EA)**

KELLY YOJANNA CARDONA LONDOÑO

Proyecto de grado para optar al título de Magister en Bioinformática y biología  
computacional

Tutor

CARLOS ANDRES NARANJO GALVIS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN BIOINFOMÁTICA Y BIOLOGÍA COMPUTACIONAL  
MANIZALES  
2017**

## **Agradecimientos**

### *1.1.1.1. Instituciones y oficinas*

- Al Centro de bioinformática y biología computacional de Colombia CBBC-BIOS por el acompañamiento, y el uso de su infraestructural computacional y sus instalaciones durante el desarrollo de esta tesis.
- Al Sistema general de Regalías a través de la Gobernación de Caldas por el apoyo financiero para la realización de esta maestría.
- A la Unidad de investigación de la Universidad Autónoma de Manizales por su apoyo financiero y gestión administrativa.
- A la Universidad Autónoma de Manizales, Universidad de Caldas, Universidad Católica de Manizales y Universidad Tecnológica de Pereira por el uso de los laboratorios y sus instalaciones para el desarrollo de esta tesis.
- Al Grupo de Investigación Neuroaprendizaje, por el apoyo permanente durante el desarrollo de la investigación.

### *1.1.1.2. Doctores e investigadores*

- Al Dr. Carlos Andrés Naranjo Galvis, director de la tesis, por su entusiasmo y proactividad para que este proyecto se hiciera realidad.
- A la Dra. Mary Orrego Cardozo, líder del grupo de investigación Neuroaprendizaje, por todas sus enseñanzas en biología molecular.
- A la Dra. Francia Restrepo de Mejía. Coordinadora del laboratorio de Neurofisiología, por sus aportes a los ajustes metodológicos de esta investigación.
- A la investigadora Andrea González Muñoz, por su paciencia y compromiso durante el asesoramiento en el desarrollo e interpretación de los análisis bioinformáticos para esta tesis
- A los investigadores Leonardo Beltrán Angarita, Iván Alberto Lopera y Narmer Fernando Galeano por acogerme en sus laboratorios y brindarme el entrenamiento necesario.

#### *1.1.1.3. Otras personas*

- A mis compañeros de la maestría, las personas más brillantes que conozco, y a los profesores por sus aportes a mi desarrollo profesional y personal.
- A mis compañeros del grupo de investigación y a los colaboradores en la recolección de la muestra para este proyecto.
- A los pacientes con Enfermedad de Alzheimer, sus familias y los individuos control, por su generosidad, sin ellos nada hubiera sido posible.

#### *1.1.1.4. Agradecimientos personales*

- A la familia Rueda Jaramillo, especialmente Al Dr. Miguel, gracias infinitas por haberme acogido en su hogar y darme la primera oportunidad.
- A Jhonny por ser mi compañía incondicional, mi amigo, mi coequipero en investigación y mi chef mientras escribía esta tesis.
- A mis amigos y compañeros en este camino Nata, Sebas, Luis, Lau y Caro por disfrutar y sufrir conmigo este proceso.
- A mi mamá, por acompañar mi camino.

## Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más común en todo el mundo. El mecanismo fisiopatológico de la EA sigue sin estar claro; sin embargo, estudios recientes han demostrado que la expresión diferencial y la presencia de polimorfismos genéticos en genes involucrados en la respuesta inflamatoria puede desencadenar el inicio y la progresión de la neurodegeneración en la enfermedad. Este estudio tuvo como objetivo explorar la patogénesis molecular de la inflamación relacionada con la EA mediante la secuenciación de transcriptoma y la genotipificación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en pacientes con EA y controles. Para ello, se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de 5 casos de EA y 10 controles, utilizando secuenciación de nueva generación con el panel RNA Ion AmpliSeq. Posteriormente, se identificaron los genes diferencialmente expresados (DEG) con el paquete DESeq2 de R/Bioconductor, sobre los cuales se realizaron análisis de enriquecimiento funcional por ontologías de genes (GO), y vías metabólicas a través de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG), así como la identificación de redes de interacción proteína–proteína con la base de datos STRING. Adicionalmente, se llevó a cabo la genotipificación de 15 SNP en 7 genes candidatos en 30 casos de EA y 160 controles mediante la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

Como resultado se tiene que un total de 94 genes sobre expresados y 147 subexpresados fueron identificados. Los genes sobre expresados se encontraron enriquecidos en ontologías relacionadas con las vías de señalización de la familia interferón (INF) mientras que los genes sub expresados se asociaron principalmente con procesos ciclo celular. En relación con el mapeo de las rutas metabólicas KEGG, son de destacar las vías de señalización de JAK / STAT, quimiocinas, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 17 (IL-17), MAP quinzas (MAPK) y la vía de EA. Respecto a la genotipificación, los SNP rs7747909 y 10484879 del gen IL-17A, rs1000610 del gen TNF- $\alpha$  y rs2075650 del gen TOMM40 fueron identificados como factor de riesgo para la EA. Este estudio proporcionó no solo una

imagen completa de la expresión genética en EA, sino también los procesos clave asociados con la patología que son importantes para la regulación de la neuroinflamación, contribuyendo a tener una comprensión mucho mejor desde la perspectiva genética para mejorar los mecanismos actuales para tratar la EA en Colombia.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, Genes diferencialmente expresados, Análisis de enriquecimiento funcional, Polimorfismos de nucleótido simple, Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

### **Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder worldwide. The pathophysiological mechanism of AD remains unclear; However, recent studies have shown that differential expression and the presence of genetic polymorphisms in genes involved in the inflammatory response may result in disease onset and progression. This study aimed to explore the molecular pathogenesis of AD-related inflammation through transcriptome sequencing and genotyping of simple nucleotide polymorphisms (SNP) in AD patients and healthy controls. Whole blood samples from 5 AD and 10 controls were analyzed through Next Generation Sequencing using the RNA Ion AmpliSeq panel. Differentially expressed genes (DEG) were identified by the DeSeq2 package R / Bioconductor. . Functional enrichment analyses of the DEGs were carried out through gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolic pathway mapping. In addition, protein-protein interaction (PPI) networks were analyzed using the STRING database. Furthermore, 15 SNP on 7 candidate genes in 30 AD-subjects and 160 controls were genotyped by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). As a result a total of 95 up-regulate genes and 149 down-regulated genes were identified. The up-regulated genes were enriched in ontologies related to interferon family (INF) signaling, while the down-regulated genes were mainly associated with the cell cycle process. In relation to KEGG metabolic pathways mapping, we highlight gene expression alterations in the signaling pathways of JAK / STAT,

chemokines, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-17 (IL-17), MAP kinases and Alzheimer's disease. With respect to genotyping results, the SNPs rs7747909 and 10484879 of gene IL-17A, rs1000610 of TNF- $\alpha$  and rs2075650 of TOMM40, were identified as a risk factor for AD. This study provided not only a comprehensive picture of gene expression in AD, but also the key processes associated with AD pathology that are important for the regulation of neuroinflammation, which, in turn, contributes to have a much better understanding from the genetic perspective in order to improve the current mechanisms to treat AD in Colombia.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Differentially expressed genes, Functional enrichment analysis, Single nucleotide polymorphism, Real time-polymerase chain reaction.

## CONTENIDO

1. Introducción.....	15
1.1. Campo temático.....	16
1.2. Planteamiento del problema .....	17
1.3. Justificación .....	20
1.4. Objetivos.....	21
1.4.1. Objetivo general .....	21
1.4.2. Objetivos específicos.....	21
2. Antecedentes y Referente Teórico.....	23
2.1. El rol de los mecanismos inflamatorios en la EA .....	24
2.1.1. Astrocitos, inflamación y su rol en la EA.....	25
2.1.2. Microglía, inflamación y su rol en la EA.....	26
2.2. Análisis de transcriptoma y genotipificación de polimorfismos en EA	
28	
2.2.1. APOE en la EA.....	30
2.2.2. TOMM40 en la EA.....	31
2.2.3. TNF- $\alpha$ en la EA.....	31
2.2.4. IL-17 en la EA.....	33
2.2.5. IFN en la EA .....	34
2.2.6. Otros genes en la EA .....	35
2.3. Vías de señalización en la EA .....	36
2.3.1. Vía de señalización JAK/STAT.....	36
2.3.2. Vía de señalización de las Quimiocinas .....	38
2.3.3. Vía de señalización de la EA.....	39
2.3.4. Vía de señalización del TNF.....	40
2.3.5. Vía de señalización de IL-17 .....	42
2.3.6. Vía de señalización de MAPK .....	43
3. Materiales y métodos .....	46
3.1. Diseño experimental y obtención de la muestra .....	46

3.2. Pasos metodológicos para dar cumplimiento al primer objetivo específico: Establecer la prevalencia de los SNP en región promotora de los genes TREM2, TOMM40, IL17,IL10,TNF e IL8 asociados a procesos inflamatorios en la EA, en la población de estudio.....	47
3.2.1. Aislamiento y cuantificación de ADN.....	47
3.2.2. Genotipificación de polimorfismos.....	47
3.2.3. Análisis estadístico.....	48
3.3. Pasos metodológicos para dar cumplimiento al segundo objetivo específico: determinar los perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA utilizando la secuenciación del transcriptoma humano.....	48
3.3.1. Aislamiento y cuantificación de ARN.....	49
3.3.2. Preparación de las librerías y secuenciación del amplicón.....	49
3.3.3. Análisis bioinformático de las secuencias.....	50
3.3.4. Análisis de enriquecimiento funcional de DEG.....	52
3.4. Pasos metodológicos para dar cumplimiento al tercer objetivo específico: relacionar la expresión del transcriptoma de los sujetos de investigación con la presencia de SNP de región promotora de los genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en la EA.....	53
4. Análisis de resultados.....	54
4.1. Prevalencia de los SNP en región promotora de los genes TREM2, TOMM40, IL17,IL10,TNF, IL8 y APOE asociados a procesos inflamatorios en la EA	55
4.2. Perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA.....	61
4.2.1. Selección de muestras, extracción y valoración del ARN.....	61
4.2.2. Preprocesamiento y análisis de calidad de las secuencias.....	63
4.2.3. Análisis exploratorio y ajuste del conjunto de datos.....	64
4.2.4. Análisis de expresión de genes.....	68
4.2.5. Análisis de enriquecimiento funcional de DEG.....	69

4.3. Relación entre los SNP de región promotora de los genes TREM2, TOMM40, IL17,IL10,TNF e IL8 y los perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA .....	77
4.3.1. Vías de señalización.....	77
4.3.2. Redes de interacción entre productos proteicos .....	91
5. Conclusiones generales.....	94
5.1. Contribuciones de la Tesis.....	94
5.2. Impactos Potenciales de la Tesis .....	94
5.3. Recomendaciones y trabajos futuros.....	95
6. Referencias bibliográficas .....	96
7. ANEXOS .....	119
Anexo I. Acta de aprobación de comité de Ética para el desarrollo del proyecto de investigación y formato de consentimiento informado para la participación voluntaria .....	119
119	
Anexo II. Protocolo para la toma de muestras de sangre .....	124
138	

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.Frecuencias genotípicas de SNP identificados como factor de riesgo para la EA en la muestra de estudio.....	56
Tabla 2. Comparativo entre los OR de otros estudios de caso control reportados en literatura contra el OR obtenido en el estudio .....	57
Tabla 3. Haplotipos significativos para los SNP evaluados en la muestra .....	61
Tabla 4. Cantidad de lecturas obtenidas para cada muestra en el proceso de secuenciación.....	62
Tabla 5.Terminos enriquecidos para la ontología "procesos biológicos" en genes sobre-expresados.....	72
Tabla 6.Terminos enriquecidos para la ontología "procesos biológicos" en genes sub-expresados.....	76

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.El proceso neuroinflamatorio. Diseño y diagramación: Melissa Zuluaga .....	25
Ilustración 2. Vía de Señalización Jak/STAT. Fuente (Kanehisa et al., 2017) .....	38
Ilustración 3.Vía de Señalización de las Quimiocinas. Fuente (Kanehisa et al., 2017) .....	39
Ilustración 4. Vía de Señalización de la Enfermedad de Alzheimer. En rojo se señalan los genes característicos de la EA de tipo hereditario. Fuente (Kanehisa et al., 2017) .....	40
Ilustración 5. Vía de Señalización del Factor de Necrosis Tumoral. Fuente (Kanehisa et al., 2017) .....	42
Ilustración 6. Vía de Señalización de la Interleucina 17. Fuente (Kanehisa et al., 2017) .....	43
Ilustración 7. Vía de Señalización de las quinasas Activadas por Mitogeno (MAPK). Fuente (Kanehisa et al., 2017) .....	45
Ilustración 8. Análisis MDS para esclarecer el comportamiento de las 15 muestras secuenciadas basado en los conteos crudos .....	63
Ilustración 9. Agrupamiento basado en las distancias Euclidianas .....	65
Ilustración 10. PCA para conteos normalizados .....	66
Ilustración 11. Agrupamiento basado en las distancias Euclidianas posterior a la exclusión de muestras atípicas .....	67
Ilustración 12. PCA para conteos normalizados posterior a la exclusión de muestras atípicas .....	68
Ilustración 13. MA-PLOT de los genes diferencialmente expresados ( $p_{adj} < 0,05$ y $FDR < 0,1$ ) .....	69
Ilustración 14.Mecanismos de muerte celular, la vía inferior muestra un proceso normal de muerte por necrosis/apoptosis, la vía superior una muerte por neurodegeneración. Diseño y diagramación: Melissa Zuluaga. ....	73

Ilustración 15. Reactivación de las fases G1/S del ciclo celular para activación de apoptosis. Diseño y diagramación: Melissa Zuluaga.....	75
Ilustración 16. Vía de señalización JAK/STAT. En color rosa se identifican los genes involucrados en esta vía que se encuentran sobre expresados. ....	80
Ilustración 17. Vía de señalización de las quimiocinas. En color rosa se identifican los genes involucrados en esta vía que se encuentran sobre expresados y en marco celeste se representan los genes sub expresados.....	84
Ilustración 18. Vía de señalización de la Enfermedad de Alzheimer. En color rosa se identifica el gen de la fosfolipasa C-B2 (PLCB2) el cual se encuentra sobre expresado en los casos. En color rojo se representan los genes característicos de la EA temprana.....	86
Ilustración 19. Vía de señalización de las MAP quinasas (subtipo JNK). En marco celeste se representa el gen TAK1 que esta sub expresado y en color rosa el gen NLK el cual se encuentra sobre expresado en los casos de Alzheimer. ..	88
Ilustración 20. Vía de señalización del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-A) en marco celeste se representa el gen TAK1 el cual se encuentra subexpresado en los casos de EA.....	90
Ilustración 21. Vía de señalización de la interleucina 17 alfa (IL17A). En marco celeste se representa el gen TAK1 el cual se encuentra sub expresado en los casos de EA. ....	91
Ilustración 22. Interacción entre los productos de la vía JAK/STAT con productos de la familia INF. ....	92
Ilustración 23. Interacciones de TAK1 con productos de la familia TGF.....	93

## LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Acta de aprobación de comité de Ética para el desarrollo del proyecto de investigación y formato de consentimiento informado para la participación voluntaria.....	119
Anexo II. Protocolo para la toma de muestras de sangre .....	124
Anexo III. Niveles de calidad y concentración de ADN .....	130
Anexo IV. Valores de cuantificación del ARN para secuenciación.....	133
Anexo V. Procedimientos bioinformáticos previo análisis de expresión diferencial .....	134
Anexo VI. Procedimiento para análisis de expresión diferencial .....	136
Anexo VII. Frecuencias genotípicas para los SNP de interés .....	138
Anexo VIII. Genes diferencialmente expresados ( $p_{adj} < 0.05$ , $FDR < 0,1$ , $LOG_2FC > 0,5$ y $< -0.5$ ) .....	140
Anexo IX. Análisis de enriquecimiento por términos de ontología - GO para genes sobre expresados.....	147
Anexo X. Análisis de enriquecimiento por términos de ontología - GO para genes sub expresados .....	148

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas, conforman un grupo heterogéneo de alteraciones que conllevan a un proceso insidioso de daño y muerte neuronal, dentro de estas, la Enfermedad de Alzheimer (EA) constituye la patología más frecuente conformando alrededor del 50% al 70% de todos los casos de demencias reportadas en Colombia (Ministerio de Salud y Protección Social, 2005). A lo largo de su amplio estudio, se ha encontrado que la EA no puede ser explicada desde un punto de vista etiológico unifactorial y, por el contrario, se ha visto que son múltiples los mecanismos etiopatogénicos involucrados, que incluyen el depósito anormal de proteína beta amiloide ( $A\beta$ ) con la formación de placas neuríticas, la hiperfosforilación de proteínas tau con la subsiguiente formación de ovillos neurofibrilares (NFT), la participación de mecanismos de estrés oxidativo y el desencadenamiento de respuestas inflamatorias no controladas, entre otros.

En relación a los mecanismos inflamatorios, múltiples estudios neuropatológicos, moleculares y genéticos han sido llevados a cabo, proveyendo una clara relación entre la activación de vías inflamatorias y el progreso de la enfermedad. Es así, como se han descrito diferentes cambios que incluyen, alteraciones a nivel celular con hiperactivación microglial y astrocitaria, cambios a nivel molecular con la activación del sistema de complemento y el desequilibrio en los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias además de otras proteínas solubles de señalización. Si bien el aporte en este campo de conocimiento ha sido cada vez mayor, aún persiste información contradictoria y múltiples vacíos de conocimiento en relación con la respuesta inflamatoria y la EA. Es por esto que la comunidad científica ha intentado explorar nuevos campos que serán abordados en la presente tesis, gracias al estudio de la expresión genética diferencial y la presencia de polimorfismos en genes relacionados con la respuesta inmune en la EA. Este abordaje se realizó teniendo en cuenta que todos los mecanismos inflamatorios son altamente dependientes entre sí y casi nunca ocurren de forma aislada, sin embargo, estas aproximaciones permiten aportar al conocimiento de cómo los mecanismos inflamatorios encajan dentro de la patogenia general de la EA así como

también buscan contemplar nuevos diseños terapéuticos que permitan un mejor manejo de la enfermedad.

### **1.1. Campo temático**

La enfermedad de Alzheimer (EA), es la forma más común de demencia en el mundo occidental, es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista patológico y clínico (Reitz, 2015) en cuya progresión se involucran múltiples factores genéticos, ambientales y fisiológicos incluyendo procesos metabólicos y eventos inflamatorios (Bagyinszky, Youn, An, & Kim, 2014). Los recientes avances en tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han facilitado el análisis rápido del genoma en miles de sujetos, lo que ha permitido un avance significativo en la comprensión de los fundamentos genéticos de la susceptibilidad a la EA. Durante los últimos años, este tipo de aproximación ha permitido demostrar que la inflamación hace parte de los mecanismos de progresión de la neurodegeneración observada en la enfermedad. Diversos estudios indican que las aberraciones en el control de la expresión génica, así como la presencia de variantes polimórficas pueden contribuir a la iniciación y progresión de esta patología (Twine, Janitz, Wilkins, & Janitz, 2011). Las técnicas de secuenciación del transcriptoma han posibilitado una aproximación potente a los análisis de expresión de genes garantizando niveles de sensibilidad y especificidad suficientes (W. Li et al., 2015), lo cual ha proporcionado información sobre las vías moleculares implicadas en la patogénesis de la EA y nuevos blancos terapéuticos potenciales. Así mismo, las técnicas moleculares han permitido identificar con gran sensibilidad, especificidad y reproducibilidad ácidos nucleicos tanto para fines diagnósticos como para fines de investigación, tal es el caso de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR), la cual es una técnica que fusiona la química de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de moléculas reporteras fluorescentes (Navarro, Serrano-Heras, Castaño, & Solera, 2015), lo que ha contribuido a vislumbrar el rol de las variantes puntuales en genes y regiones específicas del genoma, dentro de

los diferentes fenotipos que se pueden presentar en diferentes condiciones fisiopatológicas incluyendo la EA.

Este proyecto de investigación buscaba establecer un perfil de expresión de los genes asociados a procesos inflamatorios en EA en población Colombiana e identificar el posible rol de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP), sobre la expresión de dichos genes.

Esta tesis, fue desarrollada en la línea de investigación de biología molecular en salud, adscrita al grupo de investigación Neuroaprendizaje de la Universidad Autónoma de Manizales (UAM); en el marco del proyecto de investigación denominado “Identificación de SNP por secuenciación del transcriptoma de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en enfermedad de Alzheimer (EA)” (Código: 464-065 BIOS), el cual fue financiado con recursos del sistema general de regalías a través del centro de bioinformática y biología computacional de Colombia CBBC-BIOS mediante la convocatoria de proyectos “Fomento para la investigación e innovación en biotecnología”, y por la UAM, a través de la unidad de investigación.

## **1.2. Planteamiento del problema**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo y es la forma más común de demencia en los adultos mayores. En Colombia los casos de EA corresponden entre 50% y 70% del total de los casos de demencia reportados (Ministerio de Salud y Protección Social, 2005). Para el año 2020 se espera que 260.000 colombianos mayores de 60 años padezcan esta patología. A la fecha no hay información actualizada sobre la frecuencia y la carga económica generada por ésta enfermedad en el país (Takeuchi, Ariza-Araujo, & Prada, 2014). Por esta razón, la EA representa un desafío para las políticas públicas y los recursos en lo concerniente al desarrollo, la calidad de vida, el cumplimiento de los derechos y la inclusión social de los sujetos que la padecen y sus familias.

Entre las características clínicas de la EA se destaca el deterioro de la memoria a corto plazo que a lo largo de los años progresa hasta involucrar otros aspectos de

la cognición y finalmente impacta la habilidad del sujeto para desarrollar actividades de la vida diaria. Desde el punto de vista neuropatológico, en la EA se presenta acumulación extracelular del péptido beta amiloide (A $\beta$ ), hiperfosforilación de la proteína Tau y formación de ovillos neurofibrilares (NFT) a nivel intracelular (Hyman et al., 2012; Serrano-Pozo, Frosch, Masliah, & Hyman, 2011); la prevalencia de estas lesiones incrementa con la edad y se presentan en una proporción del 60% al 70% de los sujetos octogenarios con la patología (Pierce, Bullain, & Kawas, 2017). Sin embargo, las evidencias neuropatológicas no son suficientes, ya que es frecuente encontrar múltiples comorbilidades con la EA, son frecuentes los casos en los que se presentan este tipo de lesiones en individuos sin demencia y, como consecuencia, se hace difícil establecer la etiología de la enfermedad (Bennett et al., 2006; Enciu & Popescu, 2013). Así mismo, varias de las características clínicas de la EA se superponen con otros tipos de demencia y desórdenes neurológicos (Byrne et al., 2012; Mendez, Selwood, Mastri, & Frey, 1993), por lo tanto, los mecanismos fisiopatológicos de la EA aún no son claros, lo que indica que, al igual que muchos otros trastornos geriátricos, la EA parece ser de origen multifactorial (X.-F. Chen, Zhang, Xu, & Bu, 2013)

Un gran número de evidencias (Heppner, Ransohoff, & Becher, 2015; Tweedie et al., 2012; Wyss-Coray & Rogers, 2012) han documentado que la inflamación es un mecanismo que podría participar de forma importante en el progreso de la neurodegeneración presente en la EA. La desregulación y la sobre activación de las células de la glía en el sistema nervioso central ocasionan la síntesis y liberación de diversos factores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios (citocinas, quimiocinas, radicales libres), los cuales, se propagan de forma descontrolada para conducir a un círculo vicioso que conduce a la muerte neuronal y a la progresión crónica de la enfermedad. Este fenómeno se debe en parte a variaciones en la expresión de los genes que codifican para dichas moléculas pro y anti inflamatorias (L. Liu & Chan, 2014; Luterman et al., 2000; Vukic et al., 2009), así mismo, estudios recientes han resaltado el papel de los polimorfismos genéticos de estos genes con relación a la

susceptibilidad a la enfermedad (Flex et al., 2014; Sardi et al., 2011; Q. Yang, Wang, Jia, & Wang, 2016).

No obstante lo anterior, aunque se sabe que la neuroinflamación es un evento constante en la EA, el conocimiento actual es insuficiente para determinar si la inflamación es una causa, un promotor o, simplemente un fenómeno secundario en esta patología inexorablemente progresiva (Enciu & Popescu, 2013). En este sentido, se realizan actualmente alrededor del mundo múltiples investigaciones que buscan establecer los mecanismos que modulan la reacción inflamatoria propia de la EA, esto, gracias al advenimiento de nuevas técnicas moleculares para el estudio del genoma a gran escala, inicialmente con los micro arreglos y luego, con las técnicas de secuenciación de nueva generación, a través de las cuales se han podido identificar sistemáticamente, entre otros, los cambios a nivel del transcriptoma que ocurren frente a diferentes estímulos durante el desarrollo de la enfermedad, y el establecimiento de procesos celulares particulares y la respuesta al estrés.

Empero, dada la naturaleza multifactorial de la EA, es bastante la cantidad de genes y polimorfismos reportados hasta el momento y en su mayoría, los hallazgos no han sido contundentes, entre otras razones, debido a las diferencias metodológicas entre estudios y a las discrepancias entre las poblaciones estudiadas, dada la diversidad en su origen ancestral. En la literatura disponible no se encontraron reportes que permitan establecer el rol de la expresión de los genes inflamatorios en la fisiopatología de la EA en población colombiana por lo tanto, no se conocen los factores inflamatorios predisponentes de riesgo para la EA en nuestro país. Es por lo anterior, que el grupo de investigación Neuroaprendizaje se ha interesado en los últimos años en aportar al conocimiento del sustrato molecular de la EA, si bien el grupo Neuroaprendizaje, ha sido durante años referente para la región en el estudio de la EA, el abordaje ha sido desde el componente electrofisiológico, pero, para comprender mejor el fenómeno de la EA y proponer alternativas de intervención efectivas, es necesario ahondar en los aspectos moleculares que actúan detrás de la respuesta electrofisiológica, aprovechando las

herramientas tecnológicas de reciente desarrollo que, además, permiten estar a la vanguardia de las investigaciones científicas a nivel mundial y que contribuyen a la construcción de un nuevo paradigma en el abordaje de la patología desde los procesos investigativos a nivel nacional. Se requiere por lo tanto, establecer el perfil de expresión de genes asociados a procesos inflamatorios y la presencia de polimorfismos genéticos en sujetos con EA en Colombia, para de esta forma contribuir a establecer las características de esta patología en nuestra población y aportar al desarrollo de medidas de diagnóstico, tratamiento y seguimiento acorde a las necesidades de nuestro contexto. Es así como surge la pregunta de investigación ¿Cuál es el perfil de expresión de genes asociados a procesos inflamatorios en pacientes colombianos con Enfermedad de Alzheimer y cómo se ve influenciado dicho perfil por la presencia de polimorfismos de nucleótido simple?

### **1.3. Justificación**

El presente trabajo contribuyó a establecer el perfil de expresión génica y la prevalencia de SNP de genes asociados a procesos inflamatorios en la EA en una muestra colombiana. A partir de los resultados de esta investigación se hace posible generar una caracterización de la susceptibilidad a la EA en nuestra región, desde el abordaje la desregulación de la respuesta inmune clave en las enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA. La presente investigación es de relevante importancia dado que en la literatura disponible no se encontraron estudios en población colombiana que evalúen los niveles de expresión de genes inflamatorios asociados a la EA, adicionalmente, tampoco se encontró que en nuestra población se hayan determinado valores consistentes de prevalencia o frecuencia de variantes polimórficas relacionadas con esta patología, existen apenas en la literatura algunos reportes de la distribución de SNP en nuestra población y los porcentajes son significativamente variables entre estudios.

Desde el ejercicio investigativo, el desarrollo de esta tesis aportó al fortalecimiento de la línea de investigación de biología molecular en salud del grupo de investigación Neuroaprendizaje y al desarrollo de investigación básica en la

UAM, pero también a la apertura hacia la disciplina de la bioinformática nunca antes explorada dentro de los ejercicios investigativos desarrollados por la universidad; de esta misma forma, la ejecución de este proyecto de tesis cooperó con la formación de recurso humano con conocimiento en bioinformática que puede aportar a la ejecución de políticas públicas como la ley de ciencia y tecnología para Colombia (Congreso de la Republica de Colombia, 2009) y al desarrollo regional a través de la contribución al cumplimiento del plan de desarrollo del departamento de Caldas 2016-2019 el cual contempla dentro de sus objetivos la ejecución del plan y acuerdo de desarrollo estratégico departamental de ciencia, tecnología e innovación, el cual busca entre otras cosas, fortalecer el sector estratégico Bio (biodiversidad y biotecnología) en Caldas (Gobernación de Caldas, 2016).

Los resultados obtenidos de esta investigación aportan al conocimiento de la EA y los mecanismos inflamatorios que en ella se presentan, especialmente a la caracterización de estos fenómenos en población colombiana, donde la exploración ha sido poca, y por lo tanto no se tienen suficientes datos sobre el comportamiento de la enfermedad lo que ha limitado el desarrollo de estrategias de intervención oportuna desde políticas del gobierno nacional, de manera que, los resultados obtenidos de este trabajo sirven para mitigar el problema de la desinformación sobre el comportamiento de la EA en nuestro país y a establecer nuevos blancos de investigación terapéutica.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo general**

Analizar la expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en enfermedad de Alzheimer (EA).

### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Establecer la prevalencia de los SNP de los genes: de proteína desencadenante del receptor expresado en células mieloides 2 (*TREM2*)

(rs75932628),, translocasa de la membrana mitocondrial 40 (*TOMM40*) (rs2076650),, interleucina 17-A (*IL17A*) (rs10484879, rs7747909, rs2275913), interleucina 10 (*IL10*) (rs1800869, rs1800872), factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ) (rs1800610, rs1800629, rs1800630, rs1779724) e interleucina 8 (*IL8*) (rs4073) asociados a procesos inflamatorios en la EA, en la población de estudio.

2. Determinar los perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA.
3. Relacionar la expresión del transcriptoma de los sujetos de investigación con la presencia de SNP de región promotora de los genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en la EA.

## 2. ANTECEDENTES Y REFERENTE TEÓRICO

La demencia es un síndrome clínico degenerativo, que se caracteriza por una inexorable progresión en el deterioro de las habilidades cognitivas y de la capacidad de vida independiente (Prince et al., 2013). Con el envejecimiento progresivo de la población, diversas disciplinas han centrado su investigación en los trastornos médicos relacionados con la edad, y más específicamente la demencia. En el año 2015 hubo 901 millones de adultos mayores en el mundo, lo que correspondía al 12% de la población global, y se prevé un incremento particularmente rápido en la proporción de adultos mayores para países de Asia, América Latina y el Caribe, para el año 2030 se estima que el número de adultos mayores alrededor del mundo alcance los 1.400 millones, para el 2050 se espera que sean 2.100 millones, cifra que podría ascender a 3.200 millones en 2100 (DeSA, 2015)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente, afecta principalmente a los adultos mayores y actualmente 24 millones de personas alrededor del mundo la padecen (Hurd, Martorell, Delavande, Mullen, & Langa, 2013), siendo la causa más común de pérdida severa de memoria y deterioro cognitivo en los adultos mayores (Noroozian, 2016)

Los principales cambios patológicos observados en el tejido cerebral asociados a la EA incluyen el depósito extracelular del péptido beta amiloide ( $A\beta$ ), de entre 39 y 42 aminoácidos, que forma placas neuríticas. El  $A\beta$  es producido por la ruptura proteolítica secuencial de la proteína precursora amiloide (APP) mediado por las enzimas beta y gamma secretasa; adicionalmente, como cambio patológico se presenta acumulación intracelular de proteína Tau hiperfosforilada (p-tau), una proteína de ensamblaje de microtúbulos que al acumularse forma ovillos neurofibrilares (NFT). La prevalencia de estas lesiones a nivel cerebral incrementa con la edad estando presentes en una proporción del 60% al 70% de los sujetos octogenarios con EA (Pierce et al., 2017) sin embargo, estas lesiones no siempre están presentes en el curso de la patología e incluso se pueden presentar en sujetos sanos. Otros cambios patológicos adicionales incluyen microgliosis reactiva y pérdida generalizada de neuronas, sustancia blanca y sinapsis (Reitz, 2015). Dentro

de las manifestaciones clínicas de la EA se incluye al igual que en la mayoría de demencias, el deterioro de la memoria a corto plazo, sin embargo, en la EA, el deterioro de la memoria trasciende hasta afectar la memoria a largo plazo y a lo largo de los años progresa hasta involucrar otros aspectos de la cognición, incluyendo deterioro del lenguaje, disfunción ejecutiva, deterioro visoespacial y finalmente se genera un impacto en la habilidad del sujeto para desarrollar actividades de la vida diaria (Noroozian, 2016; Pierce et al., 2017)

### **2.1. El rol de los mecanismos inflamatorios en la EA**

Los mecanismos exactos que conducen a los cambios neuropatológicos y clínicos de la EA todavía no se han esclarecido completamente. Sin embargo, se ha comprobado que la aparición de las manifestaciones patológicas propias de la enfermedad están acompañadas por un proceso neuroinflamatorio crónico (L. Liu & Chan, 2014) desencadenado por neuronas dañadas, depósitos de A $\beta$  altamente insolubles, y NFT (Wenk, 2006)

La neuroinflamación en la EA suele manifestarse como astrogliosis, activación microglial y un aumento en los niveles de citocinas inflamatorias (ver Ilustración 1) tales como la IL-6, el TNF- $\alpha$  y el TGF- $\beta$ . Además, se da la infiltración de células inmunes periféricas incluyendo células T y macrófagos entre otros, que pueden modificar la contribución de la microglía y los astrocitos a la neuroinflamación (Shadfar, Hwang, Lim, Choi, & Hong, 2015).

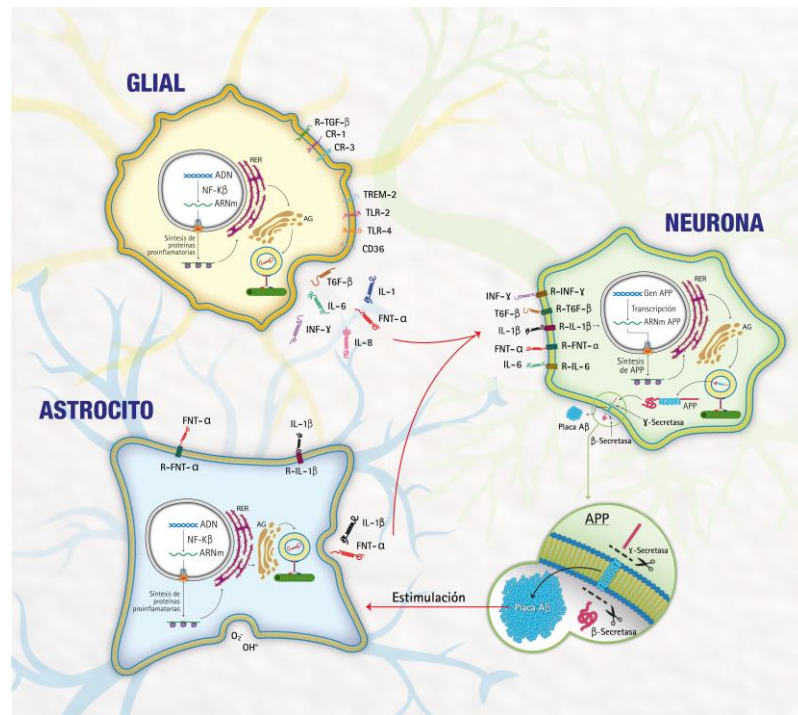


Ilustración 1.El proceso neuroinflamatorio. Diseño y diagramación: Melissa Zuluaga

### 2.1.1. *Astroцитos, inflamación y su rol en la EA*

Los astrocitos son las células más abundantes en el sistema nervioso y constituyen alrededor del 25% del volumen cerebral (Morales, Guzmán-Martínez, Cerda-Troncoso, Farías, & Maccioni, 2014), dentro de sus funciones se incluyen la regulación de la sinaptogénesis y la angiogénesis, que promueven la supervivencia y maduración neuronal (Serpente, Bonsi, Scarpini, & Galimberti, 2014). Estas células parecen tener un rol importante dentro de la patogénesis de la EA y aunque aún permanece abierto el debate alrededor del rol de la astrogliosis sobre los acúmulos de A $\beta$ , se han observado con frecuencia astrocitos activados en las áreas del cerebro con placas amiloides (Nielsen et al., 2010; Sondag, Dhawan, & Combs, 2009; Thal, 2012), además, hay evidencia que soporta la correlación entre la astrogliosis y el deterioro cognitivo (Simpson et al., 2010).

Cuando los astrocitos son estimulados por placas de A $\beta$ , se tornan reactivos y producen en exceso citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  las cuales podrían ser los factores causales de la disfunción cognitiva en la EA, así mismo, producen

especies reactivas de oxígeno (ROS) que participan de los procesos de estrés oxidativo; este mecanismo es retroalimentado ya que los astrocitos también pueden ser activados de manera secundaria por sus productos IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  y, a largo plazo el efecto de estas citocinas es perjudicial para la supervivencia de las neuronas. Los astrocitos reactivos cuya presencia ha sido evidenciada tanto en tejido cerebral de pacientes con EA como en animales transgénicos (Verkhatsky, Olabarria, Noristani, Yeh, & Rodriguez, 2010) podrían secretar más moléculas inflamatorias para sobre-regular la transcripción del gen de la APP y los niveles de esta en las neuronas, contribuyendo a la generación de A $\beta$  desde la APP, de manera que el A $\beta$ , los astrocitos, las citoquinas y la APP neuronal aparentemente desarrollan un círculo vicioso en la inmunoneuropatología de la EA (C. Li et al., 2011).

### ***2.1.2. Microglía, inflamación y su rol en la EA***

Las células microgliales son las principales células de la inmunidad innata presentes en el sistema nervioso central (SNC) y actúan como mediadores primarios de la inflamación que dirige la respuesta inmune endógena (Serpente et al., 2014); en el cerebro estas células se concentran especialmente en el hipocampo y la sustancia nigra, dentro de sus funciones se encuentran secretar mediadores citotóxicos y factores de crecimiento, facilitar la fagocitosis, actuar como células presentadoras de antígeno (Ousman & Kubes, 2012; Ransohoff & Engelhardt, 2012) y brindar soporte y protección a la neurogénesis y la sinaptogénesis, funciones atribuibles a su acción en la fagocitosis de los desechos celulares, incluyendo una variedad de factores de señalización celular, neurotrofinas y componentes de la matriz extracelular (Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhatsky, 2011)

La microglía puede activarse en respuesta a múltiples estímulos patológicos dentro de los que se incluyen infecciones, traumatismos, disfunción neuronal, isquemia e inflamación, dicha activación se caracteriza por la presentación de alguno de dos fenotipos bajo condiciones pro o anti-inflamatorias específicas. El fenotipo M1, inducido por la activación clásica de la microglía, se caracteriza por ser predominantemente pro-inflamatorio con la producción de citoquinas como

interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), TNF- $\alpha$ , interferón gamma (INF- $\gamma$ ), radicales libres de óxido nítrico (NO) y aniones súper óxido, que actúan en respuesta a patógenos y células tumorales, pero que también pueden dañar células saludables como neuronas y glía (Serpente et al., 2014). El fenotipo M2, es predominantemente anti-inflamatorio y se subdivide en dos grupos diferentes. Un primer fenotipo es marcado por la arginasa-1 e inducido por la interleucina 4 (IL-4) o la interleucina 13 (IL-13), por lo que reduce la respuesta inflamatoria y promueve la angiogénesis y la reparación celular (Czeh, Gressens, & Kaindl, 2011). El segundo, es un fenotipo desactivado, inducido por interleucina 10 (IL-10) o factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que muestra un aumento en la capacidad fagocítica, pero no un aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Pickford et al., 2011)

En la EA las células microgliales son más propensas a cumplir un rol pro-inflamatorio (Fenotipo M1) que fagocítico (Mandrekar-Colucci & Landreth, 2010). En los cerebros con EA los depósitos de A $\beta$  son ricos en microglía (El Khoury et al., 2007; Hanisch & Kettenmann, 2007) que contribuye a incrementar la respuesta inflamatoria mediante la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa- beta (NF- $\kappa\beta$ ) implicado en la producción de citoquinas, tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, TGF- $\beta$ , y la proteína inflamatoria de macrófagos-1a (MIP-1a), cuya concentración incrementa a nivel cerebral en los sujetos con EA (Sastre, Klockgether, & Heneka, 2006), lo que a su vez conlleva a que la microglía activada aumente la amiloidosis cerebral (Shadfar et al., 2015) y la taupatía, puesto que una elevada neuroinflamación en contraste con una baja fagocitosis favorece la formación de ovillos de p-tau, según lo sugieren los estudios realizados en modelos animales (Jaworski et al., 2011; Sy et al., 2011; Yoshiyama et al., 2007)

Comprender los mecanismos subyacentes mediante los cuales las diferentes células inmunes cambian su comportamiento entre diversos fenotipos, puede contribuir a encontrar una manera de tratar las enfermedades neurodegenerativas tales como la EA. Múltiples evidencias soportan el papel de la regulación de la transcripción en la iniciación y progresión de la EA (X.-F. Chen et al., 2013; Twine

et al., 2011). Con un conocimiento más profundo de los cambios en el perfil de expresión génica, fármacos recíprocos se podrían desarrollar para revertir los cambios en la transcripción y aliviar los síntomas de EA. Así mismo, las técnicas de diagnóstico basadas en los cambios en la expresión génica tienen el potencial de detectar el inicio de la EA antes de que sea histológicamente evidente, permitiendo un tratamiento precoz para prevenir el inicio de la enfermedad y una eficacia duradera después de la interrupción del tratamiento.

## **2.2. Análisis de transcriptoma y genotipificación de polimorfismos en EA**

El transcriptoma refleja la actividad celular dentro de un tejido en determinada escala de tiempo. Los estudios de expresión del genoma, no se ven influenciados por supuestos deductivos, y por lo tanto, proporcionan una aproximación imparcial para la investigación de la patogénesis de enfermedades complejas como las neurodegenerativas (Twine et al., 2011), la EA es un excelente ejemplo de cómo los avances tecnológicos han facilitado la evolución de la comprensión de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas (Jay, von Saucken, & Landreth, 2017). Los primeros análisis de expresión génica en EA fueron abordados desde la técnica de los microarreglos sin embargo, esta metodología ha producido resultados conflictivos (Twine et al., 2011), entre otras cosas, debido a que la interpretación de datos es a menudo obstaculizada por un bajo poder estadístico, altos índice de falsos positivos o falsos negativos, y por la relevancia incierta de las inferencias funcionales.(Blalock et al., 2004), Sin embargo, estas primeras aproximaciones permitieron identificar mutaciones familiares en los genes que codifican para las proteínas relacionadas con la producción de A $\beta$ , APP, presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) vinculadas con el desarrollo de EA de inicio temprano (antes de los 65 años de edad), así como la variante de riesgo para EA de inicio tardío (después de los 65 años de edad) apolipoproteína E- alelo  $\epsilon$ 4 (APOE  $\epsilon$ 4) (X.-F. Chen et al., 2013; R. Guerreiro & Hardy, 2014).

Más recientemente, se han desarrollado técnicas de secuenciación de última generación (*next generation sequencing*) las cuales posibilitan una aproximación

potente a los análisis de expresión de genes a partir de transcriptoma garantizando niveles de sensibilidad y especificidad suficientes (W. Li et al., 2015), por lo cual proporcionan información sobre los mecanismos de progresión de la neurodegeneración observada en la EA y han hecho posible la identificación de variantes raras, algunas de las cuales pueden conferir un mayor riesgo y, por lo tanto, puede proporcionar una importante visión de los genes con un rol biológico importante en la patología. El perfilado del transcriptoma mediante las tecnologías de secuenciación profunda ofrece una visión de las vías comúnmente alteradas sin tener en cuenta los factores genéticos o epigenéticos, y por lo tanto, representa una herramienta ideal para investigar los mecanismos moleculares relacionados con la fisiopatología de la EA (Martiskainen et al., 2015)

Por otra parte, los SNP presentes en diversos genes han sido implicados en la patogénesis de la EA, por lo que, múltiples esfuerzos se han realizado con el fin de desarrollar técnicas que posibiliten la fenotipificación y genotipificación de dichos genes. De los cientos de técnicas existentes para genotipificar SNP la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) ha sido una de las predilectas en los estudios de asociación clínica (Koch et al., 2002). Esta tecnología fusiona la química de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de moléculas reporteras fluorescentes (ensayos TaqMan) con el fin de supervisar la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR (Navarro et al., 2015). El genotipado con la técnica TaqMan es relativamente simple y requiere poco tiempo; además, dada la poca manipulación de reactivos, la posibilidad de mezcla de la muestra o de contaminación es muy reducida y los resultados en comparación con otras técnicas de genotipificación son equiparables (Koch et al., 2002)

Es así como la aplicación de técnicas moleculares modernas ha propiciado la identificación de variaciones en la expresión y en la secuencia de nucleótidos de diversos genes como factores de riesgo potenciales para la EA. Un acontecimiento neuropatológico clave en la enfermedad de Alzheimer es la acumulación del péptido A $\beta$ . La producción y la eliminación de A $\beta$  en el cerebro están reguladas por un gran

número de genes. Los niveles de expresión de estos genes deben ser ajustados en el cerebro para mantener el A $\beta$  en una cantidad equilibrada en condiciones fisiológicas. Se ha encontrado que la mala regulación de los genes que equilibran esta sustancia, así como la presencia de polimorfismos genéticos incrementa el riesgo de EA o acelera su progresión (X.-F. Chen et al., 2013). A continuación se presenta el estado actual de los estudios de expresión diferencial y genotipificación de SNP de los principales genes identificados en esta tesis con potencial riesgo para la EA en la muestra estudiada.

### **2.2.1. APOE en la EA**

La apolipoproteína E (APOE) es un portador importante de colesterol en el cerebro cuya función es entregar lípidos a las neuronas y participar en procesos de reparación (C.-C. Liu, Kanekiyo, Xu, & Bu, 2013). El gen de la APOE humana existe como tres alelos polimórficos:  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4 que generan tres isoformas diferentes de la proteína (C.-C. Liu et al., 2013), que difieren entre sí solo por un aminoácido sustituido en las posiciones 112 y 158 de manera que las isoformas de APOE se definen a partir de los haplotipos de los polimorfismos rs429358 (C/T +3937) y rs7412 (C/T +4075) gracias a estas sutiles diferencias en la secuencia existen diferencias significativas en los niveles de expresión, lo que sugiere que la progresión de neurodegeneración en la EA es debida a procesos de *splicing* alternativo y al uso del promotor del gen APOE (Twine et al., 2011). Además la presencia de polimorfismos en el locus  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4 ha sido también asociado como factor de riesgo para la EA, aunque los resultados han sido hasta ahora controversiales. Así mismo, las variaciones puntuales en la secuencia del promotor proximal del APOE conduce a cambios en su nivel de expresión alterando la transcripción de genes. Varios polimorfismos han sido identificados y su asociación con el riesgo de EA ha sido investigada, incluyendo rs449647 (A/T -491), rs769446 (C/T -427), rs405509 (G/T -219) los cuales, se estima afectan la actividad transcripcional del gen APOE mediante la alteración del sitio de unión de los factores de transcripción (Bizzarro et al., 2009; Laws, Hone, Gandy, & Martins, 2003).

### **2.2.2. TOMM40 en la EA**

El gen TOMM40 codifica para la subunidad que forma el canal del complejo de la traslocasa de la membrana externa mitocondrial, este complejo importa proteínas precursoras en las mitocondrias (Humphries et al., 2005), y la disfunción de esta vía biológica puede desempeñar un papel en el deterioro cognitivo y la patología de la EA lo que se conoce como "hipótesis de la cascada mitocondrial" (Swerdlow & Khan, 2004)). Las proteínas APOE y TOMM40 pueden interactuar para afectar la dinámica mitocondrial aunque los mecanismos precisos que subyacen en esto no están claros (Ferencz, Karlsson, & Kalpouzou, 2012; R. J. Guerreiro & Hardy, 2012; Lyall et al., 2013)

Estudios de expresión diferencial tanto en muestras de tejido cerebral como en sangre periférica han identificado subexpresión de TOMM40 en sujetos con EA (T.-S. Lee et al., 2012; Manczak, Calkins, & Reddy, 2011) que además empeora con el tiempo (Goh et al., 2015), esta subexpresión induce estrés celular, disfunción endotelial vascular, hipoxia, privación de glucosa y disfunción mitocondrial, y todos estos fenómenos contribuyen a la neurodegeneración en la EA (Caselli et al., 2012). También la presencia de polimorfismos en TOMM40 ha sido asociada al riesgo de desarrollar la patología, entre otros, varias investigaciones sugieren que el polimorfismo rs2075650 se asocia significativamente con un mayor riesgo de desarrollar la EA en población europea (Bagnoli et al., 2013) y en población coreana (Chung et al., 2014; Chung et al., 2013) mientras que en sujetos de China no se han encontrado asociaciones de riesgo significativas (He et al., 2016). Existe además, un reporte de asociación de este mismo SNP en población colombiana, donde los investigadores lo identificaron como factor de riesgo para la EA (Ortega-Rojas et al., 2016).

### **2.2.3. TNF- $\alpha$ en la EA**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una importante citoquina pro-inflamatoria, desempeña un papel en la regulación de la diferenciación, la proliferación y la muerte celular, así como en la inflamación, las respuestas innatas

y adaptativas inmunes, y también está implicada en una amplia variedad de enfermedades humanas incluyendo la EA (Qidwai & Khan, 2011). Múltiples estudios de expresión diferencial han evidenciado que el gen del TNF- $\alpha$  se encuentra sobre-expresado en sujetos con EA (R. T. Perry, Collins, Wiener, Acton, & Go, 2001) y se presume que, en gran medida la presencia de variaciones en la secuencia de ADN de la región reguladora del gen TNF- $\alpha$  podría interferir con la transcripción, influyendo en el nivel circulante de la proteína codificada por este y aumentando así la susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas (Qidwai & Khan, 2011) a pesar de ello, los estudios de asociación entre la EA y la presencia de SNP en el gen TNF- $\alpha$  no han sido concluyentes. Dentro de los SNP que se han asociado a la EA se encuentra -238, -308 (rs1800629), -850, -863 (rs1800630), -1031 y -857 (rs1799724).

Podría considerarse que El SNP rs1800629 ha sido uno de los mejor caracterizados en la EA, este se sugiere como un factor que incrementa el riesgo de la patología en población china, mientras que su comportamiento en población europea es protector, (T. Wang, 2015) (Lianhong Yang, Lu, Jiang, Liu, & Peng, 2009) en contra posición, hay estudios que no reportan ninguna asociación significativa para este SNP con la EA, lo mismo que para los SNP rs1800630, -238 y -1031 (Di Bona et al., 2009) lo que sí es consistente en los estudios que reportan al rs1800629 como factor de riesgo es que su comportamiento se ve influenciado por la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de APOE, ya que en concomitancia con este último el riesgo que representa el rs1800629 es significativamente mayor que cuando se presenta individualmente (Qidwai & Khan, 2011).

Tanto la sobre expresión de TNF- $\alpha$  como la presencia de SNP, especialmente el rs1800630 contribuyen a la producción de NO, por lo que este gen estaría involucrado en el deterioro neurológico de la EA por medio de la vía del NO (Belkhef et al., 2014) implicada en los procesos de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

#### **2.2.4. IL-17 en la EA**

La neuroinflamación especialmente mediada por la inmunidad innata ha sido ampliamente reportada como mecanismo patogénico en la EA; sin embargo, el rol de la inmunidad celular adquirida, como la mediada por los linfocitos T ayudadores (Th17) ha sido menos estudiada. Los Th17 son células altamente pro inflamatorias e inducen una respuesta inmune elevada a través de la producción de citocinas pro inflamatorias como la familia IL-17, IL-21 e IL-22, cuyos niveles se han encontrado sobre expresados en el hipocampo y su concentración se ha hallado elevada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y el plasma de pacientes con EA (Zhang, Ke, Liu, Qiu, & Peng, 2013)

Una plétora de estudios soporta el rol patogénico de la IL-17 en diferentes enfermedades autoinmunes e inflamatorias, la elevación de IL-17 en el cerebro y el LCR representa una activación de la respuesta inflamatoria mediada por Th17 en el sistema nervioso central (SNC), mientras que el aumento de IL-17 en el plasma refleja también una activación de la respuesta Th17 en los tejidos periféricos (Zheng, Zhou, & Wang, 2016). Se ha reportado además, que las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (BHE), expresan receptores para la IL-17 y la IL-22 en múltiples enfermedades inflamatorias y que la unión a estos receptores altera las uniones estrechas de la BHE lo que cambia su permeabilidad y facilita la infiltración de Th17 hacia el cerebro (Kebir et al., 2007), este mecanismo lleva además, a una lesión directa de las neuronas por los Th17 a través de la vía Fas/FasL. Esta respuesta inflamatoria tanto en el SNC como en los tejidos periféricos juega un rol sinérgico en la promoción de la neuroinflamación y la neurodegeneración presentes en la EA (Zhang et al., 2013), estudios en modelos animales han reportado que la sobreexpresión del gen que codifica para IL-17A, uno de los miembros de la familia IL-17, incrementa la respuesta inflamatoria en el SNC lo que promueve la neuroinflamación y neurodegeneración en la EA al facilitar la movilización de células inmunes periféricas al cerebro, las cuales a su vez producirán más IL-17A, perpetuando así este mecanismo inflamatorio (Zhang et al., 2013). Contrario a los hallazgos tradicionales, un estudio reciente en ratas indicó que la sobre-expresión

de IL-17A parece ser beneficiosa puesto que incrementa la activación microglial pero reduce la cantidad de A $\beta$  (J. Yang, Kou, Lalonde, & Fukuchi, 2017), debido a que mejora el anabolismo de glucosa mediado por insulina, lo que puede conducir a alteraciones de la expresión o modificación postraduccionales de los componentes tradicionales de la patogenia en la EA como p-tau, A $\beta$  y otros (Morales-Corraliza et al., 2016).

### **2.2.5. IFN en la EA**

La familia Interferón (IFN) constituye un amplio número de citoquinas que se subdividen en tres grupos de acuerdo a su receptor correspondiente: IFN tipo I (IFN-1), presenta 14 subtipos, de estos los más estudiados han sido el IFN alfa y el IFN beta; IFN tipo II (IFN-2) cuyo único integrante es el IFN gamma; y el recién descubierto tipo III (IFN-3) que contiene tres subtipos de IFN delta (De Weerd et al., 2013)

Los IFN-1 son un conjunto de citoquinas pleiotrópicas que controlan la secreción de citoquinas proinflamatorias y que son los reguladores maestros de la respuesta inmune innata relacionada con los desórdenes del sistema nervioso central (Taylor et al., 2014). Sus funciones pleiotrópicas están relacionadas con una amplia variedad de funciones inmunomoduladoras relacionadas con los procesos inflamatorios (De Weerd et al., 2013), poseen propiedades pro inflamatorias a través de la activación de diferentes vías de señalización. De estas, la vía clásica de las janus quinasa (JAK) y la vía transductora de señales y activadora de transcripción (STAT) son las más críticas y bien definidas (Platanias, 2005)

La señalización del IFN-1 ocurre a través de su receptor correspondiente, el receptor de IFN alfa/beta (IFNAR) (De Weerd & Nguyen, 2012). El IFNAR está compuesto de dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Debido a su falta de actividad quinasa intrínseca, estas subunidades reclutan JAK para inducir una cascada de fosforilación, estas son tirosina quinasa 2 (Tyk-2) y janus quinasa 1 (Jak-1) para IFNAR1 e IFNAR2 respectivamente (J. Chen, Baig, & Fish, 2004). Tyk-2 y Jak-1 actúan como sitios de acoplamiento para la fosforilación de una serie de STAT, que tras la fosforilación se translocan al núcleo, dando como resultado la transcripción

de genes pro-inflamatorios regulados por interferón (IRG) (Platanias, 2005). Varios factores regulados por interferón (IRF), también son capaces de unirse al complejo STAT antes de la translocación nuclear, de estos el más importante es IRF7, un factor crucial en la producción autocrina y en la exacerbación de la respuesta de IFN-1 (Honda, Yanai, Negishi, & Asagiri, 2005). La señalización del IFN-1 es de naturaleza flexible, con más de 2000 interacciones ligando-receptor activadas o reprimidas (Schreiber & Piehler, 2015). Es importante mencionar además, que el IFN- $\beta$  es capaz de inducir a JAK-STAT de forma independiente a la subunidad IFNAR2, a través de la interacción aislada con IFNAR1. De hecho aún queda mucho por estudiar con respecto a los diversos resultados biológicos de la señalización del IFN-1 (De Weerd et al., 2013).

Recientemente la vía Tyk2-STAT ha sido relacionada en la neurotoxicidad mediada por la proteína A $\beta$ 1-42, diversos estudios han demostrado que la fosforilación de Tyk2-STAT se encuentra elevada en la corteza y en el hipocampo de animales transgénicos APP/PS1. La reducción en la expresión o la activación de STAT3 atenúa considerablemente la apoptosis inducida por A $\beta$ , sugiriendo que la activación de STAT3 contribuye a la muerte neuronal después de la exposición a A $\beta$ . Este aumento en la fosforilación de Tik2-STAT también ha sido observado en cerebros postmortem de pacientes con EA (Wan et al., 2010). Además, se ha encontrado que la supresión de la cascada de señalización mediada por IFN-1 conlleva a una disminución en la apoptosis neuronal y en la neurotoxicidad mediada por A $\beta$  (Taylor et al., 2014). Considerando entonces el potencial de los IFN-1 de desencadenar estos eventos de fosforilación, se evidencia su rol prominente en la mediación de los mecanismos neuro-inflamatorios en la EA.

### **2.2.6. Otros genes en la EA**

Dado que la EA es una patología multifactorial y heterogénea, múltiples estudios han reportado un amplio número de genes como factores de riesgo potenciales para el desarrollo de la EA, tanto por la alteración en sus niveles de expresión como por la presencia de polimorfismos genéticos, entre otros se incluyen

varias quimiocinas como IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  y  $\alpha$ 1- anti quimotripsina (Holmes & Butchart, 2011), el receptor de células mieloides tipo 2 (TREM2), clusterina (CLU), receptor 1 del complemento (CR1), proteína de ensamblaje de unión de clatrina a fosfatidilinositol (PICALM), el receptor de sortilina (SORL1) y el clúster de diferenciación (CD33) (Bagyinszky et al., 2014). Así mismo, estudios prospectivos de casos y controles demuestran la existencia de niveles séricos elevados de proteínas inflamatorias de fase aguda y de citoquinas, encontrándose asociaciones entre EA y muchos biomarcadores inflamatorios, incluyendo las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , y TGF- $\beta$ , y la proteína C reactiva (Eriksson et al., 2011; Koyama et al., 2012; V. H. Perry, Cunningham, & Holmes, 2007; V. H. Perry, Nicoll, & Holmes, 2010) Sin embargo, estas asociaciones muchas veces son inconsistentes entre los estudios, pero es claro que las moléculas inflamatorias parecen comportarse como un factor de riesgo o protección genético para EA. Además, la hipótesis inflamatoria, es soportada por estudios epidemiológicos que demuestran la menor incidencia de EA en pacientes que usan medicamentos antiinflamatorios comparados con los que no (Eikelenboom et al., 2010; Heneka, O'Banion, Terwel, & Kummer, 2010; In'T Veld et al., 2001)

### **2.3. Vías de señalización en la EA**

Tanto las diferencias en los niveles de expresión como las variaciones puntuales en la secuencia del ADN de los genes asociados a la EA tiene efecto sobre la presentación de fenotipos, entre otros, mediante la alteración de vías de señalización importantes dentro de los procesos inflamatorios en el sistema nervioso. Aunque cientos han sido las vías de señalización asociadas a la EA, a continuación se hace referencia únicamente a las principales vías que se identificaron alteradas en esta investigación.

#### **2.3.1. Vía de señalización JAK/STAT**

La vía de señalización de proteínas Janus quinasa y los activadores de transcripción stat (JAK/STAT) hace parte de las cascadas peiotrópicas utilizadas

para transducir una multitud de señales para el desarrollo y la homeostasis. La vía JAK / STAT es el principal mecanismo de señalización para una amplia gama de citoquinas y factores de crecimiento. Después de la unión de las citoquinas a su receptor cognato, los STAT son activados por los miembros de la familia de tirosin quinasas JAK. Una vez activados, dimerizan y translocan al núcleo y modulan la expresión de genes diana (ver Ilustración 2). Además de la activación de STAT, las proteínas JAK median el reclutamiento de otras moléculas tales como las MAP-quinasas (MAPK) , la fosfoinositol quinasa 3 (PIK3), entre otras que activan la transcripción de factores adicionales. (Kanehisa, Furumichi, Tanabe, Sato, & Morishima, 2017).

Se ha documentado que la vía de transducción utilizada por muchas citoquinas para llevar a cabo su función se da principalmente por la vía de señalización JAK/STAT, es por esto que esta se involucra en diferentes procesos neurodegenerativos; específicamente en la EA se ha comprobado experimentalmente que la sobre-activación de esta vía contribuye, al incremento de la hiperfosforilación de la proteína tau que lleva a la formación de NFT (Orellana, Quintanilla, Gonzalez-Billault, & Maccioni, 2005; Quintanilla, Orellana, González-Billault, & Maccioni, 2004). El efecto de la vía JAK/STAT sobre la neurodegeneración en la EA es, además, dependiente del gen para el cual esta vía active la transcripción, por ejemplo, en el caso de activar factores de transcripción de los genes que responden a INF- $\gamma$  la mayor producción de esta citoquina inducirá la activación de astrocitos causando la generación de productos neurotóxicos como NO y ROS (Hashioka, Klegeris, Schwab, & McGeer, 2009), mientras que cuando JAK/STAT se activa para participar en la transcripción de IL-3 contribuye a la neuroprotección ya que la IL-3 previene la muerte celular por acumulación de A $\beta$  (Zambrano, Otth, B Maccioni, & I Concha, 2010).

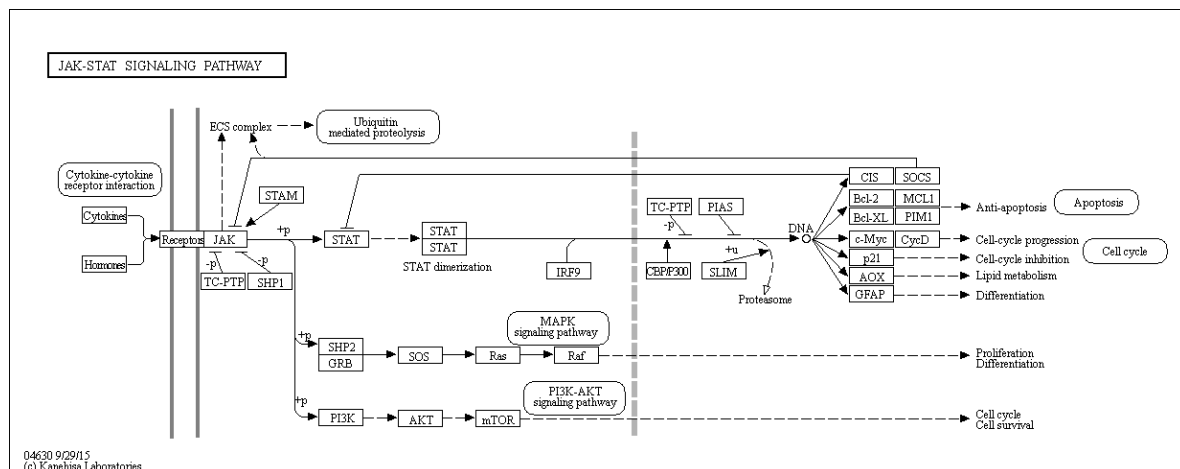


Ilustración 2. Vía de Señalización Jak/STAT. Fuente (Kanehisa et al., 2017)

### 2.3.2. Vía de señalización de las Quimiocinas

Las quimiocinas son pequeños péptidos quimio atrayentes que proporcionan señales direccionales para el tráfico de células de sistema inmune, y por lo tanto son vitales para la respuesta protectora del organismo. Además, las quimiocinas regulan la plétora de procesos biológicos de las células hematopoyéticas para conducir la activación celular, la diferenciación y la supervivencia. La señal de las quimiocinas es transducida por receptores de quimiocinas (receptores acoplados a proteína G) expresados en las células inmunitarias. Después de la activación del receptor, las subunidades alfa y beta-gamma de la proteína G se disocian para activar diversas vías descendentes dando como resultado la polarización celular y la reorganización de la actina. Varias GTPasas están involucradas en este proceso. La inducción de NO y la producción ROS están reguladas también por la señal de quimiocinas mediante la movilización de calcio y la producción de diacilglicerol (ver Ilustración 3) (Kanehisa et al., 2017).

Las citoquinas juegan un papel clave en los procesos inflamatorios y anti-inflamatorios en la EA. Un factor importante en el inicio del proceso inflamatorio es la sobreexpresión de la IL-1, que produce muchas reacciones en un círculo vicioso que causan disfunción y muerte neuronal. Otras citoquinas importantes en la neuroinflamación son la IL-6 y el TNF- $\alpha$ . Por el contrario, otras citoquinas tales como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-4, IL-10 y el TGF- $\beta$  puede suprimir

tanto la producción de citoquinas proinflamatorias como su acción, protegiendo el cerebro (Rubio-Perez & Morillas-Ruiz, 2012)

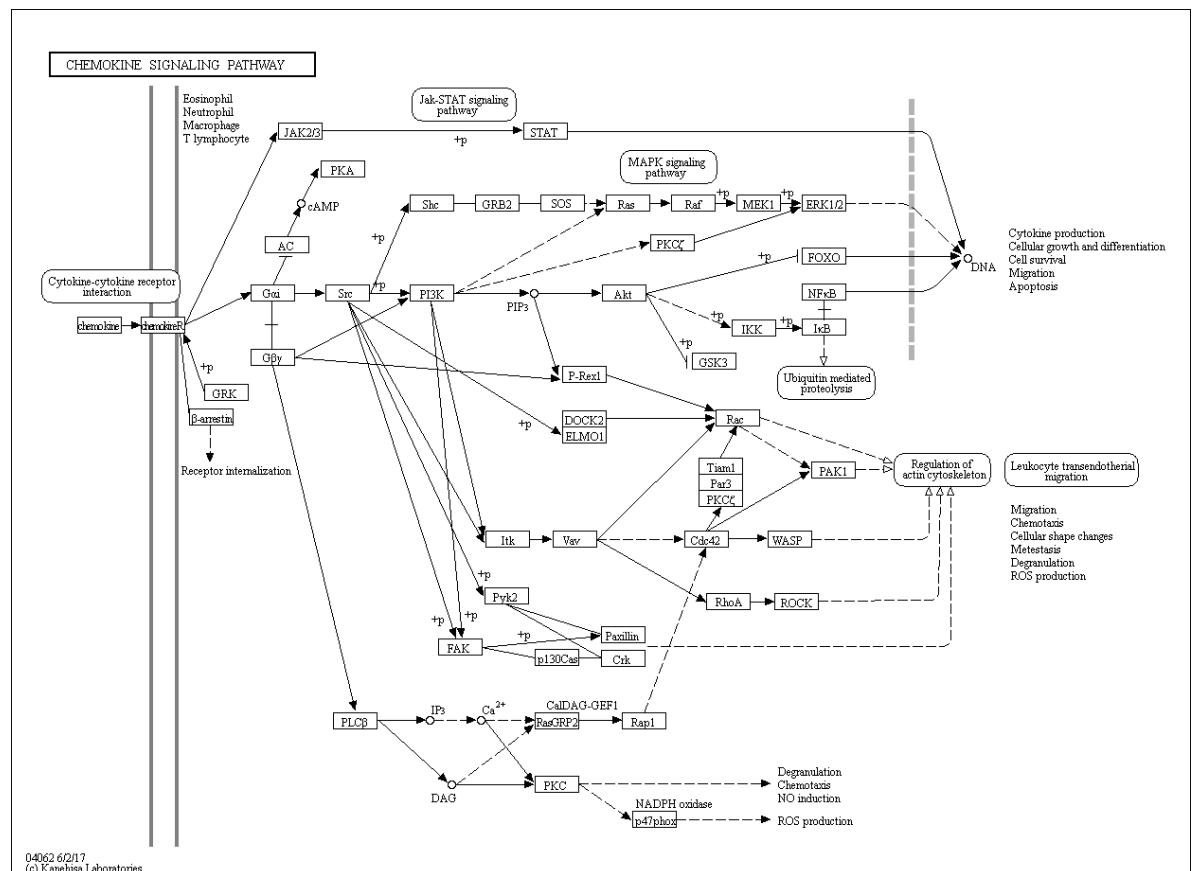


Ilustración 3. Vía de Señalización de las Quimiocinas. Fuente (Kanehisa et al., 2017)

### 2.3.3. Vía de señalización de la EA

La EA es un desorden crónico que destruye lentamente las neuronas y causa incapacidad cognoscitiva seria. La EA como se mencionó anteriormente, se asocia macroscópicamente a la aparición de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, que tienen varios efectos patológicos sobre la función de las células en el cerebro. Los oligómeros extracelulares de Aβ pueden activar caspasas a través de la activación de receptores de muerte en la superficie celular. Alternativamente, la Aβ intracelular puede contribuir a la patología facilitando la hiperfosforilación de tau, interrumpiendo la función mitocondrial y desencadenando disfunción de calcio. Hasta la fecha, los

estudios genéticos han puesto de manifiesto cuatro genes que pueden estar vinculados a un trastorno autosómico dominante o familiar temprano. Estos cuatro genes incluyen: APP, PSEN1, PSEN2 y APOE (ver Ilustración 4) Todas las mutaciones asociadas con las proteínas APP y las presenilinas pueden conducir a un aumento en la producción de péptido A $\beta$ , específicamente la forma más amiloidogénica, beta- amiloide 42 (A $\beta$ -42) (Kanehisa et al., 2017)

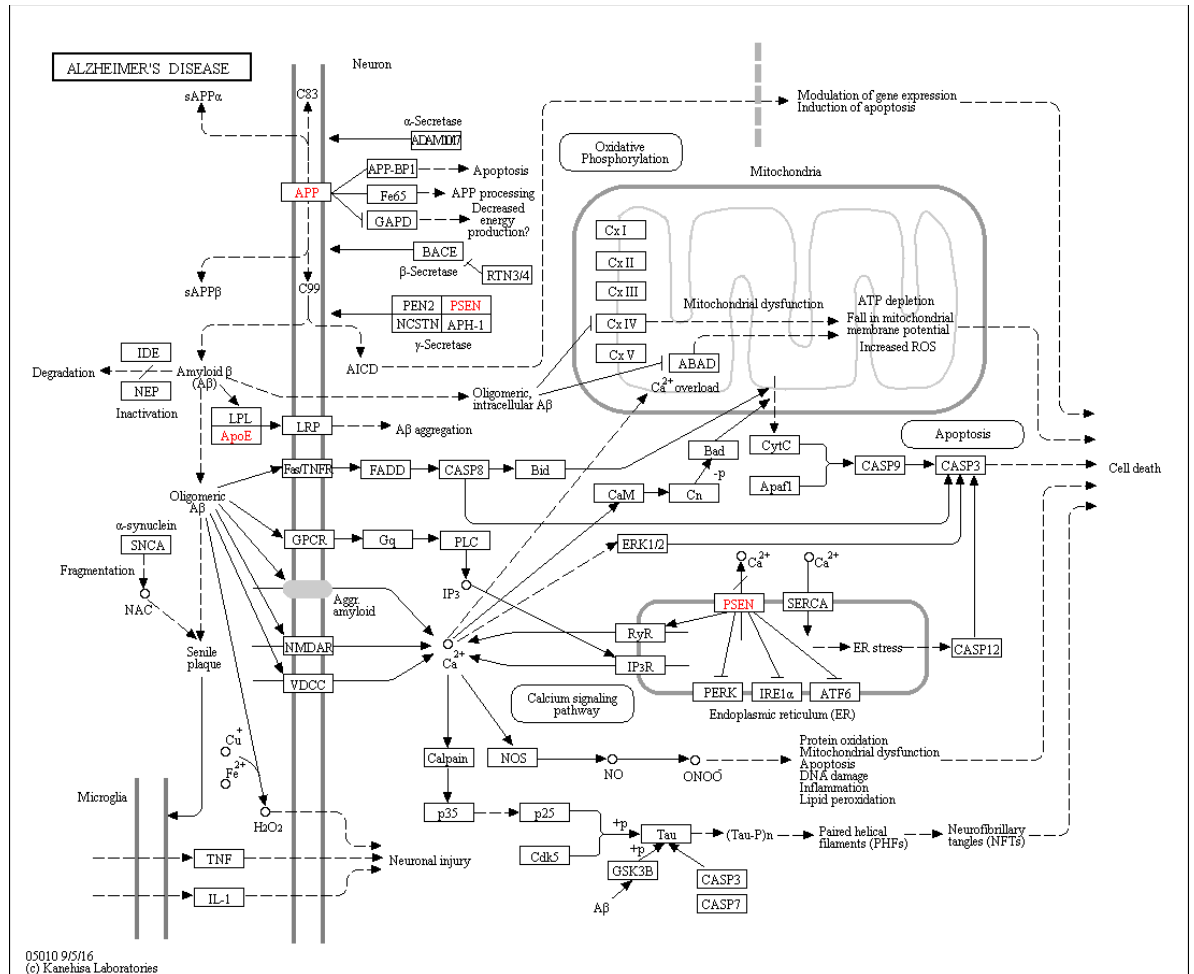


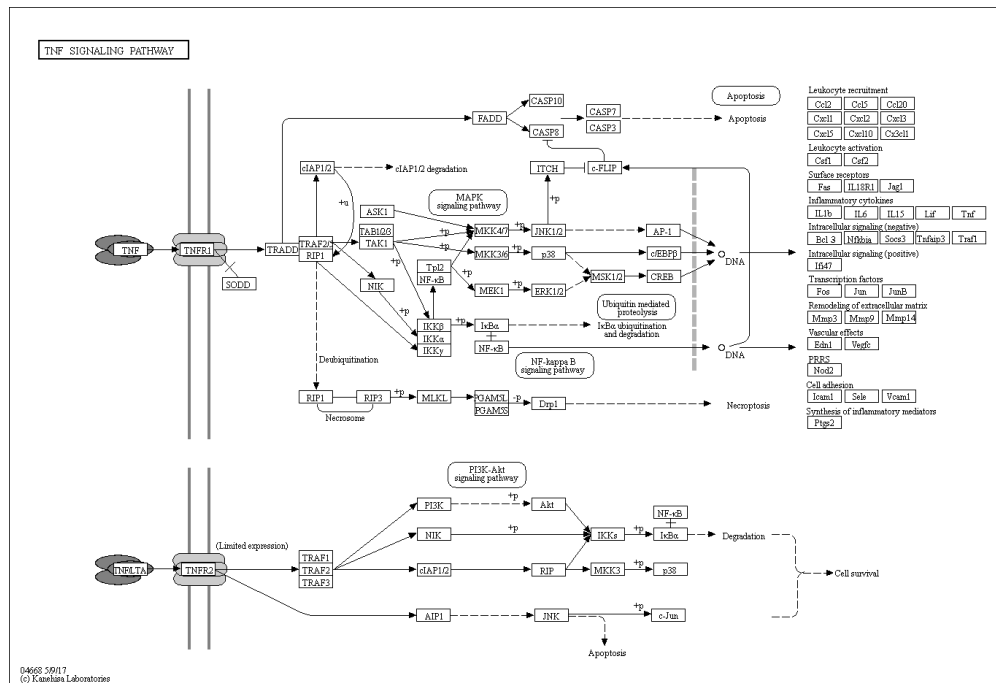
Ilustración 4. Vía de Señalización de la Enfermedad de Alzheimer. En rojo se señalan los genes característicos de la EA de tipo hereditario. Fuente (Kanehisa et al., 2017)

### 2.3.4. Vía de señalización del TNF

El TNF puede inducir una amplia gama de vías de señalización intracelular, incluyendo la apoptosis y la supervivencia celular, así como la inflamación y la inmunidad. El TNF activado se ensambla a un homotrímero

y se une a sus receptores (TNFR1, TNFR2) dando como resultado la trimerización de TNFR1 o TNFR2. El TNFR1 se expresa en casi todas las células y es el principal receptor del TNF- $\alpha$ . Por el contrario, el TNFR2 se expresa en células limitadas tales como linfocitos T CD4+ y CD8+, células endoteliales, microglía, oligodendrocitos, algunos subtipos neuronales (neuronas hipocampales (Libang Yang, Lindholm, Konishi, Li, & Shen, 2002), neuronas de la corteza (McCoy & Tansey, 2008)), cardiomiocitos, timocitos y células madre mesenquimatosas humanas. Tras la unión del ligando, el receptor de TNF media la asociación de algunas proteínas adaptadoras tales como el receptor tipo 1 del factor de necrosis tumoral (TRADD) o el factor asociado al TNF- $\beta$  (TRAF2), que a su vez inician el reclutamiento de transductores de señal. La señalización del TNF- $\alpha$  induce la activación de muchos genes, controlados principalmente por dos vías distintas, la del NF- $\kappa$ B y la cascada de las MAPK. La señalización del TNF- $\beta$  activa la vía NF- $\kappa$ B dependiente de fosfoinositol trifosfato (PI3) y la vía Jun quinasa (JNK) que conduce a la supervivencia celular (ver Ilustración 5)(Kanehisa et al., 2017)

El TNF es un iniciador y regulador de la cascada pro-inflamatoria que junto con el IFN- $\gamma$  estimula la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 entre otros, en condiciones normales la vía del TNF permanece casi inactiva, pero en estados patológicos como la EA puede desencadenar dos tipos de respuesta: en presencia de IFN- $\gamma$  el TNF activa la producción de NO en los macrófagos, mientras que, en ausencia de IFN- $\gamma$  estimula a los macrófagos y la producción de factores de crecimiento (R. T. Perry et al., 2001)



**Ilustración 5. Vía de Señalización del Factor de Necrosis Tumoral. Fuente (Kanehisa et al., 2017)**

### 2.3.5. Vía de señalización de IL-17

La familia de la interleucina 17 (IL-17) es un subconjunto de seis citoquinas que van de la IL-17A a la IL-17F, juegan un papel crucial tanto en las respuestas inflamatorias agudas como crónicas. La IL-17A es característica del subconjunto de células T ayudadoras 17 (TH17), tiene papeles importantes en la protección frente a patógenos extracelulares, pero también promueve la patología inflamatoria en la enfermedad autoinmune, mientras que la IL-17F está principalmente implicada en los mecanismos de defensa de las mucosas; la IL-17E (también conocida como IL-25) es un amplificador de respuestas inmunes de linfocitos T ayudadores; la IL-17C tiene funciones biológicas similares a las de IL-17A mientras que las funciones de IL-17B e IL-17D permanecen en gran medida evasivas. La familia IL-17 hace señalización a través de sus receptores correspondientes y activa vías descendentes que incluyen los factores NF- $\kappa$ B, MAPK y la proteína de unión al enlace CCAAT beta (C/EBP) para inducir la expresión de péptidos antimicrobianos, citoquinas y quimiocinas (ver Ilustración 6). (Kanehisa et al., 2017).

Bajo los dos primeros mecanismos, la IL-17 participa en la cascada de señalización de otras citoquinas, como es el caso de la IL-6 en astrocitos primarios, la IL-17 tiene un efecto sinérgico con IL-6 para inducir la expresión de esta última de manera que estas células pueden servir como un blanco de células Th17 e IL-17 en el SNC a través de un mecanismo de realimentación positiva (Ma et al., 2010). Teniendo en cuenta que la IL-6 tiene actividad tanto inflamatoria como anti-inflamatoria, el efecto de la IL-17 sobre ésta es significativo a la hora de generarse una respuesta inmune inflamatoria.

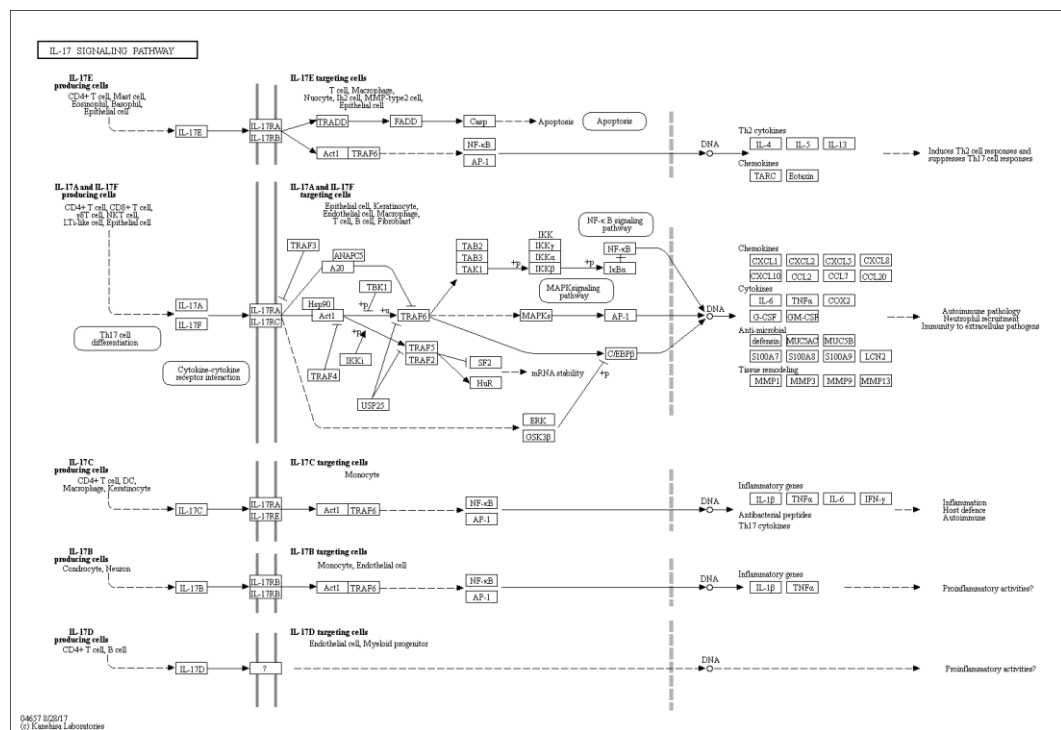


Ilustración 6. Vía de Señalización de la Interleucina 17. Fuente (Kanehisa et al., 2017)

### 2.3.6. Vía de señalización de MAPK

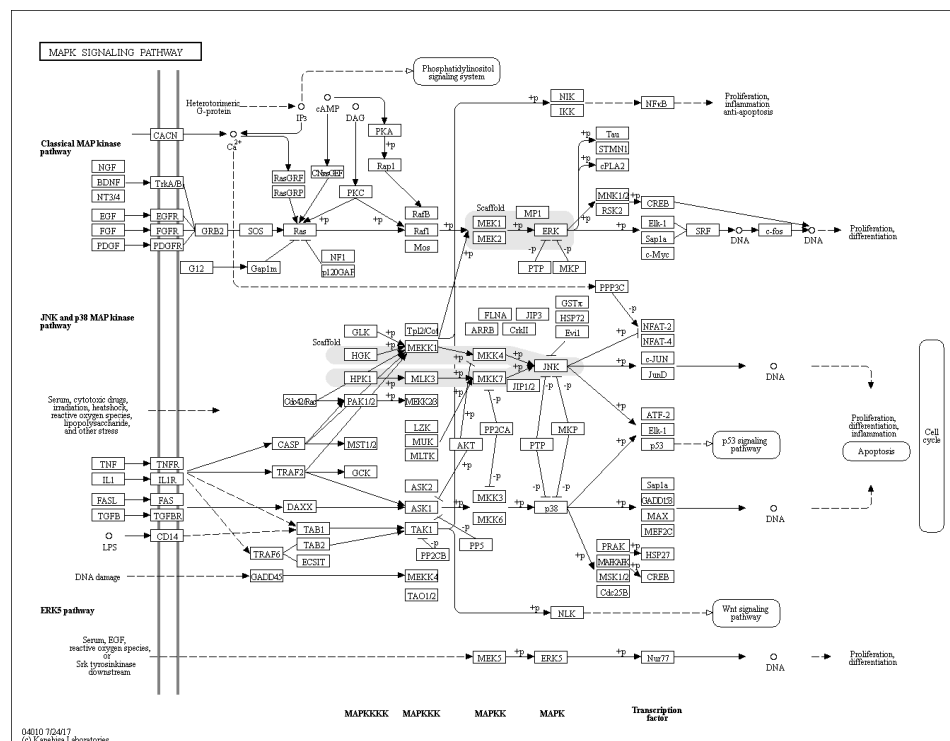
La familia proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) es un motivo altamente conservado que participa en varias funciones celulares, los mamíferos expresan al menos cuatro grupos regulados de MAPK (Kanehisa et al., 2017) que incluyen: las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK), las proteínas activadas por mitógeno p38 (p38-MAPK), las quinasas amino-terminales

c-Jun (JNK) y las quinasas activadas por MAPK quinasa (ERK5). Cada vía de señalización MAPK consta de al menos tres componentes, una MAPK quinasa quinasa (MAP3K), una MAPK quinasa (MAP2K o MEK), y una MAPK (ver Ilustración 7) Las vías MAPK son activadas por diversos estímulos extracelulares e intracelulares que incluyen factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y diversos factores de estrés celular tales como el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico. Estas vías de señalización regulan una variedad de actividades celulares incluyendo proliferación, diferenciación, supervivencia, muerte y migración celular. La desviación del estricto control de las vías de señalización MAPK ha sido implicada en el desarrollo de muchas enfermedades humanas, incluyendo la EA, la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y diversos tipos de cánceres. La activación persistente de las vías de señalización de JNK o p38-MAPK se ha sugerido para mediar la apoptosis neuronal en EA, EP y ELA, mientras que la vía de señalización de ERK desempeña un papel clave en varios pasos de carcinogénesis incluyendo proliferación, migración e invasión de células cancerígenas (E. K. Kim & Choi, 2010)

La muerte celular por apoptosis es un evento característico de las enfermedades neurodegenerativas incluyendo la EA. La vía de señalización de las MAPK, especialmente p38-MAPK y JNK, media la transducción de señales en la apoptosis y puede desempeñar un papel clave en la neurodegeneración (S. Wang et al., 2014). La evidencia acumulada indica que la vía p38-MAPK cumple varios roles en la fisiopatología de la EA, dentro de los eventos patológicos en los que participa se encuentran: la excitotoxicidad, la plasticidad sináptica y la fosforilación de proteína Tau (Munoz & Ammit, 2010). Algunos efectos de la activación microglial en las neuronas parecen estar afectados por la activación de proteínas p38-MAPK, debido a que la microglía activada estimula la fosforilación de la p38-MAPK en las neuronas, así mismo, la microglía activa sobre-expresa IL-1, citoquina que ha sido asociada a la formación de NFT, de manera que la microglía activada puede contribuir a la patología neurofibrilar en la EA a través de estos eventos y los cambios resultantes en los elementos sinápticos y del citoesqueleto (Y. Li, Liu,

Barger, & Griffin, 2003). Además, parece existir una fuerte correlación entre los niveles de p38-MAPK y JNK, el tiempo de evolución y la severidad de la EA (S. Wang et al., 2014) lo que sugiere que la alteración periférica de estas dos quinasas es más una consecuencia de un mecanismo de la enfermedad por parte del SNC en lugar de estar vinculados a mecanismos ocasionales. Estudios recientes también han indicado que la desregulación de p38MAPK y JNK está implicada en los déficit de memoria característicos de la EA, así mismo, modelos murinos reportan un rol similar en la memoria para la vía ERK, dado que, en presencia de taupatía y la acumulación de A $\beta$  se desencadena un incremento de la actividad citosólica de ERK el cual se puede revertir mediante la administración de un inhibidor de MEK, dando como resultado la recuperación significativa de la memoria a corto plazo (Feld et al., 2014)

La vía MAPK es importante en la producción de factores inflamatorios inducida por A $\beta$ , por lo cual es un objetivo molecular viable como blanco terapéutico para modificar los efectos de la EA y otros trastornos neurodegenerativos similares.



**Ilustración 7. Vía de Señalización de las quinasas Activadas por Mitogeno (MAPK). Fuente (Kanehisa et al., 2017)**

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Diseño experimental y obtención de la muestra**

La presente investigación estuvo enmarcada dentro de un enfoque empírico-analítico con un alcance descriptivo e inferencial, con información predominantemente cuantitativa. La población objetivo estuvo constituida por adultos mayores de 65 años con diagnóstico comprobado de EA a través de la clínica de memoria de la ciudad de Manizales; residentes en su mayoría de esta misma ciudad.

La selección de la muestra fue intencional y estuvo conformada por dos grupos de estudio: El grupo Caso constituido por 30 sujetos mayores de 65, de ambos sexos, con diagnóstico neurológico de EA comprobado por especialistas en clínica de memoria. Y el grupo Control conformado por 160 individuos sanos.

Los criterios de inclusión para los casos de EA fueron: edad igual o mayor de 65 años, firma del consentimiento informado para participar en el estudio por parte del sujeto y un acudiente y cumplir con los criterios de diagnóstico neurológico de enfermedad de Alzheimer comprobado por especialista en clínica de memoria. Con respecto a los controles, los criterios de inclusión fueron: ser mayor de 18 años, firma del consentimiento informado para participar en el estudio, ausencia de enfermedad con deterioro cognitivo, enfermedad psiquiátrica, hipertensión arterial (HTA) no controlada o enfermedad neurológica.

Los criterios de exclusión incluían la presencia de patología neurológica o psiquiátrica que explicara los cambios cognitivos o comportamentales del paciente, el abuso de sustancias psicoactivas y alcohol; la presencia de enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias sistémicas o condiciones médicas inestables. El consumo de corticosteroides sistémicos, por lo menos un mes antes de la toma de la muestra y la presencia de déficits auditivos o visuales severos.

Los participantes del estudio fueron sometidos a una entrevista de recogida de datos, durante la cual les fue aplicado el cuestionario sociodemográfico y de antecedentes patológicos y el mini- examen del estado mental (MMSE) (Folstein,

Folstein, & McHugh, 1975; Lasprilla & Rivera, 2015) y accedieron a firmar el consentimiento informado para participar en el estudio aprobado por el comité de ética de la UAM (Acta 047 de junio de 2015) (Anexo I). Además, les fue extraída una muestra de 5 ml de sangre periférica en tubos Vacutainer® con EDTA (Becton, Dickinson and company, EE.UU) siguiendo el protocolo para la toma de muestras de sangre del laboratorio clínico de la UAM de acuerdo a las normas de bioseguridad y lineamientos de la secretaría de salud de Manizales (Anexo II)

### **3.2. Pasos metodológicos para dar cumplimiento al primer objetivo específico: Establecer la prevalencia de los SNP en región promotora de los genes *TREM2*, *TOMM40*, *IL17*,*IL10*,*TNF* e *IL8* asociados a procesos inflamatorios en la EA, en la población de estudio.**

#### **3.2.1. Aislamiento y cuantificación de ADN**

El ADN genómico se extrajo a partir de 200 µl de sangre tratada con EDTA utilizando el kit QIAamp DNA mini (QIAGEN N.V, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se midió la concentración de ADN usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA), la integridad del ADN se calculó utilizando la relación 260/280 nm (Anexo III); luego, todas las muestras de ADN se almacenaron a -20 ° C hasta el análisis posterior.

#### **3.2.2. Genotipificación de polimorfismos**

La genotipificación de los polimorfismos asociados a los genes de interés *TREM2* (rs75932628), *TOMM40* (rs2075650), *IL-17A* (rs10484879, rs7747909, rs2275913), *IL-10* (rs1800896, rs1800872), *TNF* (rs1800610, rs1800629, rs1800630, rs1799724) e *IL-8* (rs4073) fue conducida mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (Navarro et al., 2015) utilizando TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el termociclador en tiempo real StepOnePlus Real -Time PCR System (Thermo

Fisher Scientific, EE.UU). Adicionalmente se genotipificaron los SNP del gen APOE: rs7412, rs429358, rs440446, dada su relación comprobada con la EA.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía 2 $\mu$ l de ADN genómico, 1X TaqMan Genotyping Master Mix y 1X Taqman SNP Genotyping Assay Mix. En cada PCR se utilizaron dos controles positivos y dos controles negativos para cada genotipo. Los experimentos se desarrollaron bajo las siguientes condiciones: un calentamiento inicial de 60°C durante 30 segundos, desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación que consistieron en fases de 15 segundos a 95°C seguidos de un minutos a 60 °C.

Posteriormente, la curva específica fluorescente para cada alelo y la discriminación alélica fueron visualizadas y analizadas mediante el software Allelic discrimination (Applied Biosystems, Foster City,. California, EE. UU).

### **3.2.3. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software en línea SNPStats (disponible en: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) . Se compararon las distribuciones de genotipos y alelos. También fueron evaluados los Odds ratios (OR) con intervalos de confianza del 95%, a los resultados les fue aplicada la corrección de Bonferroni y la significancia estadística se estableció en  $P < 0,05$ .

### **3.3. Pasos metodológicos para dar cumplimiento al segundo objetivo específico: determinar los perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA utilizando la secuenciación del transcriptoma humano.**

Para dar cumplimiento a este objetivo, se seleccionó una submuestra aleatoria de 15 sujetos de investigación (5 casos de EA y 10 controles) a los cuales se les realizó secuenciación del transcriptoma de un subconjunto de genes (RNA-seq) para identificar genes y procesos biológicos asociados a la EA.

Cabe aclarar que, los procedimientos de aislamiento y cuantificación de ARN y la preparación de librerías y secuenciación del amplicón se realizaron a través de contratación externa en el laboratorio Genetracer Biotech ubicado en la ciudad de Cantabria – España.

### **3.3.1. Aislamiento y cuantificación de ARN**

La extracción inicial de ARN total se realizó a partir de una muestra de sangre periférica, utilizando el Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Ref. 4380204, ThermoFisher Scientific, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, el ARN total obtenido fue cuantificado y valorado mediante el chip de microfluídica Agilent RNA 6000 Pico (referencia 5067-1513) en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo IV).

### **3.3.2. Preparación de las librerías y secuenciación del amplicón**

La secuenciación del transcriptoma se llevó a cabo utilizando el panel de genes Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) el cual permite la medición simultánea de la expresión de más de 20.000 genes humanos en un solo ensayo (Pietrzak et al., 2016). A partir de 40 ng de ARN se prepararon las librerías del AmpliSeq Transcriptome Kit v2 (referencia 4475936, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) en combinación con los códigos de barras Ion Xpress™ 01-16 Kit (4471250AB, Thermo Fisher Scientific, EE.UU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Consecutivamente, las librerías resultantes fueron cuantificadas con el Ion Library TaqMan™ Quantification Kit (Ref. 4468802, Thermo Fisher Scientific, EE.UU) en un volumen final de 10ul. El mix de reacción consistió en una cierta concentración de librería de cada muestra mezclada con las Ion Spheres Particles (ISPs) y el resto de reactivos requeridos para la PCR en emulsión. El enriquecimiento de las ISPs portadoras de librería y la posterior carga del chip se desarrolló en el sistema automatizado Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) empleando para ello el kit Ion PI™ Hi-Q™ Chef Kit (referencia A27198, Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y un Ion PI™ chips v3 (referencia

A26771, Thermo Fisher Scientific, EE.UU). Luego, el chip cargado con las ISPs de las 8 librerías en multiplex fue analizado en el secuenciador Ion Proton (referencia 4476610, Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y datos generados se analizaron inicialmente con el software específico de la plataforma Torrent Suite 5.0.2 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU) para generar la secuencia de las lecturas, eliminar los códigos de barras y las lecturas de señal baja. Con las lecturas resultantes (>80 millones de lecturas) se generaron los archivos FASTQ mediante el plugin FileExporter 4.6.0.0 (Thermo Fisher Scientific, EE.UU).

### **3.3.3. Análisis bioinformático de las secuencias**

Una vez obtenidos los datos de la secuenciación se desarrolló un pipeline bioinformático para el análisis de las secuencias AmpliSeq, el cual se planteó en cuatro fases 1) Fase de preprocesamiento, que consiste en un análisis y ajuste de calidad utilizando la herramienta SAMStat v 1.5. 2) Mapeo sobre la anotación de referencia UCSC Hg19 (TDB, 2014), mediante el Ion Torrent Mapping Alignment Program (TMAP) (Homer, 2011) 3) Estimación de abundancias con BEDTools v 2.26 mediante el llamado al comando multicov el cual informa el recuento de alineaciones de varios archivos BAM ordenados por posición e indexados que se superponen a intervalos en un archivo BED. Específicamente, para cada intervalo BED proporcionado, informa un recuento por separado de alineaciones superpuestas de cada archivo BAM.(Quinlan, 2014; Quinlan & Hall, 2010). 4) Análisis de expresión diferencial, a través del paquete DeSeq2 v.1.12.4 de R/Bioconductor (Anders & Huber, 2010; M. Love, Anders, & Huber, 2014; M. I. Love, Huber, & Anders, 2014).

Los procedimientos bioinformáticos para las tres primeras fases del pipeline se detallan en el Anexo V y los de la última fase, de análisis de expresión diferencial, se evidencian en el Anexo VI. A continuación se describe la metodología para cada una de las fases del pipeline.

#### **3.3.3.1. Análisis de calidad y pre procesamiento de los datos**

Se generó un reporte de calidad de los datos de secuenciación Ion AmpliSeq utilizando la herramienta SAMStat v1.5 (Lassmann, Hayashizaki, & Daub, 2010)

(Anexo V). Adicionalmente, las lecturas de Ion proton se mapearon sobre el genoma humano de referencia UCSC Hg19 (TDB, 2014), utilizando el programa Ion Torrent Mapping Alignment Program (TMAP) (Homer, 2011) del plugin AmpliSeqRNA, v4.2.1 integrado en el Torrent Suite Software (Life Technologies). Por la naturaleza de las lecturas AmpliSeq (lecturas a partir de amplicones únicos de 150 pb para cada gen), TMAP es el programa está optimizado para este tipo de datos e implementa un enfoque de mapeo en dos etapas, usando cuatro algoritmos de alineación: BWA-short y BWA-long, SSAHA, y Super-maximal Exact Matching (Pietrzak et al., 2016), seguido por el algoritmo Smith Waterman que se utiliza para encontrar el mejor mapeo final (Smith & Waterman, 1981).

A partir de los archivos de alineamiento .bam generados por el mapeo de lecturas, se utilizó el programa Bedtools para contar el número de lecturas obtenidas para los amplicones de cDNA, que representan cada uno de los genes incluidos en el panel AmpliSeq Human Gene Expression. Los recuentos resultantes representan los niveles de expresión génica para 20812 genes (Osman, Hitzler, Ameer, & Provost, 2015). Se obtuvo una matriz de conteos crudos de lecturas por gen, con la cual primero se evaluó el comportamiento de las muestras para identificar outliers y ruido, previo a los análisis de expresión diferencial.

Para esto, se aplicó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) con el fin de evaluar la similitud entre muestras, específicamente entre condiciones y entre réplicas. Adicionalmente, los conteos crudos fueron normalizados mediante una transformación logarítmica regularizada no supervisada (*rlog*) y luego se calcularon las distancias Euclidianas entre muestras, con el fin de evidenciar la similitud entre estas y verificar si el comportamiento se adaptaba a las expectativas del diseño experimental. Las distancias Euclidianas fueron calculadas a partir de los datos ajustados a un modelo Gaussiano, donde se asumió independencia entre las muestras y los genes (Witten, 2011). Por último, se implementó un análisis de componentes principales PCA para explicar la disimilitud entre muestras basado en la varianza (Holland, 2008)

### 3.3.3.2. *Exclusión de muestras atípicas*

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos mediante los análisis descritos anteriormente se identificaron muestras con comportamiento atípico, las cuales fueron excluidas en los análisis posteriores, bajo el criterio estadístico de la similitud dada por las métricas de distancia. Una vez reajustado el conjunto de muestras, se repitieron los análisis de MDS, similitud por distancia Euclidiana y PCA para validar la pertinencia de los ajustes realizados en relación a la naturaleza del estudio.

### 3.3.3.3. *Análisis de expresión de genes*

Los análisis de expresión diferencial para identificar los genes diferencialmente expresados (DEG) entre los casos con EA y los controles se realizaron a partir de la matriz de conteos crudos, usando la librería DeSeq2 v.1.12.4 de R/Bioconductor (Anders & Huber, 2010; M. Love et al., 2014; M. I. Love et al., 2014). El análisis con DESeq2 se realizó utilizando los parámetros estándar del programa (Anexo VI), filtrando genes con conteos menores a 1 para cualquiera de las muestras, lo cual redujo el conjunto de genes de 20812 a 15577. Además, se aplicó un criterio de mínimo tres réplicas por condición que soportaran un gen diferencialmente expresado. Para la estimación final de DEG significativos fueron calculados valores de significancia ajustados ( $p_{adj}$ ) y el procedimiento Benjamini - Hochberg fue aplicado para estimar la tasa de descubrimiento falso (FDR). Finalmente, los DEG significativos fueron seleccionados con base en umbrales del valor de significancia  $p_{adj} \leq 0.05$ ,  $FDR \leq 0.1$  y  $-0.5 \geq \log_2FC \geq 0.5$ .

### 3.3.4. **Análisis de enriquecimiento funcional de DEG**

Un análisis de enriquecimiento funcional basado en términos de ontología de genes fue efectuado sobre los ARN codificantes de proteínas que resultaron diferencialmente expresados de manera significativa entre los sujetos con EA y los controles, tomando como base los valores  $p_{adj}$  y  $\log_2FC$ . Para la identificación de categorías funcionales enriquecidas entre los DEG fue utilizada la herramienta en línea *go enrichment* del consorcio gene ontology (Ashburner et al., 2000; Consortium, 2015). El análisis fue efectuado para el subconjunto de genes sobre

expresados en el grupo casos respecto del grupo control, y posteriormente en el subconjunto de genes sub expresados. Los análisis de enriquecimiento fueron calculados para cada una de las ontologías disponibles: proceso biológico (BP), función molecular (MF) y componente celular (CC), contra la base de datos de gene ontology GO data set, se consideraron enriquecidos los términos para los cuales las pruebas estadísticas arrojaron un valor de significancia con ajuste Bonferroni menor al 0.05 (p-valor <0.05)

#### **3.4. Pasos metodológicos para dar cumplimiento al tercer objetivo específico: relacionar la expresión del transcriptoma de los sujetos de investigación con la presencia de SNP de región promotora de los genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en la EA.**

Dado que los genes reportados por el análisis de expresión diferencial no se correspondieron con los genes candidatos propuestos para la genotipificación de SNP, el abordaje para dar cumplimiento al tercer objetivo específico se centró en realizar un análisis de anotación funcional de los genes diferencialmente expresados y sus productos génicos e intentar establecer relaciones biológicas con los genes genotipificados mediante RT-PCR y los productos génicos de estos, para de esta forma intentar determinar el efecto de la presencia de los SNP candidatos sobre la expresión de los DEG.

Primero, los DEG fueron mapeados sobre vías de señalización y rutas metabólicas del humano, haciendo uso de la herramienta KEEG PATHWAY MAPPER (Kanehisa et al., 2017; Kanehisa & Goto, 2000) Ya que los hallazgos con esta herramienta fueron bastante amplios, se consideraron únicamente los hallazgos relacionados con procesos inmunes y/o inflamatorio, directamente relacionados con la EA o donde participaba alguno de los genes candidatos inicialmente propuestos para este trabajo. Posteriormente, fueron identificadas las redes de interacción proteína-proteína entre los productos de los DEG y los genes evaluados mediante RT-PCR por medio de la base de datos STRING (Jensen et al., 2008; Szklarczyk et al., 2014).

#### 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este estudio buscaba contribuir a la identificación de genes candidatos en la patogénesis molecular de la EA relacionados con procesos inflamatorios. Para cumplir con este fin, se llevó a cabo la secuenciación del transcriptoma de 5 sujetos diagnosticados con EA y 10 controles sanos residentes en la ciudad de Manizales, utilizando el panel Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression de Ion Torrent, compuesto por 20.812 genes. Posteriormente, se identificaron los genes diferencialmente expresados (DEG) con el paquete DeSeq2 de R/Bioconductor, sobre los cuales se realizaron análisis de enriquecimiento funcional por ontologías de genes (GO) y de vías metabólicas a través de KEGG. Adicionalmente, se analizaron redes de interacción proteína – proteína utilizando la base de datos STRING. A partir de los análisis se identificaron un total de 94 genes sobre expresados y 147 sub expresados en los casos de EA con respecto a los controles. Los genes sobre expresados se encontraron significativamente enriquecidos ( $p < 0,05$ ) en procesos biológicos asociados a vías de señalización de citoquinas de la familia interferón. Por su parte, los genes subexpresados presentaron enriquecimiento significativo ( $p < 0,05$ ) para los procesos asociados al ciclo celular. Dentro de las vías metabólicas, en las cuales se mapearon los DEG, son de resaltar las alteraciones en las vías de señalización de: JAK/STAT, de quimiocinas, factor de necrosis tumoral (TNF), la familia de interleucina 17 (IL-17), MAPK y la EA. El análisis de interacción proteína-proteína no mostró interacciones entre los productos de los DEG y los productos de los genes candidatos evaluados por RT-PCR.

Con respecto a la genotipificación de SNP en los genes candidatos de interés, los SNP rs7747909 y 10484879 de IL-17A, rs1000610 del TNF- $\alpha$  y rs2075650 de TOMM40 fueron identificados como factor de riesgo para la EA. Así mismo fueron identificados dos haplotipos: un haplotipo de riesgo para el gen IL-17 en la combinación “TAA” para los alelos de rs10484879, rs7747909 y rs2275913, respectivamente. También se identificó un haplotipo protector para el gen TNF- $\alpha$  en

la combinación “GCCG” para los alelos de rs1799724, rs1800610, rs1800629 y rs1800630, respectivamente.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos específicos planteados.

#### **4.1. Prevalencia de los SNP en región promotora de los genes *TREM2*, *TOMM40*, *IL17*, *IL10*, *TNF*, *IL8* y *APOE* asociados a procesos inflamatorios en la EA**

En el presente estudio fueron genotificados 15 SNP incluidos en 7 genes de interés: *TOMM40*, *IL-17*, *IL-10*, *TNF*, *IL8* y *APOE*, en sujetos con EA y controles sanos. La distribución de los alelos y los genotipos de los 15 SNP evaluados puede ser consultada en el Anexo VII, a continuación en la Tabla 1 se presenta la distribución de genotipos únicamente para aquellos SNP que resultaron asociados significativamente como factor de riesgo para la EA.

Se encontró tendencia a la asociación con EA en 5 de los 15 SNP evaluados, que correspondieron a los polimorfismos rs1800610 del gen *TNF- $\alpha$*  (OR:15.44, IC:2.03-117.4, P:0,0005), rs10484879 (OR:4.24, IC:1.77-10.11, P:0.0001) y rs7747909 (OR:4.86, IC:1.61-14.67, P:0,0016) ambos del gen *IL-17*; el rs429358 (OR:3.72 IC:1.47-9.40, P:0.0065) del gen *APOE* y finalmente el rs2075650 (OR:2.38, IC:1.04-5.45, P:0.0309) del gen *TOMM40*.

De estos, los dos últimos han sido reportados como factor de riesgo para la EA en múltiples estudios realizados en otras poblaciones tanto colombianas como extranjeras, más los tres primeros no han sido asociados de manera contundente con la EA, sin embargo, fueron tenidos en cuenta para esta investigación dado que se encuentran vinculados a la respuesta inflamatoria asumida como hipótesis para esta investigación y han sido vinculados a otras patologías de similares características proinflamatorias a la EA. Para los demás SNP no se encontraron asociaciones significativas con la EA.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas de SNP identificados como factor de riesgo para la EA en la muestra de estudio

Símbolo del gen	Número rs	Genotipos de casos			Genotipos de controles			Valor P	OR(95% IC)	Alelo asociado
<b>TNF</b>	rs1800610	GG (1.2%)	GA 2 (8.3%)	AA 21 (87.5%)	GG 65 (41.1%)	GA 46 (29.1%)	AA 47 (29.8%)	0.0005	15.44  (2.03 - 117.4)	A
<b>IL17</b>	rs10484879	GG 10 (38.5%)	GT 7 (26.9%)	TT 9 (34.6%)	GG 106 (67.5%)	GT 37 (23.6%)	TT 14 (8.9%)	0.0001	4.24  (1.77- 10.11)	T
<b>IL17</b>	rs7747909	GG 4 (14.8%)	GA 13 (48.1%)	AA 10 (37%)	GG 77 (48.7%)	GA 33 (20.9%)	AA 48 (30.4%)	0.0016	4.86  (1.61- 14.67)	A
<b>APOE</b>	rs429358	TT 14 (58.3%)	TC 10 (41.7)	CC 0 (0%)	TT 120 (76%)	TC 31 (19.6)	CC 7 (4.4%)	0.0065	3.72  (1.47- 9.40)	C
<b>TOMM40</b>	rs2075650	AA 12 (44.4%)	AG 12 (44.4%)	GG 3 (11.1%)	AA 105 (66%)	AG 42 (26.4%)	GG 12 (7.5%)	0.0309	2.38  (1.04- 5.45)	G

Los OR para el SNP rs2075650 de TOMM40 significativos fueron comparados con diversos reportes disponibles en reportes de meta análisis consignados en la base de datos Alzgene (<http://www.alzgene.org/>), estos son reportes tanto de GWAS como de estudios caso-control en otras poblaciones y se muestran en la Tabla 2. A partir de estas comparaciones se evidencia una similitud entre los valores de OR reportados por otros estudios para el SNP rs2075650 de TOMM40 y el reportado en esta tesis. Las diferencias están dadas quizás por la variabilidad en el origen ancestral de los individuos evaluados, el diseño experimental y la metodología

usada en cada estudio, variables que pueden afectar de manera representativa los resultados de los estudios de asociación genética.

Para los demás SNP significativos no se encontraron reportes en esta base de datos, por lo tanto no fue posible hacer comparaciones extensas con reportes de otras investigaciones.

**Tabla 2. Comparativo entre los OR de otros estudios de caso control reportados en literatura contra el OR obtenido en el estudio**

<i>Símbolo del gen</i>	Números	Referencia	Población	OR (95%IC) Otros estudios	OR (95%IC) Estudio Propio
<b>TOMM40</b>	rs2075650	(Harold et al., 2009)	Alemana (C)	2.31(1.91-2.78)	2.38 (1.05-5.45)
			Inglesa (C)	2.48 (2.27-2.70)	
			Estadounidense (C)	2.68 (2.36- 2.09)	
		(Carrasquillo et al., 2009) (Stage I)	Caucásica	2.93 (2.41-2.51)	
		(Carrasquillo et al., 2009) (Stage II)	Caucásica	3.79 (3.26-4.41)	
		Ortega-Rojas, 2012	Colombiana	3.52 (2.12-5.84)	
		Ortega Rojas et al, 2016	Colombiana	4.20 (2.73-6.48)	
		(Bagnoli et al., 2013)	Italiana	2.13 (1.48-2.07)	
		(Naj et al., 2010)	Estadounidense (Stage I)	2.96 (2.50-3.50)	
		(Naj et al., 2010)	Estadounidense (Stage II)	5.72 (3.63-9.02)	

De los 5 marcadores identificados con tendencia como factor de riesgo para la EA en esta investigación, no se cuenta con gran cantidad de reportes en población colombiana, que permitan un acercamiento a la prevalencia de estos en

la población, existen apenas algunos reportes sobre la distribución de los SNP de los genes APOE y TOMM40 en población colombiana, y para los demás SNP no se encontraron reportes de literatura que describan su participación en la EA, ni en sujetos colombianos ni tampoco en poblaciones de otras regiones. Por lo tanto, hasta donde es de conocimiento, esta es la primera vez que se reporta una posible tendencia al riesgo de EA en los marcadores rs7747909 y rs10484879 del gen IL-17 y el rs1800610 del TNF- $\alpha$ .

Respecto a las asociaciones, de manera consistente con los hallazgos de otras investigaciones, se encontró una asociación entre la EA y la presencia del SNP rs429358 de APOE, este polimorfismo junto con el rs7412 son los diferenciadores de isoformas APOE que pueden ser principalmente de tres tipos:  $\epsilon$ 2 (cys112, cys158),  $\epsilon$ 3 (cys112, arg158), y  $\epsilon$ 4 (arg112, arg158).

Varias investigaciones han reportado que el gen TOMM40 está en desequilibrio de ligamiento con APOE, por lo cual ha recibido creciente atención como un gen promisorio en la EA. TOMM40 también afecta las áreas cerebrales vulnerables en la EA, por medio de procesos apoptóticos descendentes que combaten la agregación de A $\beta$  extracelular (Ferencz et al., 2012). Dentro de sus variantes polimórficas ha sido de gran interés el rs2075650 que se encuentra dentro del intrón 2 y aguas arriba de APOE, por lo cual, al estar en desequilibrio de ligamiento con éste último podría modular los niveles de expresión de APOE (Bekris, Galloway, Montine, Schellenberg, & Yu, 2010). El rs2075650 ha sido descrito como parte de un haplotipo que puede modular la expresión no sólo de TOMM40, sino también de genes cercanos, como APOE y APOC1 y también está relacionado con la cantidad de proteína Tau total, A $\beta$  y APOE- $\epsilon$ 4 en el líquido cefalorraquídeo (S. Kim et al., 2011)

El rs2075650 ha sido identificado como factor incremental del riesgo de EA en en población europea, coreana, estadounidense y colombiana como se mencionó previamente, sin embargo también existen algunos estudios que reportan no identificar asociaciones de riesgo significativas (He et al., 2016), por lo tanto, los hallazgos reportados en esta investigación son consistentes con los reportados por

otros estudios, especialmente en relación con los OR de investigaciones en población extranjera; de manera interesante, las mayores diferencias con el valor OR se presentaron con los dos estudios de asociación de este gen reportados en población colombiana (Ortega-Rojas et al., 2016); a pesar de compartir características de mestizaje estas diferencias se pueden deber al hecho de que la muestra utilizada en esta investigación es más pequeña que la de otros reportes en colombianos, pero se mantiene la tendencia al riesgo, con lo que se hace necesario replicar análisis de este tipo en muestras de mayor tamaño.

Por su parte gen IL-17A fue seleccionado como un candidato para la EA teniendo en cuenta su importante rol dentro de los mecanismos inflamatorios, el gen IL-17A codifica para una proteína pro inflamatoria producida por linfocitos T activos, que tiene como rol, entre otros, regular las actividades del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y las proteínas MAPK. Así mismo, estimula la expresión de otras citoquinas y la producción de especies reactivas; los niveles altos de esta citoquina se han asociado con diversas enfermedades, entre ellas la EA (Zhang et al., 2013; Zheng et al., 2016).

Los SNP de IL-17A rs7747909 y 10484879 han sido asociados con susceptibilidad a diversas enfermedades, como artritis reumatoide, psoriasis, degeneración macular, cáncer y neoplasias entre otros. (Batalla Cebey, 2015; Nordang et al., 2009; Popp et al., 2014; Valdés Gallego, 2015). Sin embargo, no se encontraron evidencias en la literatura científica de haber sido estudiados con respecto a la EA. En esta investigación, los resultados muestran una tendencia al riesgo para ambos polimorfismos en EA, además, para el rs7747909 se presentó una variación en la distribución del genotipo entre los casos, siendo el genotipo homocigoto para el alelo ancestral de baja tenencia en los casos, lo que sugiere la presencia del alelo T como de tendencia al riesgo, pero, en los controles el alelo poco común T se presentó en la mitad de los sujetos, por lo tanto es necesario desarrollar estudios que permitan comprender el rol de estos SNP en la EA y hacer seguimiento a través del tiempo a los controles evaluados para determinar el efecto fenotípico a largo plazo de este alelo.

El rs1800610 (+488 G/A) está localizado en el intrón 1 del gen TNF- $\alpha$ , hasta el momento el impacto del alelo A en la transcripción y expresión del TNF- $\alpha$  es desconocido. Se ha especulado que este SNP está asociado con una alta producción de TNF- $\alpha$  (Mullighan, Fanning, Chapel, & Welsh, 1997) y ha sido asociado a enfermedad granulomatosa, esquizofrenia, algunos tipos de cáncer y depresión (Boutboul et al., 2016; Deshpande et al., 2017; Doong et al., 2015). Con respecto a la EA no se ha encontrado literatura que sugiera asociación entre la EA y el SNP mencionado, de manera que, esta es al parecer, la primera vez que se reporta una asociación entre el rs1800610 y la EA. Para la muestra analizada, el polimorfismo se presentó en la gran mayoría de los casos especialmente en configuración homocigota, en contraste esta misma configuración se presentó solo en alrededor del 30% de los sujetos.

Es de aclarar que los hallazgos previamente mencionados deben ser interpretados con cautela dado el reducido tamaño muestral, es por esto que los hallazgos se reportan únicamente como tendencias y no como asociaciones demostradas, pues es necesario replicar el estudio en mayor cantidad de sujetos para evaluar si el comportamiento de estos SNP se mantiene, así como también, implementar protocolos experimentales para evaluar el papel de estos SNP dentro de procesos biológicos *in vivo*.

Posterior al cálculo de las frecuencias genóticas se realizó un análisis de haplotipos para los SNP evaluados. Los haplotipos son entendidos como una combinación de un set de alelos que se encuentra en sitios cercanos dentro del cromosoma, es decir que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LD), heredándose juntos con más frecuencia de lo esperado por el azar (Ortega Rojas, 2012).

En el presente estudio se identificaron dos haplotipos de interés para los SNP del gen IL-17A y para los SNP del TNF- $\alpha$ .

El haplotipo conformado por los SNP evaluados en IL-17A "TAA" incrementa el riesgo (OR:45.2 IC:45.26,46.08 F:0.212) y el haplotipo "CGGC" que contiene los alelos para los SNP de TNF- $\alpha$  resulta protector (OR:0.08 IC:0.01,0.63 F:0.234) (ver

Tabla 3) esto podría indicar un efecto sinérgico entre estos SNP para conferir riesgo en el caso de IL-17 o protección en el caso de TNF- $\alpha$  a la EA.

Para el haplotipo de IL-17 la combinación “TAA” contiene el alelo de riesgo para el rs7747909, mientras que los otros dos alelos son ancestrales, que no representan riesgo, lo que sugiere que el peso que aporta el rs7747909 al riesgo es significativo. Para el haplotipo de TNF- $\alpha$  la combinación “GCCG” contiene todos los alelos ancestrales comunes, por lo cual tiene una tendencia a la protección.

**Tabla 3. Haplotipos significativos para los SNP evaluados en la muestra**

Símbolo del gen	Haplotipo	Frecuencia	OR (95% IC)
IL-17	rs10484879 - rs7747909 - rs2275913 TAA	0.212	45.2 (45.26 – 46.08)
TNF- $\alpha$	rs1799724 - rs1800610 - rs1800629 -rs1800630 CGGC	0.234	0,08 (0,01 – 0,63)

## **4.2. Perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA**

### **4.2.1. Selección de muestras, extracción y valoración del ARN**

Para determinar el perfil de expresión en genes asociados a respuesta inflamatoria se secuenció el transcriptoma de 15 muestras como se describió en la sección de materiales y métodos. El proceso de secuenciación fue realizado a partir de ARN extraído de una muestra de sangre periférica, en el Anexo IV se muestran los parámetros obtenidos tras el proceso de aislamiento y valoración del ARN total de las muestras. En general la concentración de ARN obtenida fue suficiente para los propósitos del análisis, lo que indica que el proceso de extracción del ARN total y purificación fue óptimo. No obstante se observó que algunas muestras sufrieron degradación. Sin embargo, teniendo en consideración que el tiempo de conservación de las muestras superó en 5 días al recomendado, puesto que se

presentaron algunos inconvenientes en el transporte de las muestras hasta el laboratorio de secuenciación, la calidad final del ARN fue mejor de lo esperado.

Del proceso de secuenciación se obtuvieron un promedio de 12,3 millones de lecturas por muestra, de las cuales más del 94,7% mapearon sobre diana y permitieron analizar más del 58,32% de las dianas (ver Tabla 4). Este último dato depende de la expresión de los genes en el momento en el cual se obtiene la muestra, ya que nunca se expresan el 100% de los genes en cada célula. Es de subrayar que si se compara la muestra que tiene menos lecturas mapeadas (P6 con 9.484.350 lecturas y 57,20% de dianas analizadas) con la muestra que tiene más lecturas (F9 con 17.475.956 y 61,18% de dianas analizadas) se observa que hay menos de un 4% de diferencia en las dianas analizadas. Lo cual permite intuir que se pudo analizar prácticamente el total de genes expresados en las muestras ya que aun doblando la profundidad en el número de lecturas, únicamente se observó un incremento de las dianas analizadas inferior al 4%.

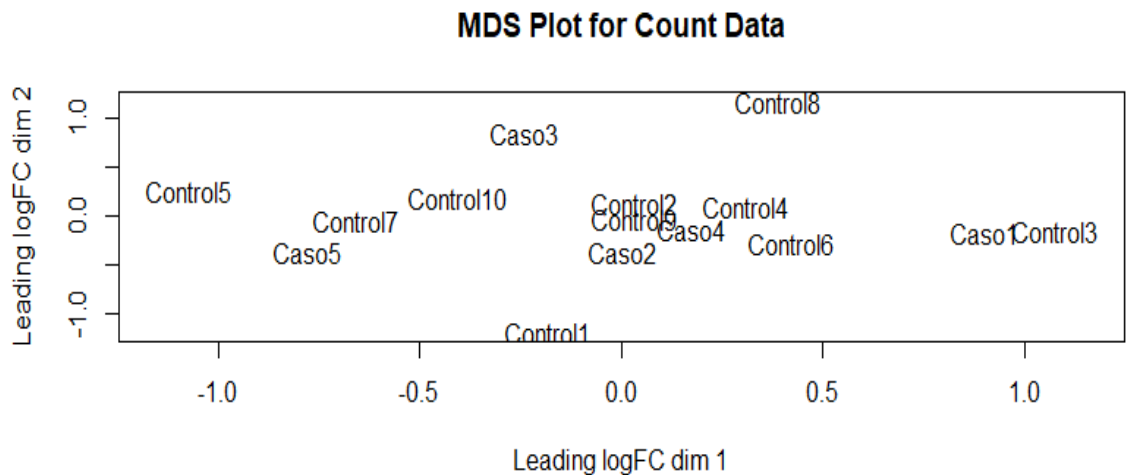
**Tabla 4. Cantidad de lecturas obtenidas para cada muestra en el proceso de secuenciación**

<b>Barcode Name</b>	<b>Muestra</b>	<b>Lecturas</b>	<b>Lecturas válidas</b>	<b>Dianas detectadas</b>
lonXpress_001	C1	13,697,308	94.52%	58.35%
lonXpress_002	C3	13,159,912	95.36%	57.77%
lonXpress_003	C4	9,787,184	94.65%	56.60%
lonXpress_004	P5	9,775,742	94.19%	56.75%
lonXpress_005	C5	14,796,446	95.08%	59.40%
lonXpress_006	F5	10,827,796	94.66%	57.66%
lonXpress_007	P6	9,484,350	95.18%	57.20%
lonXpress_008	C6	10,318,061	94.90%	59.04%
lonXpress_009	F6	13,853,045	94.63%	59.93%
lonXpress_010	P8	12,691,041	94.60%	58.78%
lonXpress_011	F8	12,225,057	94.48%	57.27%
lonXpress_012	P9	11,699,109	94.32%	57.71%
lonXpress_013	F9	17,475,956	94.63%	61.18%
lonXpress_014	P10	14,386,189	95.06%	59.60%
lonXpress_015	F10	11,745,144	94.30%	57.65%

#### 4.2.2. Preprocesamiento y análisis de calidad de las secuencias

Al evaluar la calidad de las secuencias se observó que en promedio el 90% de las secuencias reportó un valor de calidad MAPQ > 30. Posteriormente, se efectuó el mapeo de los genes sobre la anotación de referencia, un promedio de 97% de las lecturas de cada muestra mapeó sobre el genoma de referencia. Luego, se construyó la matriz de conteos para el conjunto de datos.

Previamente a aplicar el análisis de expresión diferencial sobre el conjunto de datos, se indagó sobre el comportamiento de las muestras a través de un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) con el fin de conocer la similitud entre muestras y realizar ajustes al diseño experimental de acuerdo a la naturaleza de los datos, los resultados del análisis MDS se pueden evidenciar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se observa que no existe separabilidad entre los grupos de estudio, con el fin de verificar si este fenómeno es debido a la naturaleza de los datos o a posibles artefactos se desarrolló un análisis exploratorio de los datos el cual permitió esclarecer que el comportamiento de algunas muestras no se ajustaba al diseño experimental propuesto.



**Ilustración 8. Análisis MDS para esclarecer el comportamiento de las 15 muestras secuenciadas basado en los conteos crudos**

### **4.2.3. Análisis exploratorio y ajuste del conjunto de datos**

El análisis exploratorio de los conteos crudos se formuló en cuatro pasos: prefiltrado, transformación de conteos, cálculo de distancias entre muestras a partir de conteos normalizados, y análisis de componentes principales (PCA), como se describe a continuación:

#### **4.2.3.1. Prefiltrado**

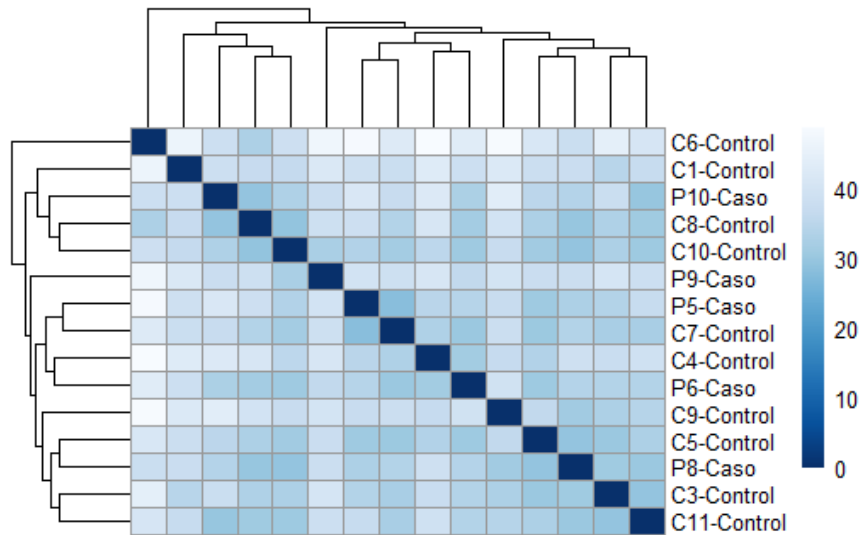
Se hizo una reducción de la matriz de conteos inicial a partir de la eliminación de información nula mediante la regla de filtrado mínima: la eliminación de filas sin conteos o con solo un conteo a lo largo de las muestras, de esta manera, el conjunto de datos inicial se redujo de 20812 genes a 15577 genes, lo que indica que en un total de 5.235 genes no se presentaron conteos o estos fueron irregulares a lo largo de las 15 muestras.

#### **4.2.3.2. Transformación de los conteos crudos**

Con el fin de evaluar la similitud global entre las muestras se aplicó a los datos una normalización mediante una transformación logarítmica regularizada no supervisada (*rlog*) (M. I. Love et al., 2014) para posteriormente, establecer la cercanía entre las muestras independiente de los efectos técnicos de la secuenciación como la profundidad o tamaño de librerías que podría variar entre las muestras.

#### **4.2.3.3. Distancia Euclidiana entre muestras**

Para evaluar la similitud entre muestras se efectuó el cálculo de distancias Euclidianas entre muestras a partir de los datos ajustados a un modelo Gaussiano, donde las muestras y los genes se asumieron independientes (Witten, 2011) . Se evidenció que, no obstante habiendo normalizando los datos no existe separabilidad evidente entre los grupos de estudio ( ver Ilustración 9) propuestos para la investigación, el agrupamiento es caótico.



**Ilustración 9. Agrupamiento basado en las distancias Euclidianas**

#### 4.2.3.4. *Análisis de componente principales (PCA)*

Como segunda medida para corroborar el comportamiento de los grupos de estudio se realizó un análisis de componentes principales (PCA), método que utiliza la proyección en dos dimensiones para explicar la disimilitud entre muestras basado en la varianza (Bro & Smilde, 2014; Wold, Esbensen, & Geladi, 1987). Para este caso, las dos primeras componentes principales explican el 40% de la variabilidad entre las muestras, en la Ilustración 10 se puede observar que no hay separabilidad entre los grupos de estudio. Así mismo, se observan algunas muestras con comportamiento atípico (outliers)

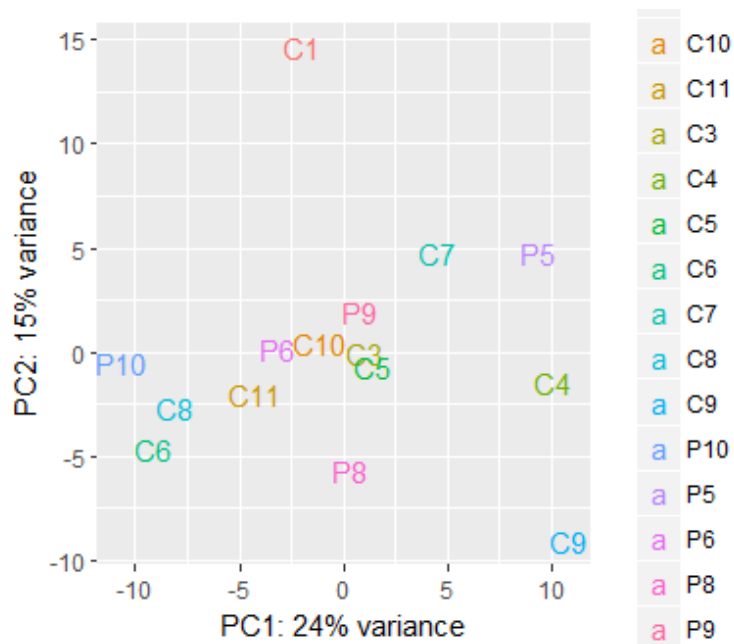


Ilustración 10. PCA para conteos normalizados

#### 4.2.3.5. Exclusión de muestras

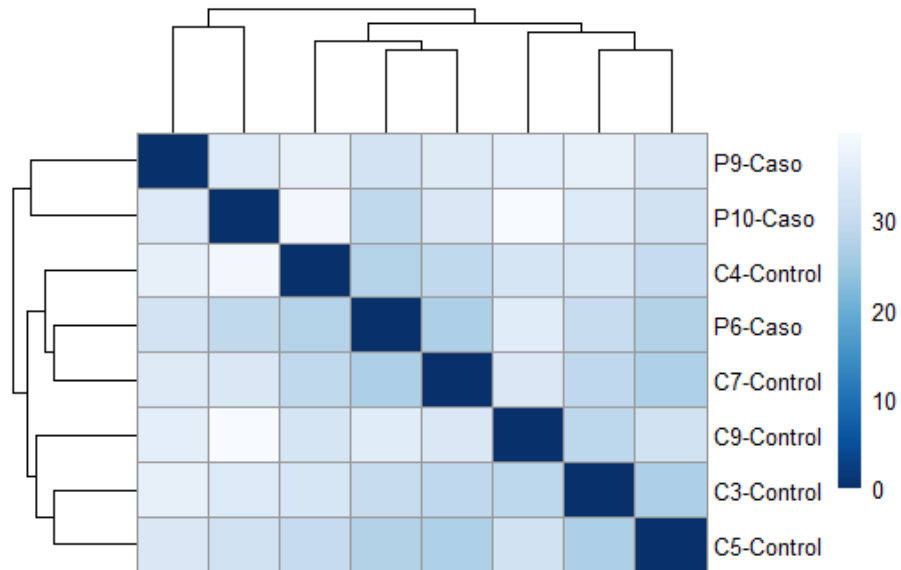
Una vez realizado el análisis exploratorio de las secuencias se identificaron muestras atípicas que no fueron tenidas en cuenta para los análisis posteriores, ya que por su comportamiento irregular no se ajustan al diseño experimental de la investigación. Las muestras excluidas fueron: C1, C6, C8, C10, C11, P5 y P8. Una vez reajustado el conjunto de datos, se repitieron los análisis exploratorios con el fin de verificar el efecto de los ajustes realizados.

#### 4.2.3.6. Prefiltrado y transformación de los conteos en la muestra reducida

Una vez eliminadas las muestras atípicas se obtuvo una nueva matriz de conteos de 20812 genes y 8 muestras. Al igual que con el conjunto de datos original se eliminaron los genes con conteos de cero, esta vez se mantuvieron únicamente aquellos genes que tenían al menos una lectura por millón en al menos tres de las ocho muestras, de esta forma el número de genes se redujo de 20812 a 13227. Posteriormente se aplicó una transformación logarítmica regularizada no supervisada (*rlog*) (M. I. Love et al., 2014) con el fin de normalizar el conjunto de datos el cual fue el conjunto de datos definitivo con el cuál se efectuaron los análisis en adelante descritos.

#### 4.2.3.7. Distancias Euclidianas en la muestra reducida

Se realizó el cálculo de las distancias Euclidianas al conjunto de datos reducido, hubo una mayor tendencia a la separación de muestras de acuerdo a sus similitudes, con la eliminación de muestras atípicas fue posible establecer separabilidad entre los grupos del experimento (ver Ilustración 11).



**Ilustración 11. Agrupamiento basado en las distancias Euclidianas posterior a la exclusión de muestras atípicas**

#### 4.2.3.8. Análisis de componentes principales (PCA) en la muestra reducida

Al aplicar nuevamente el análisis de componentes principales (PCA) al conjunto de muestras ajustado se encontró que las dos primeras componentes explican el 52% de la variabilidad en el conjunto de datos. En la Ilustración 12 se puede observar que hay separabilidad entre los grupos caso y control.



Ilustración 12. PCA para conteos normalizados posterior a la exclusión de muestras atípicas

#### 4.2.4. Análisis de expresión de genes

Se efectuó sobre las muestras conservadas el análisis de expresión diferencial mediante la librería DeSeq2 de R/bioconductor. Para el análisis de expresión diferencial se contó con un total de 13227 genes, una vez realizado el análisis 30 genes fueron reportados como *outliers* (0,23%) y un total de 245 genes se encontraron diferencialmente expresados, de los cuales 95 genes resultaron sobre expresados (0,72%), y los 150 genes restantes subexpresados (1,1%) considerando un valor  $FDR < 0,1$ ,  $p < 0,05$  y  $LOG2FC > 0.5$  y  $< -0,5$ .

Dentro de la tabla de resultados del análisis de expresión diferencial se reporta el valor LOG2FC, que hace referencia a la estimación de cuánto la expresión del gen difiere en los casos de Alzheimer en comparación con las muestras control. Este valor se indica en una escala logarítmica en base 2: por ejemplo, un valor LOG2FC e de 1,5 significa que la expresión del gen se incrementa por un factor multiplicativo de  $2^{1,5} = 2,82$  es decir, el gen tuvo un incremento en la expresión de casi tres veces el nivel de referencia, cuando el valor LOG2FC es negativo indica un decremento de la expresión (M. I. Love et al., 2014). Dentro de los genes identificados como diferencialmente expresados los valores de LOG2FC varían en

los genes sobre expresados en un rango de 0,52 a 1,50 y en los genes subexpresados este rango varía entre -0,51 y -1,36 (Anexo VIII).

A continuación se observa el *MA-Plot* (ver Ilustración 13) el cual provee una visión general muy útil para experimentos donde se realizan comparaciones entre dos grupos (R. Dudoit et al. 2002). La gráfica presenta una comparativa entre los conteos normalizados para cada gen y el cambio en la expresión dado por *LOG2FC*; cada gen es representado con un punto y aquellos con un valor de significancia ajustada, menor al umbral ( $FDR < 0,1$ ) se muestran en rojo.

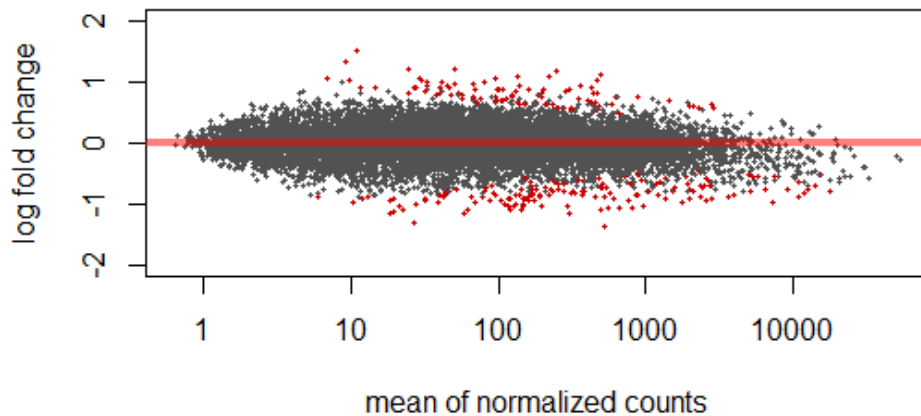


Ilustración 13. MA-PLOT de los genes diferencialmente expresados ( $p_{adj} < 0,05$  y  $FDR < 0,1$ )

#### **4.2.5. Análisis de enriquecimiento funcional de DEG**

##### **4.2.5.1. Análisis GO para genes sobre-expresados**

Al realizar el análisis para el subconjunto de 94 genes sobre expresados, 90 de estos fueron mapeados sobre el listado de referencia para términos GO. Para la ontología proceso biológico se encontraron asociaciones significativas ( $p < 0,05$ ) para la vía de señalización y la respuesta mediada por la familia interferón (tanto interferón tipo 1 como interferón tipo 2, estos procesos se encontraron sobre representados (ver ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. e ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), lo que significa que hay una proporción mayor a la esperada, de genes implicados en estos proceso biológico, dado que el nivel de esta sobre representación fue estadísticamente significativo, se considera que

estos resultados no son aleatorio y es potencialmente interesante estudiar su relación con la EA.

Con respecto a los hallazgos en mención, es de resaltar que la familia de interferones fue descubierta hace más de cincuenta años e inicialmente fue conocida por su habilidad para crear resistencia viral en las células. De acuerdo a este criterio, fueron clasificados inicialmente en dos tipos: la familia INF-1 compuesta por las formas ácido-estables IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  y la familia INF-2 con la forma ácido-lábil IFN- $\gamma$  (Farrar & Schreiber, 1993). En años recientes, un tercer tipo de IFN ha sido descrito, el IFN- $\delta$ , originalmente llamado IL-28a/b e IL-29 (De Weerd & Nguyen, 2012).

En el ser humano el principal productor de INF-1 son las células dendríticas, aunque también es producido por la microglía en condiciones neuropatológicas como la EA (Paul, Ricour, Sommereyns, Sorgeloos, & Michiels, 2007) mientras que INF-2 es producido predominantemente por células T activadas y células asesinas naturales (Hashioka et al., 2009), y en el cerebro puede ser expresado por astrocitos, neuronas y microglía (Mastrangelo, Sudol, Narrow, & Bowers, 2009) e INF-3 por células dendríticas plasmocitoides, no obstante, estudios *in vitro* han demostrado que casi cualquier célula es capaz de producir INF-3 (Coccia et al., 2004)

Las estimulación neuronal crónica a través de INF-1 puede desencadenar respuestas neurotóxicas y generar lesiones (Paul et al., 2007), de manera clásica se asocia la sobreproducción de INF-1 en el cerebro con la aparición de efectos adversos neurológicos y neuropsiquiátricos (Raison, Demetrasvili, Capuron, & Miller, 2005), lo cual podría explicar en parte los cambios cognitivos y comportamentales manifiestos en la EA. Modelos *in vitro* en ratones transgénicos APP/PSEN1 han demostrado la contribución de la señalización de INF-1 en la respuesta inflamatoria a A $\beta$ , dado que, se ha encontrado que la expresión de INF- $\alpha$  en cerebros de ratón APP/PSEN1 puede incrementar hasta el doble que en los controles (Taylor et al., 2014), otros estudios *in vitro* en neuronas primarias han demostrado que la expresión de INF-1 inducida por A $\beta$  precede a las de otras

citoquinas clásicas como IL-1 $\beta$  e IL-6 (Kawai & Akira, 2006). En contraste, la inhibición de la expresión del receptor 1 de INF-1 proporciona protección contra la toxicidad derivada de A $\beta$  (Taylor et al., 2014).

INF- $\gamma$  también puede desencadenar una respuesta citotóxica en el cerebro, niveles altos de esta citoquina repercuten sobre la activación de los astrocitos, quienes inducen neurotoxicidad y muerte celular, evidencias experimentales han demostrado que la estimulación con INF- $\gamma$  incrementa más de cuatro veces el porcentaje de muerte celular ya que los astrocitos incrementan su neurotoxicidad y por lo tanto su potencia para matar tejido neuronal (Hashioka et al., 2009), por otra parte, el INF- $\gamma$  es un activador de la vía JAK/STAT que modula la transcripción de diferentes factores inflamatorios (Platanias, 2005; Shuai & Liu, 2003), por lo que el efecto neurotóxico de los astrocitos derivado del INF- $\gamma$  puede ser revertido mediante el uso de inhibidores de la vía JAK/STAT (Hashioka et al., 2009), lo que convierte esta última en un potencial blanco terapéutico contra la EA y otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

El INF- $\gamma$  también tiene efecto sobre la microglía, estimulando la liberación de radicales tóxicos de oxígeno que generan un estado de estrés celular (Klegeris, Bissonnette, & McGeer, 2005; Klegeris & McGeer, 2003) aunque vale aclarar que estas manifestaciones adversas son más leves que en los astrocitos, los hallazgos de este proyecto concuerdan con esta premisa ya que se identificaron enriquecidos los procesos asociados a INF- $\gamma$  y la respuesta a estrés celular, que son mecanismos interconectados.

Modelos murinos experimentales han evidenciado un aumento significativo en la expresión de INF- $\gamma$  en condiciones amiloidogénicas, que además incrementa en función de la edad (Abbas et al., 2002), a su vez la proteína A $\beta$  exacerba de manera significativa la expresión de INF- $\gamma$  de manera que es un sistema de regulación bidireccional, sin embargo, de manera sorprendente INF- $\gamma$  tiene un efecto protector o supresor sobre p-tau (Mastrangelo et al., 2009)

En ratones transgénicos J20 que presentan déficit temprano de memoria y acumulación progresiva A $\beta$ , se ha presentado una alta expresión de los genes de

INF-1 a lo largo de toda la vida, mientras que se ha presentado una alta expresión de los genes de INF-2 únicamente en edad temprana (3 meses), junto con un marcado deterioro de la memoria y el aumento de la activación glial (Dá Mesquita et al., 2015)

De manera conjunta, estos hallazgos sugieren una posible interacción entre la respuesta de INF-1 e INF-2 en la modulación del deterioro cognitivo en la EA.

**Tabla 5. Términos enriquecidos para la ontología "procesos biológicos" en genes sobre-expresados**

<b>Término GO</b>	<b>Frecuencia de Referencia</b>	<b>Frecuencia Observada</b>	<b>Tipo de enriquecimiento</b>	<b>Fold enrichment</b>	<b>P valor</b>
<b>Vía de señalización mediada por INF-<math>\gamma</math></b>	71	7	+	22,23	0,000307
<b>Respuesta celular a INF-<math>\gamma</math></b>	125	8	+	14,43	0,000848
<b>Respuesta a INF-<math>\gamma</math></b>	147	8	+	12,27	0,00287
<b>Respuesta al estrés</b>	3246	32	+	2,36	0,00461
<b>Vía de señalización de INF-1</b>	63	6	+	21,48	0,00367
<b>Respuesta celular a INF-1</b>	63	6	+	21,48	0,00367
<b>Respuesta a INF-1</b>	67	6	+	20,19	0,00524

Convenciones: (+) sobrerrepresentación, (-) subrepresentación

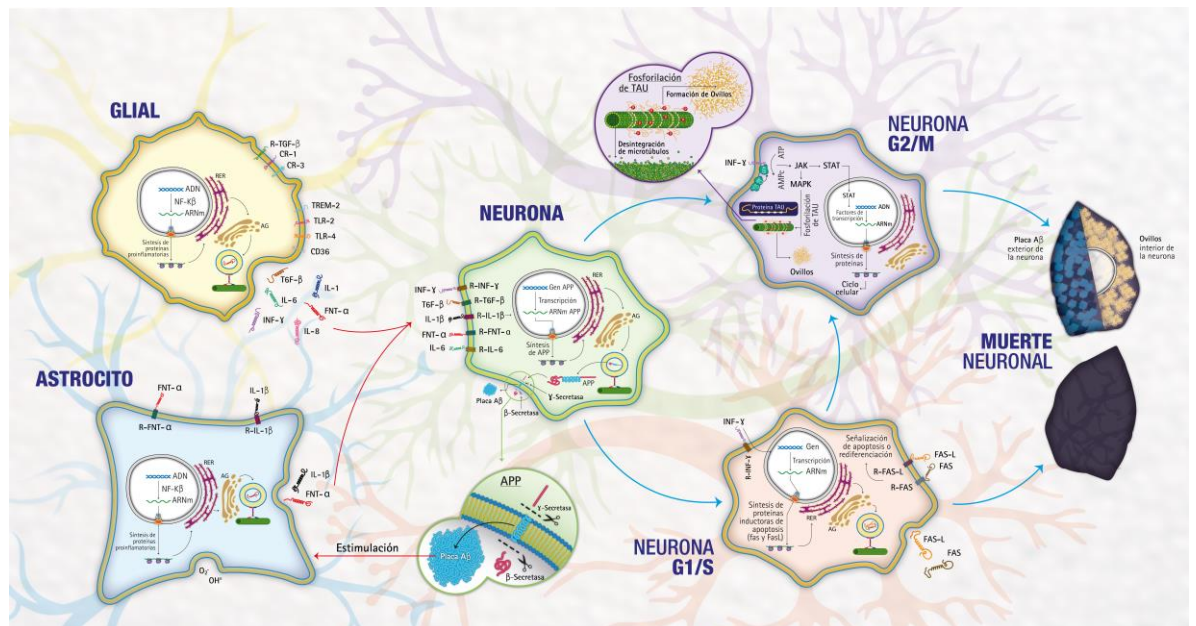
Para las ontologías componente celular y función molecular no se encontraron hallazgos significativos de interés para ser discutidos en la presente investigación, sin embargo los demás hallazgos pueden verse en el Anexo IX.

#### 4.2.5.2. *Análisis GO para genes sub-expresados*

El análisis para los 147 genes sub expresados arrojó mapeos de 142 genes sobre los términos de ontología disponibles, la corrección Bonferroni fue aplicada.

Se presentaron asociaciones significativas ( $p < 0,05$ ) para la ontología “Proceso biológico” en relación a los procesos asociados al ciclo celular (ver Tabla 6)

La muerte neuronal es un proceso que puede ser fisiológico o patológico, la apoptosis y la necrosis son dos mecanismos que participan en este proceso. Sin embargo, en los trastornos neurodegenerativos, algunas neuronas escapan a estos tipos de muerte y agonizan en un proceso denominado degeneración neurofibrilar que se caracteriza por la agregación anormal a nivel intracelular de proteínas Tau hiperfosforilada (Hamdane et al., 2003), dicha degeneración neurofibrilar desencadena lo que se conoce como taupatía (ver Ilustración 14) Las Taupatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas progresivas caracterizadas por la presencia de depósitos filamentosos de microtúbulos asociados a tau en las neuronas afectadas o la glía, el ejemplo clásico de taupatía es la EA (Tatebayashi et al., 2006).



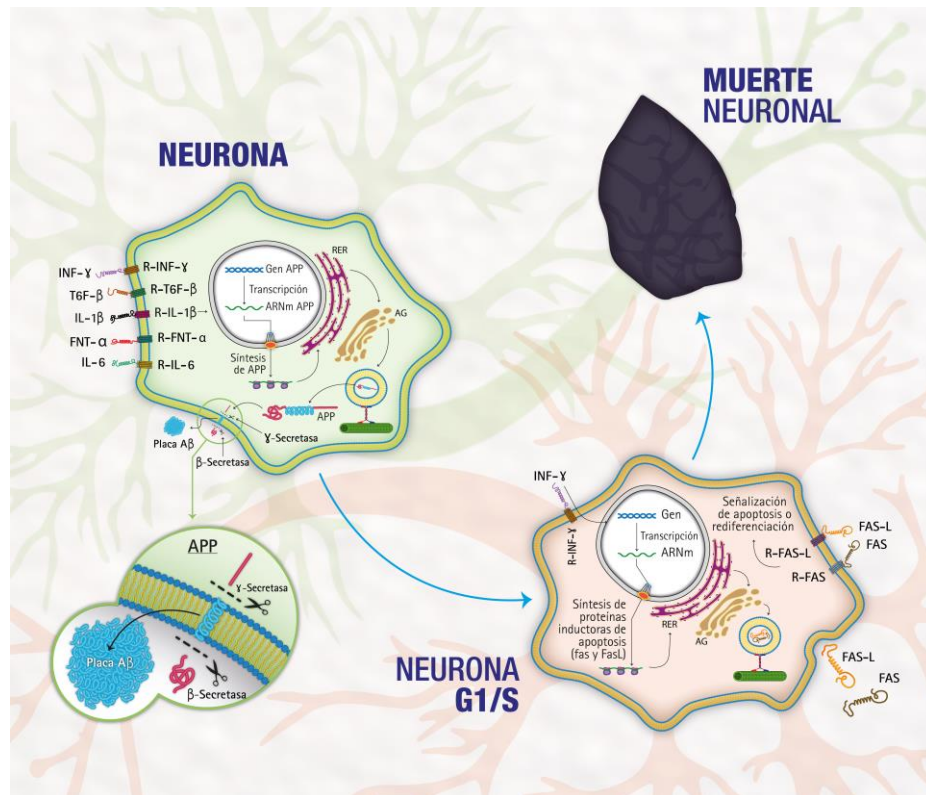
**Ilustración 14. Mecanismos de muerte celular, la vía inferior muestra un proceso normal de muerte por necrosis/apoptosis, la vía superior una muerte por neurodegeneración. Diseño y diagramación: Melissa Zuluaga.**

Diferentes evidencias han vinculado la agregación de proteínas Tau anormalmente fosforiladas que forma filamentos con la reactivación del ciclo celular,

lo que sugiere que la disfunción mitótica puede ser importante en la patogénesis de la EA.

El ciclo celular se divide en cuatro momentos: la fase G1 donde se da un proceso de crecimiento celular con síntesis de proteínas y ácido ribonucleico (ARN) para metabolismo. La fase S, en la cual se da la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la fase G2, que es el segundo momento de crecimiento celular en el que se continúa la síntesis de proteínas y ARN para el proceso de mitosis, finalmente en la fase M ocurre la división celular con los procesos de mitosis, meiosis y citocinesis. Cuando una célula se encuentra en estado de reposo en el que no ocurre replicación o división celular, es decir, es una fase posmitótica y se denomina dicho estado como fase G0 (Karp, 2009)

En el cerebro adulto, las neuronas se encuentran en fase G0, estas no se dividen y están plenamente diferenciadas. Por lo tanto, la re-expresión de proteínas de ciclo celular se considera un fenómeno patológico, sin embargo, cabe señalar que la re-expresión de los marcadores G1/S se correlaciona con la apoptosis en muchos tejidos incluyendo las neuronas, así que, normalmente las células que pasan del estado G0 a un estado activo G1/S detienen el ciclo celular una vez ocurre la apoptosis o la rediferenciación (ver Ilustración 15), pero en la EA se ha identificado expresión de marcadores tanto G1/S como G2/M en neuronas que han sufrido degeneración neurofibrilar lo que sugiere que la desregulación de los genes involucrados en G1/S y G2/M permite a la neurona escapar de la apoptosis y experimentar procesos degenerativos (Hamdane et al., 2003)



**Ilustración 15. Reactivación de las fases G1/S del ciclo celular para activación de apoptosis. Diseño y diagramación: Melissa Zuluaga.**

Una asociación directa entre la fase M y la fosforilación anormal de Tau fue documentada por un estudio utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*, cuya maduración es caracterizada por dos procesos denominados meiosis I y meiosis II, durante esta última se observó inmunoreactividad de la proteína Tau, tal y como sucede en la EA, debido a que la meiosis II se considera como una fase similar a la mitosis, los hallazgos fueron corroborados utilizando células de neuroblastoma en las que se identificó fosforilación de la proteína Tau en células mitóticas debido al desajuste de reguladores del ciclo celular y quinasas mitóticas (Delobel et al., 2002).

Múltiples estudios, tanto en modelos murinos como en tejido humano postmortem, han demostrado que dentro de los reguladores de ciclo celular y quinasas mitóticas que coexpresan las neuronas que contienen NFT se encuentran la APP (López-Sánchez, Müller, & Frade, 2005), ciclinas (Busser, Geldmacher, & Herrup, 1998), fosfoepitopos mitóticos (Kondratick & Vandr e, 1996; Pope et al.,

1994), histonas fosforiladas (Ogawa et al., 2003) y quinasas dependientes de ciclina (Harris et al., 2000; Knecht et al., 1999; Tatebayashi et al., 2006; Tokumitsu et al., 1999). A pesar de que las evidencias apuntan a que estas manifestaciones se dan en condiciones patológicas neurodegenerativas, existe la hipótesis adicional de que pueden deberse a un proceso regenerativo, sin embargo, dado que aún no se ha demostrado plenamente que las neuronas de cerebro adulto tengan esta capacidad, la expresión de la proteína del ciclo celular en neuronas maduras es considerada como una respuesta mal adaptativa de las células "atoradas" en un ciclo que no pueden completar y que termina por llevarlas a la muerte (Kuhn, Cooper-Kuhn, Boekhoorn, & Lucassen, 2007).

Para las ontologías "función molecular" y "componente celular" no se encontraron hallazgos significativos de interés para la investigación y por lo tanto no se reportan en la presente discusión. Sin embargo, los hallazgos en ambas ontología pueden consultarse en el

Anexo X.

**Tabla 6. Terminos enriquecidos para la ontología "procesos biológicos" en genes sub-expresados**

<b>Término GO</b>	<b>Frecuencia de Referencia</b>	<b>Frecuencia Observada</b>	<b>Tipo de enriquecimiento</b>	<b>Fold enrichment</b>	<b>P valor</b>
<b>Proceso mitótico del ciclo celular</b>	766	21	+	3,97	0,000703
<b>Ciclo de células mitóticas</b>	794	21	+	3,83	0,00127
<b>Proceso del ciclo celular</b>	1091	24	+	3,18	0,00428
<b>Regulación del ciclo celular</b>	1003	23	+	3,32	0,00375

Convenciones: (+) sobre representación, (-) sub representación

### **4.3. Relación entre los SNP de región promotora de los genes *TREM2*, *TOMM40*, *IL17*, *IL10*, *TNF* e *IL8* y los perfiles de expresión de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA**

Dado que no se cumplió la hipótesis de correspondencia entre los genes diferencialmente expresados y los genes candidatos propuestos para la genotipificación de SNP, el abordaje para dar cumplimiento al tercer objetivo específico se centró en realizar un análisis funcional entre los genes evaluados mediante genotipificación y los DEG identificados mediante secuenciación de transcriptoma para identificar asociaciones entre ambos grupos de genes y sus productos proteicos; y por otra parte, identificar el efecto de la presencia de los SNP candidatos sobre dichos productos génicos y los procesos en los que se encuentran involucrados.

Los genes diferencialmente expresados fueron mapeados sobre vías de señalización y rutas metabólicas del humano, haciendo uso de la herramienta en línea KEEG PATHWAY MAPPER; ya que los hallazgos con esta herramienta fueron bastante amplios, se consideraron únicamente los hallazgos relacionados con procesos inflamatorios, con la EA o en los que participaran los genes candidatos, así, al focalizar el análisis se procedió con la última etapa donde se tomaron los DEG involucrados en las vías de señalización de interés, y se construyeron redes de asociación funcional de los productos proteicos de dichos genes, utilizando la base de datos STRING, con el objetivo de establecer interacciones entre las proteínas codificadas por los DEG y las proteínas de los genes candidatos propuestos inicialmente para esta investigación. A continuación, se presentan los resultados para cada una de las etapas del análisis.

#### **4.3.1. Vías de señalización**

El conjunto de 241 DEG fue analizado contra la base de datos de vías de señalización y rutas metabólicas del humano ( *org - hsa*) de la herramienta KEEG mapper. Es de anotar que únicamente 101 de estos genes se encuentran registrados en la base de datos del KEEG mapper por lo que los resultados a continuación corresponden al mapeo sobre estos. Fueron identificadas 187 vías de

señalización en las que participa al menos uno de estos genes. Sin embargo, el reporte de resultados a continuación se limitará a aquellas vías de señalización de interés de la investigación donde interactúan una mayor cantidad de DEG.

#### 4.3.1.1. *Vía de señalización JAK/STAT*

La vía de señalización JAK/STAT es un importante regulador pleiotrópico que activa factores de transcripción para la producción de diferentes citoquinas y factores de crecimiento (Kanehisa et al., 2017; H.-C. Lee, Tan, Cheah, & Ling, 2016). En esta investigación, se encontraron sobre expresados cuatro de los genes que participan en esta vía de señalización los cuales corresponden a dos miembros de la familia de proteínas STAT (isoformas STAT1 y STAT2), el gen JAK2 y el IL3RA (subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-3) que es uno de los receptores de citoquinas que pueden formar complejos con JAK2 (ver Ilustración 16).

Estudios bioquímicos de la función de JAK2 han establecido su participación en la señalización de diferentes citoquinas en las que se incluyen la familia de receptores de IL-3 (Schindler & Strehlow, 1999). JAK2 tiene un rol crítico en la transducción de señales de IL-3 ya que en ausencia de este no existen precursores hematopoyéticos adicionales de respuesta a IL-3 (Kisseleva, Bhattacharya, Braunstein, & Schindler, 2002). Por su parte, la familia del receptor de IL-3 incluye receptores para IL-3, IL-5 y factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), estos receptores se componen de una cadena  $\alpha$  específica para cada citoquina y una cadena  $\beta$  común que es compartida entre estas citoquinas. Cada una de estas citoquinas contribuyen a la diferenciación y función de subpoblaciones de leucocitos y tienen importancia clínica en la inmunidad y en la fisiopatología de un espectro de enfermedades inmunológicas tan diversas como la alergia y el asma, la proteinosis alveolar pulmonar, algunas enfermedades neurodegenerativas, y neoplasias (Shearer, Rosenwasser, Bochner, Martinez-Moczygema, & Huston, 2003).

La subunidad alfa del receptor de IL-3 (IL-3R $\alpha$ ) existe como una molécula transmembrana con un dominio citoplasmático que contiene los motivos

conservados necesarios para el inicio de la señalización (Nicola, 1994). IL-3, ejerce sus respuestas biológicas vinculando sus receptores cognatos en la membrana de las células blanco, la unión específica del ligando con la cadena  $\alpha$  conduce a la activación de la cadena  $\beta$ , que culmina con el inicio de la transducción de señales, que es el mecanismo que finalmente reprograma rápidamente la expresión génica de la célula diana para alterar su comportamiento (Kisseleva et al., 2002). Hasta el momento se han descrito tres vías de señalización principales para la IL-3: la vía JAK/STAT, la vía MAPK y la vía PI3K. Cabe mencionar que en esta investigación se encontraron diferencialmente expresados genes que activan a las dos primeras.

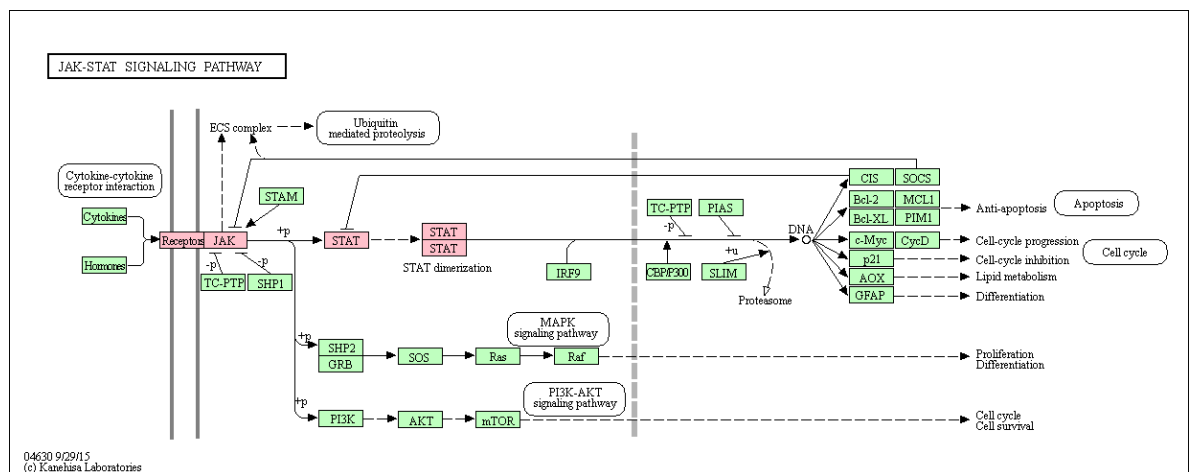
IL-3 juega un papel importante en el crecimiento y la diferenciación celular (Muñoz et al., 2001; Nicola, 1994) y su patrón de respuesta corresponde a la expresión celular de IL-3R $\alpha$  (Shearer et al., 2003) Curiosamente, la interrupción del gen IL-3 o el gen IL-3R $\alpha$  no produce alteración de hematopoyesis basal.

Estudios en ratas sugieren que la IL-3 tiene un potencial rol en los procesos inflamatorios en el SNC, dado que la microglía puede producir y responden a IL-3, además la expresión de la cadena  $\beta$  en el cerebro está restringida a las células microgliales (Appel, Buttini, Sauter, & Gebicke-Haerter, 1995; Araujo & Lapchak, 1994; T. T. Lee, Martin, & Merrill, 1993) lo que sugiere que la IL-3 podría funcionar en un ciclo de retroalimentación autocrino (Appel et al., 1995). Un estudio *in vitro* en el que células microgliales fueron estimuladas con IL-3 arrojó como resultado la formación y proliferación de células gigantes polinucleadas (T. T. Lee et al., 1993), lo que sugiere que IL-3 podría mediar la microgliosis y neurodegeneración en la EA. Así mismo, el aumento de la expresión de IL-3R $\alpha$  está asociado con tumorigenesis.

Con respecto a los miembros de la familia STAT que se encontraron sobre expresados en esta vía: STAT1 y STAT2, es de mencionar que, su descubrimiento se debe al desarrollo reciente de investigaciones en torno a la familia INF, tanto STAT1 como STAT2 transducen señales predominantemente de INF-I e INF-II (Kisseleva et al., 2002),

Por todo lo anterior, se puede inferir que la alteración en la vía JAK/STAT debida a la sobre expresión de los genes STAT1, STAT2, JAK2 e IL3R deriva de

dos mecanismos diferentes, uno bien definido dado por la desregulación de JAK2 e IL3R que podría derivar en la alteración de la producción de la citoquina IL-3 y por lo tanto en la aparición de microglisis reactiva y posterior neurodegeneración en el cerebro, tan característicos de la EA y, por otro lado, la desregulación de STAT1 y STAT2 que junto con JAK2 están implicados en la activación de la transcripción de múltiples citoquinas de la familia INF, citoquinas tipo gp130 y algunos miembros de la familia IL-2, que pueden desencadenar una respuesta pro inflamatoria crónica, alteraciones en la regulación del ciclo celular y la apoptosis.



**Ilustración 16. Vía de señalización JAK/STAT. En color rosa se identifican los genes involucrados en esta vía que se encuentran sobre expresados.**

#### 4.3.1.2. Vía de señalización de las quimiocinas

Las quimiocinas pertenecen a una familia de citocinas que se expande rápidamente, cuya función principal es el control del correcto posicionamiento de las células en los tejidos y el reclutamiento de leucocitos en el sitio de la inflamación. Hasta el momento, se ha evidenciado inmunoreactividad para una amplia cantidad de quimiocinas (incluida IL-8, IP-10, MIP-1p, MIPa y MCP-1) y receptores de quimiocinas (que incluyen CXCR2, CXCR3, CXCR4, CCR5, CCR5) en células residentes del SNC. La sobre expresión de algunas quimiocinas y receptores se ha asociado con los cambios patológicos de la EA (Xia & Hyman, 1999), entre otras cosas, dado que las quimiocinas secretadas por células microbiales, astrocitos y neuronas pueden inducir la síntesis de ciertas proteínas de fase aguda incluida la

APP. Así mismo, A $\beta$  induce la expresión de diferentes moléculas inflamatorias en cultivos de microglía y astrocitos (Blasko et al., 2000; Streit, Conde, & Harrison, 2001)

En esta investigación se identificaron 6 genes diferencialmente expresados en la vía de señalización de las quimiocinas (ver Ilustración 17), estos genes corresponden a JAK2, STAT1, STAT2. Dada la relación directa de esta vía con la vía JAK/STAT, los tres genes se encontraron sobre expresados. También hubo sobre expresión de los genes del receptor de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCR2) y de la fosfolipasa C - $\beta$ 2 (PLCB2), y sub expresión del gen de la proteína básica de plaquetas (PPBP).

CCR2 es un receptor de quimiocinas expresado en microglía, que media la acumulación de fagocitos mononucleares en el sitio de la inflamación. Para esta investigación el gen se encontró sobre expresado, lo cual es opuesto a lo reportado en modelos murinos que han demostrado en el cerebro de ratones transgénicos con EA se presenta una deficiencia de CCR2 que acelera la progresión de la neurodegeneración en estos ratones mediante la acumulación temprana de A $\beta$ , que conlleva a deterioro de la memoria y muerte prematura (El Khoury et al., 2007; Naert & Rivest, 2011, 2012). Por lo tanto, CCR2 es considerado protector en las primeras etapas de la EA, al mediar la limpieza de acúmulos de A $\beta$  por el reclutamiento de microglía fagocítica (El Khoury et al., 2007).

La contrariedad en los hallazgos reportados en modelos murinos contra lo aquí reportado puede deberse entre otras cosas, a las variaciones en la expresión de CCR2 entre especies, en los ratones la expresión de CCR2 se presenta de manera homóloga como en humanos, cuando se trata de monocitos y entre el 2% y 15% de células T, pero en otras células como los linfocitos asesinos naturales la expresión basal del gen en ratones difiere de la de humanos (Mack et al., 2001) y teniendo en cuenta que para el desarrollo de esta investigación se utilizó sangre periférica como tejido de muestra, es posible que se den sesgos asociados a los diferentes tipos celulares, es por esto que se requiere corroborar los hallazgos aquí

descritos mediante su replicación con el fin de robustecer los hallazgos en humanos y determinar las verdaderas diferencias con respecto a otros animales.

La Fosfolipasa C (PLC) es una enzima que cataliza la hidrólisis de fosfoinosítidos para generar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), los cuales sirven como mensajeros intracelulares para la activación de proteína quinasa C (PKC) y la movilización intracelular de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), respectivamente (Berridge & Irvine, 1984; Pacheco & Jope, 1996; Rhee, Suh, Ryu, & Lee, 1989). Ha habido cada vez más evidencia que sugiere que la vía de transducción de señales de la fosfolipasa C es anormal en la EA (De Sarno, Bijur, Lu, Davis, & Jope, 2000; Degos et al., 2013; Shun Shimohama, Fujimoto, Taniguchi, & Kimura, 1992; S Shimohama et al., 1991; S Shimohama et al., 1995; Young, Talbot, Gao, Trojanowski, & Wolf, 1999)

Múltiples abordajes experimentales han reportado niveles de concentración y actividad de diferentes isoenzimas de la familia PLC anormales en la EA. Estudios en cerebro post mortem de sujetos con EA y controles han evidenciado un incremento en la concentración de la isoenzima PLC- $\delta$  en la región citosólica del tejido cortical en cerebros con EA, en contraste, se han cuantificado bajas concentraciones de PLC- $\delta$  y PLC- $\gamma$  en la región membranosa del tejido cortical de cerebros con EA, mientras que en la corteza frontal no se han identificado niveles alterados de PLC- $\gamma$  (Young et al., 1999); en esta misma región cerebral se han encontrado concentraciones reducidas de PLC- $\beta$  (Young et al., 1999) mientras que modelos en cultivos celulares no reportan diferencias sustanciales en la concentración de PLC- $\beta$  entre casos de EA y controles (De Sarno et al., 2000) lo que sugiere una participación diferencial de las isoenzimas de PLC en la EA (S Shimohama et al., 1995), que además podría ser dependiente de la región cerebral afectada.

Experimentos *in vivo* en ratones P5 e *in vitro* en neuronas humanas expuestas a excitotoxicidad han mostrado una sobre expresión del gen codificante de PLC- $\beta$ , comportamiento que es consistente con el hallazgo de la presente investigación donde PLCB2 se encuentra sobre expresado. Dicha expresión

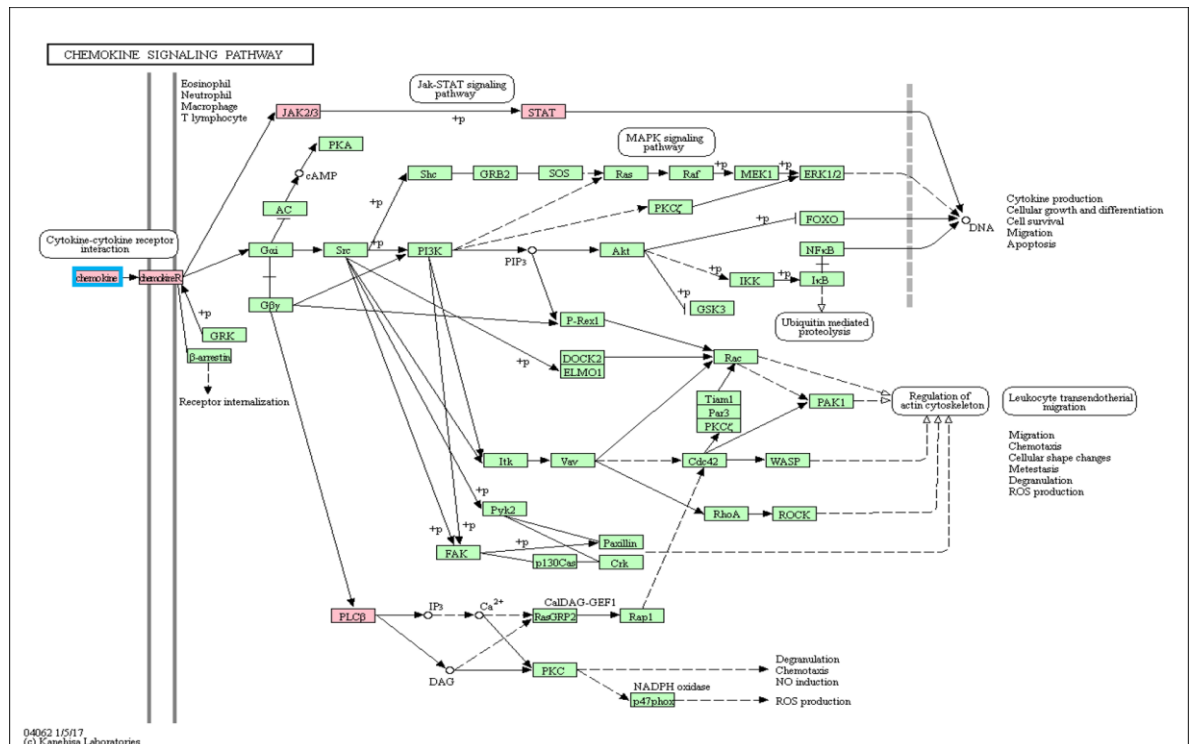
diferencial conlleva al aumento de la liberación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que eventualmente conduce a la muerte celular y al incremento en el estrés oxidativo por la producción de NO y ROS (Degos et al., 2013)

El gen PPBP codifica para el precursor de la proteína básica plaquetaria (PBP) que pertenece a la familia de las quimiocinas CXC y se conoce como una proteína granular de plaquetas (Brandt, Ludwig, Petersen, & Flad, 2000; Brown, Joseph, Sawant, & Rajarathnam, 2017), las plaquetas contribuyen a la inflamación y cooperan con las células inmunes en una magnitud de respuestas inmunes e inflamatorias, aunque la respuesta inflamatoria ha sido reconocida como un mecanismo crítico en enfermedades neuronales incluida la EA, la participación de las plaquetas en estas enfermedades ha sido poco investigada hasta ahora. Estudios emergentes, describen una asociación interesante entre las plaquetas y la neuroinflamación. por ejemplo, cuando la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) se ve comprometida, las plaquetas pueden ser relevantes para la inflamación endotelial, así como para el reclutamiento y activación de células inflamatorias, por lo tanto, pueden potencialmente contribuir a la patogénesis de las demencias. (Langer & Chavakis, 2013)

El hecho de que las plaquetas contienen cantidades sustanciales de APP se ha traducido en la hipótesis de que las plaquetas contribuyen a la EA (Catricala, Torti, & Ricevuti, 2012). Las plaquetas activas pueden mediar el procesamiento de la APP, el  $\text{A}\beta$  y su liberación (Skovronsky, Lee, & Praticò, 2001), lo que puede promover la formación de placas amiloides alrededor de la vasculatura (Catricala et al., 2012; Skovronsky et al., 2001)

En el presente estudio el gen PPBP resultó sub expresado en los caso de EA. Inicialmente se creía que la expresión de PPBP era específica de megacariocitos y plaquetas, sin embargo, posteriormente se logró establecer que además se encuentran en fagocitos mononucleares (El-Gedaily, Schoedon, Schneemann, & Schaffner, 2004), dadas estas circunstancias los estudios de expresión del PPBP han sido pocos dada la dificultad para estudiar a los megacariocitos (Brandt et al., 2000), pero el descubrimiento de la actividad de este

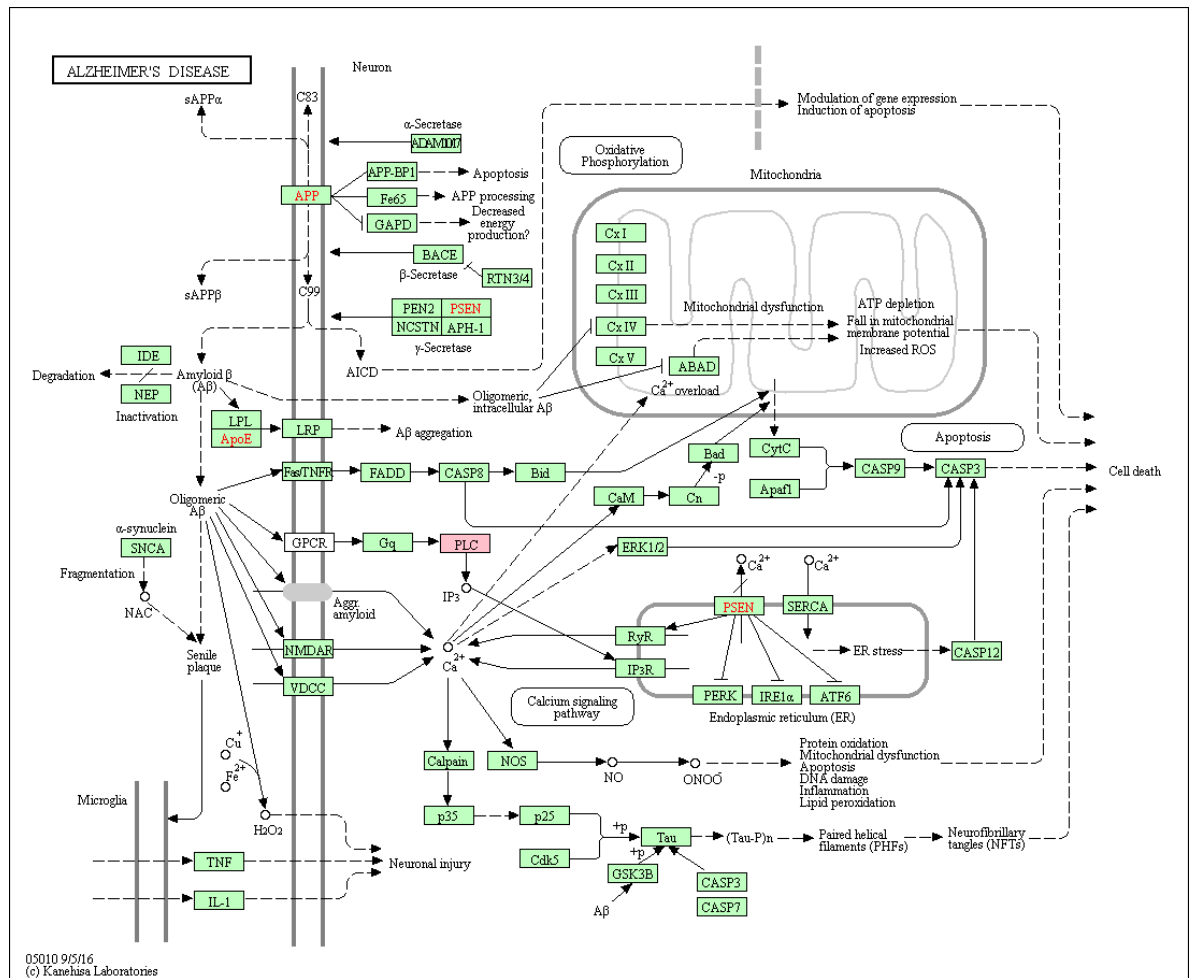
gen en los fagocitos mononucleares permitió ampliar el paradigma; aunque no se encontraron reportes de estudios de la expresión del PPBC en EA, hay evidencia de la expresión constitutiva y regulada de este en monocitos, los cuales afirman que en estimulación con INF- $\gamma$  se presenta sub expresión del PPBP, dichos hallazgos fueron corroborados mediante técnicas moleculares *in vivo* (El-Gedaily et al., 2004). Lo antes mencionado podría explicar el comportamiento del gen en la muestra analizada en este estudio, ya que, como se discutió anteriormente en los resultados del segundo objetivo específico hay una participación importante de la familia INF mediada por la expresión diferencial de algunos de los genes evaluados mediante secuenciación del transcriptoma en sujetos con EA. Teniendo en cuenta lo anterior, es importante continuar con el estudio del gen PPBP y su posible asociación con la familia INF ya que tiene una potencial participación dentro de la fisiopatología de la enfermedad, y podría contribuir a comprender mejor los procesos patológicos de la misma.



**Ilustración 17.** Vía de señalización de las quimiocinas. En color rosa se identifican los genes involucrados en esta vía que se encuentran sobre expresados y en marco celeste se representan los genes sub expresados

#### 4.3.1.3. *Vía de señalización de la Enfermedad de Alzheimer*

Como se describió previamente en la sección de antecedentes, a lo largo de los años, a partir de un sinnúmero de estudios ha sido posible proponer una vía de señalización específica para la EA asociada a un trastorno hereditario autosómico dominante, comúnmente conocida como EA de inicio temprano o EA de tipo familiar, que se caracteriza por mutaciones en genes específicos, procesos neurodegenerativos y deterioro cognitivo. Por otra parte, existe la EA de inicio tardío, la cual no tiene un patrón hereditario bien definido pero que comparte características fisiopatológicas y clínicas con la EA temprana. El abordaje de esta investigación estuvo centrado en la EA de inicio tardío, pero dado que esta comparte con la EA temprana las manifestaciones histopatológicas y el riesgo asociado a APOE entre otros, la vía específica para la EA de inicio temprano fue tomada en cuenta para el desarrollo de los análisis, con el fin de establecer aspectos comunes entre ambos subtipos. En este estudio se encontró sobre expresión del gen PLCB2, previamente descrito en la vía de señalización de las quimiocinas. Por otra parte, los genes característicos de la EA de inicio temprano: APP, APOE, PSEN1 y PSEN2 no evidencian expresión diferencial entre casos y controles (ver Ilustración 18), lo que sugiere que, efectivamente los casos de EA elegidos para analizar en el presente estudio corresponden a la forma de inicio tardío.



**Ilustración 18. Vía de señalización de la Enfermedad de Alzheimer. En color rosa se identifica el gen de la fosfolipasa C-B2 (PLCB2) el cual se encuentra sobre expresado en los casos. En color rojo se representan los genes característicos de la EA temprana.**

PLCB2, como se mencionó previamente, está involucrado en los fenómenos de muerte celular, el incremento en el estrés oxidativo que conlleva a la disfunción mitocondrial (Degos et al., 2013) y de manera indirecta, dado su efecto catalítico que conduce a la producción de IP3 que activa a la PK3, tiene efectos sobre la regulación de la cascada de las quinasas a nivel cerebral, específicamente la vía de las MAPK, cuyo rol en la EA se describe posteriormente en esta investigación.

#### 4.3.1.4. *Vía de señalización de las MAPK*

La cascada de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es un módulo altamente conservado que participa en varias funciones celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación y migración celular (Kanehisa et al., 2017). Como se mencionó en la sección de antecedentes, en mamíferos existen cuatro subgrupos de MAPK: ERK, p38-MAPK, JNK y ERK5. En el actual estudio, dos genes que participan de la cascada MAPK resultaron diferencialmente expresados: TAK1 y NLK, ambos hacen parte del subtipo de quinasas JNK y codifican para la proteína quinasa activada por TGF- $\beta$ ; y la quinasa tipo nemo, respectivamente

En la presente investigación se encontró que TAK1 estuvo sub expresado mientras que NLK estuvo sobre expresado (ver Ilustración 19) en los casos de EA en comparación con los controles.

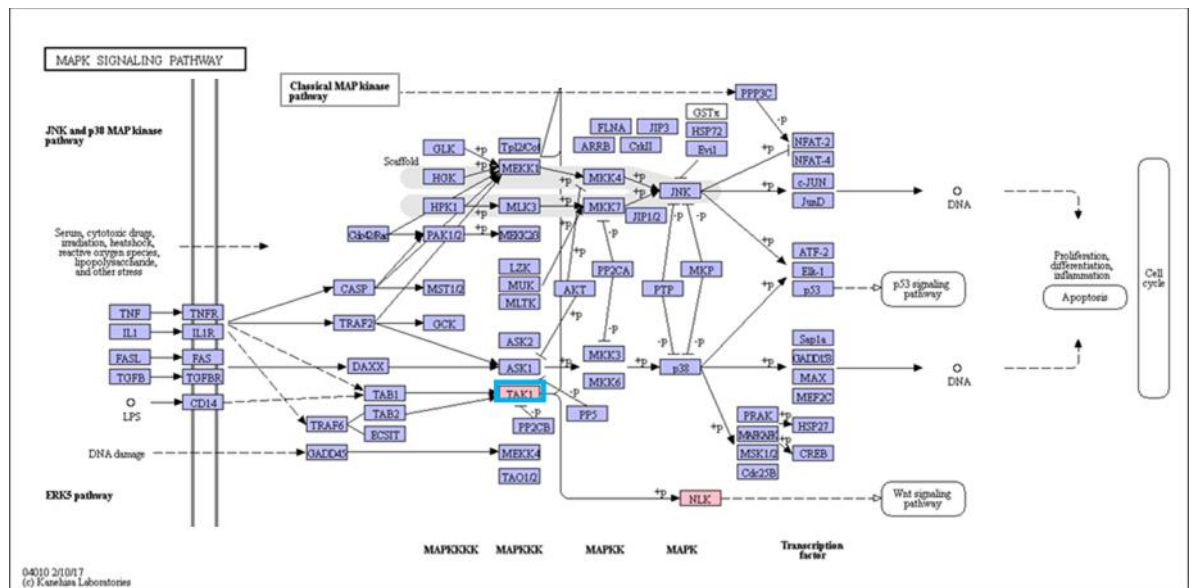
No se encontraron evidencias en literatura que permitan vislumbrar el peso específico de la expresión de los genes TAK1 y NLK sobre la vía de señalización de MAPK en EA, sin embargo, existe evidencia de la expresión total de quinasas JNK a partir de la cual se pueden establecer inferencias respecto a la expresión de TAK1 y NLK.

Se cree que el estrés oxidativo es un factor de riesgo clave en la desarrollo de la EA, tal estrés es a menudo desencadenado por ROS que son activadores típicos de las vías de señalización JNK y p38-MAPK en EA (Tabner et al., 2005; Zhu, Lee, Raina, Perry, & Smith, 2002)

Estudios en tejido cerebral post mortem, sangre periférica y modelos celulares concuerdan en que durante la EA, especialmente en estadios tempranos, se presenta un aumento significativo de la expresión de los genes asociados al subtipo de quinasas JNK; cuando los productos proteicos de éstos son fosforilados pueden contribuir a la formación de NFT y, de esta manera, contribuir a la neurodegeneración de la EA (Pearson, Byrne, MacGibbon, Faull, & Dragunow, 2006; Sun, Liu, Nguyen, & Bing, 2003; S. Wang et al., 2014). También, se ha reportado que las quinasas JNK forman complejos de señalización en el cerebro de

ratones APP transgénicos, e induce la apoptosis neuronal (Galvan et al., 2007; Marques et al., 2003; Puig et al., 2004)

A pesar de que los hallazgos reportados por otros estudios son valiosos para comprender el rol de la expresión diferencial de subtipos de MAPK, la evidencia no es suficiente para poder hacer inferencias a la luz de los hallazgos particulares en TAK1 y NLK en esta investigación, ya que no se encontraron reportes que especifiquen el nivel de expresión génica de cada una de estas quinasas sino la expresión total del subtipo; además, la metodología de la mayoría de estos estudios aborda la expresión desde la cuantificación de proteína total presente en el tejido y no desde los transcritos del gen, por lo tanto, las inferencias alrededor de este tipo de hallazgos deben ser cautelosas, pues muchas veces el nivel de expresión de un gen no es equivalente a la cantidad de proteína sintetizada (McAdams & Arkin, 1997). De tal forma, se hace necesario ampliar los estudios alrededor de las quinasas específicas de cada subtipo a la luz de la actividad transcripcional para determinar su rol en la EA.



**Ilustración 19.**Vía de señalización de las MAP quinasas (subtipo JNK). En marco celeste se representa el gen TAK1 que esta sub expresado y en color rosa el gen NLK el cual se encuentra sobre expresado en los casos de Alzheimer.

#### 4.3.1.5. *Vías de señalización de TNF e IL-17*

A pesar de que para estas vías apenas se identificó un DEG en esta investigación, este modesto hallazgo se reporta a continuación dado que, tanto IL-17 como TNF hacían parte de los genes candidatos para EA propuestos inicialmente y evaluados por RT-PCR.

Para esta investigación se propuso la hipótesis de que la presencia de SNP en los genes candidatos tenía un efecto directo sobre la expresión de los mismos, sin embargo, esta premisa no se pudo corroborar dado que, no hubo concordancia entre los DEG y los genes cuyos SNP fueron evaluados, por lo tanto, los hallazgos se han limitado a identificar DEG que al menos se encuentren involucrados en las vías de señalización de los genes candidatos, de manera que al menos de forma indirecta sea posible identificar tendencia a la interacción entre los genes de ambos planteamientos.

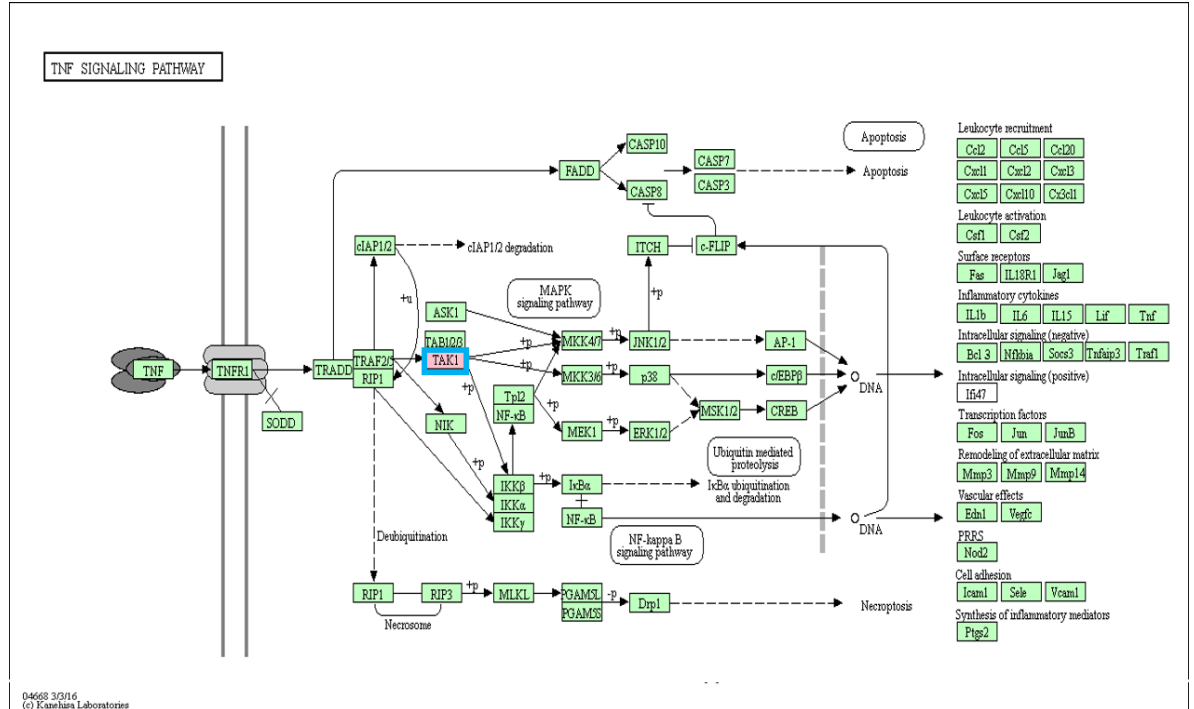
Para ambas vías se presentó subexpresión de TAK1 (ver Ilustración 20 e Ilustración 21), un componente de la vía MAPK, previamente descrito en la subsección de discusión de resultados de la misma.

El gen TAK1 está implicado en la señalización de la citoquina pro inflamatoria TNF- $\alpha$ , dado que esta última junto con la IL-1 $\beta$  son activadores de la vía de señalización JNK que hace parte de la cascada MAPK (E. K. Kim & Choi, 2010).

La señalización del TNF- $\alpha$  es controlada principalmente por dos vías distintas, la NF- $\kappa$ B y la cascada de las MAPK (G. Chen & Goeddel, 2002). TAK1 tiene su rol en la señalización de TNF- $\alpha$  a través de la activación de factores de transcripción que inducen mecanismos de muerte/supervivencia celular.

La actividad de TAK1 es fundamental para la señalización de TNF ya que activa una serie de quinasas que desencadenan en la activación de la vía JNK (G. Chen & Goeddel, 2002), que, como se mencionó previamente está implicada en el deterioro de la memoria, el tiempo de evolución y la severidad de la EA (T. Wang, 2015). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo por el cual TAK1 es reclutada dentro de la vía de señalización del TNF- $\alpha$  y activada dentro del complejo del receptor en respuesta a TNF- $\alpha$  (G. Chen & Goeddel, 2002). Sin embargo, pareciera

ser que el gen TAK1 tiene potencial como biomarcador dentro de la EA por lo que se recomienda indagar más a fondo sobre este gen, especialmente mediante aproximaciones experimentales que permitan esclarecer su comportamiento *in vivo*.



**Ilustración 20.** Vía de señalización del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-A) en marco celeste se representa el gen TAK1 el cual se encuentra subexpresado en los casos de EA

En el caso de la vía de señalización de IL-17, TAK1 es un activador de la vía de señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que activa la transcripción de diferentes moléculas inflamatorias varias de las cuales parecen estar involucradas en la EA.

La IL-17 tiene un rol sinérgico al de la IL-1 $\beta$  y al TNF- $\alpha$  en lo referente a la activación de la producción de moléculas inflamatorias. La activación de la vía de señalización del NF- $\kappa$ B es dependiente de la fosforilación y la degradación de los inhibidores de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) a través de las quinasas de I $\kappa$ B (IKK), pero, para que este proceso se pueda dar es necesaria la intervención de TAK1 como quinasa intermedia. En ausencia de actividad NF- $\kappa$ B, la susceptibilidad celular a la apoptosis incrementa (G. Chen & Goeddel, 2002), de manera que, podría esperarse que si hay una subexpresión del gen TAK1 en los casos de EA en comparación con los

controles, habrá una menor activación de IKK y por lo tanto menor actividad de NF- $\kappa$ B lo que contribuiría a la muerte celular por apoptosis, y si además se tiene en cuenta que en la EA parece haber una desregulación del ciclo celular que lleva a las células a trascender de un estado apoptótico a uno neurodegenerativo, la afectación en la expresión de este gen también podría estar relacionada con la hiperfosforilación de proteínas en la EA.

Es de aclarar, que el anterior planteamiento se propone a la luz de las evidencias teóricas y experimentales que hay en torno a la fisiopatología y los procesos inmunes en la EA, pero que, estas interpretaciones deben tenerse en cuenta de manera discreta, ya que es necesario realizar estudios experimentales que corroboren esta hipótesis.

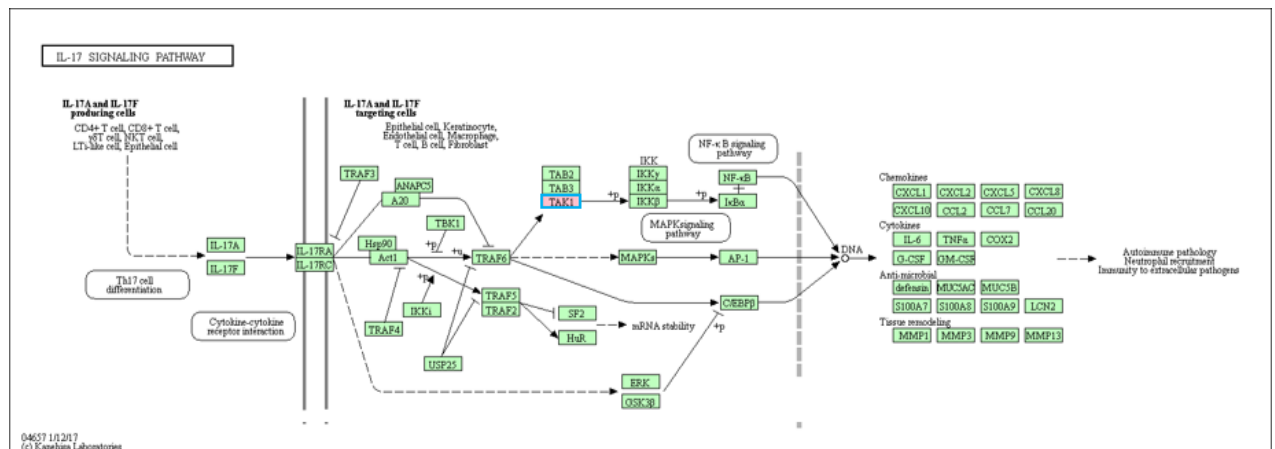


Ilustración 21. Vía de señalización de la interleucina 17 alfa (IL17A). En marco celeste se representa el gen TAK1 el cual se encuentra sub expresado en los casos de EA.

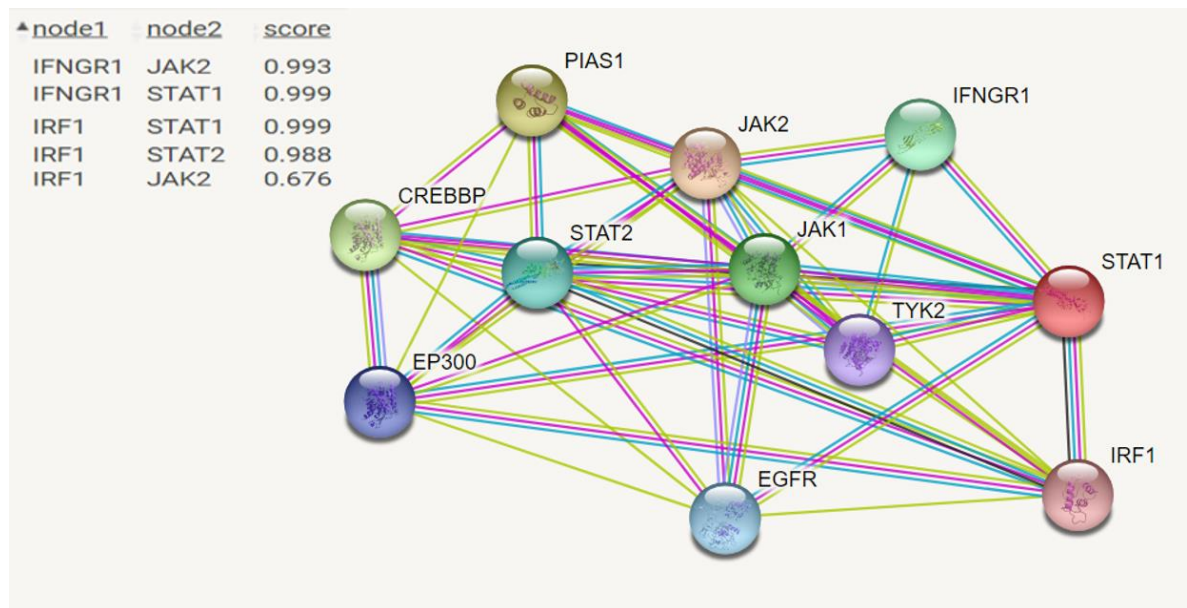
#### 4.3.2. Redes de interacción entre productos proteicos

Se efectuó la construcción de la red de asociación funcional de los productos proteicos de los genes diferencialmente expresados dentro de la vías de señalización seleccionadas y los genes candidatos para RT-PCR. El interés estuvo centrado en las interacciones entre estos productos que han sido determinadas experimentalmente y su asociación es comprobada. Bajo este criterio, no se encontraron interacciones entre los DEG y los genes candidatos, sin embargo, el

análisis arrojó hallazgos que permiten fortalecer los reportados en el análisis de ontología de genes efectuado en el objetivo específico número dos.

#### 4.3.2.1. *Productos de la vía de señalización JAK/STAT*

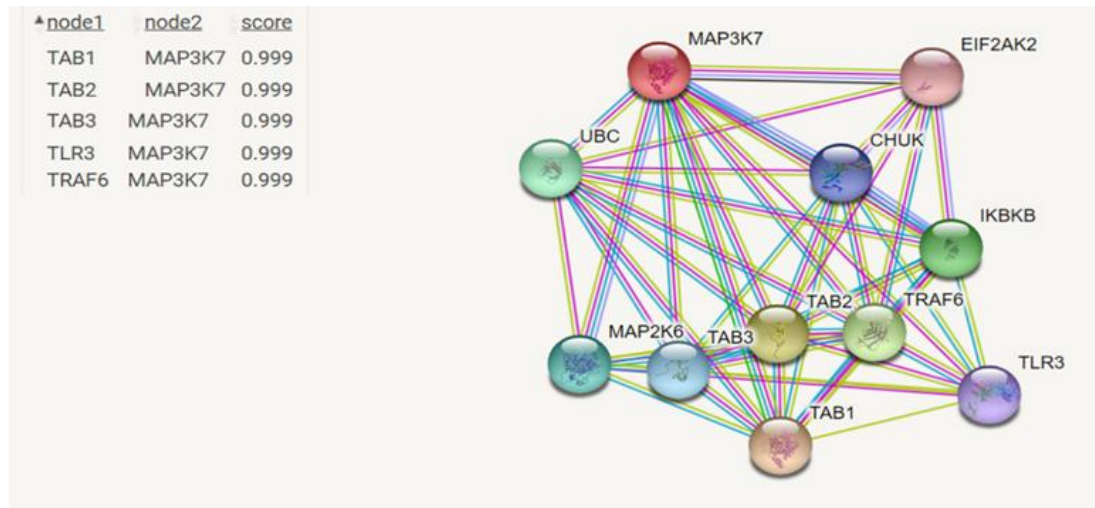
Se reconstruyó la red de asociación de los productos de los DEG presentes en la vías descritas en la sección previa con el fin de determinar interacciones con alguno de los productos de los genes candidatos iniciales o de los identificados en esta investigación. Así, se identificó una interacción de interés entre los productos de STAT1, STAT2 y JAK2 con productos de la familia interferón (ver Ilustración 22) lo cual da solidez a los hallazgos realizados mediante el enriquecimiento con GO; estos productos están en interacción con el factor 1 regulador de interferón (IFNGR1) un factor de transcripción de la familia Interferón que participa como activador de la transcripción de IFN-1. También, se pudo establecer la asociación de estos productos con el receptor 1 del interferón gamma (IRF1). Todas las asociaciones han sido comprobadas experimentalmente a excepción de la asociación entre JAK2 e IRF1, la cual es solo teórica.



**Ilustración 22.** Interacción entre los productos de la vía JAK/STAT con productos de la familia INF.

#### 4.3.2.2. *Productos de las vías de señalización del TNF, de IL-17 y de MAPK*

En las vías de IL-17, MAPK y TNF hay participación del gen TAK1, el cual se encuentra sub expresado en los casos de Alzheimer. TAK1 se encuentra relacionados a múltiples productos asociados a la familia de factores de crecimiento transformante (TGF) (ver Ilustración 23) entre ellos se incluyen factores de transcripción y receptores, lo cual es de esperarse dado que TAK1 es principalmente activado en respuesta a TGF- $\alpha$ .



**Ilustración 23. Interacciones de TAK1 con productos de la familia TGF.**

A manera de síntesis, es posible mencionar que los cambios inflamatorios en la EA están dados por la acción de A $\beta$  y la p-tau como activadores de la respuesta inflamatoria en forma de astrogliosis y microgliosis principalmente. La presencia de estas marcas neuropatológicas desencadena la activación de diversos factores de transcripción entre los que se incluye el NF- $\kappa$ B como principal activador de la transcripción de genes de citoquinas; quien a su vez está relacionado con la actividad de las MAPK las cuales también contribuyen a la señalización de la producción de citoquinas y quimiocinas, moléculas que al mismo tiempo contribuyen a la activación de microglía y astrocitos, lo que perpetúa los mecanismos inflamatorios, de manera que los mecanismos inflamatorios en la EA se convierten en una respuesta cíclica desinhibida.

## **5. CONCLUSIONES GENERALES**

### **5.1. Contribuciones de la Tesis**

1. Contribuciones al campo investigativo de la tesis: Se considera que la tesis propuesta, realiza un valioso aporte al conocimiento de los mecanismos genéticos neuro inflamatorios involucrados en la EA, lo que permite enriquecer los factores asociados al desencadenamiento y el progreso de la enfermedad para la investigación de futuras dianas terapéuticas.

Contribuciones al sector socioeconómico relacionado: Los aportes en la patogenia inflamatoria de la EA ayudan a soportar hallazgos empíricos previos, dando lugar a la postulación de nuevas medidas de intervención con la subsiguiente disminución en los costos asociados a la morbilidad y mortalidad de la EA.

Contribuciones académicas: Con el desarrollo del presente trabajo se logró contribuir a la cimentación y consolidación de la línea de biología celular y molecular adscrita al grupo de investigación Neuroaprendizaje, además, se abrieron nuevas perspectivas de investigación en torno al campo de la bioinformática.

### **5.2. Impactos Potenciales de la Tesis**

IMPACTOS A CORTO PLAZO (0 A 4 AÑOS):

1. Fortalecimiento del recurso humano del grupo de investigación Neuroaprendizaje, gracias a la formación académica en bioinformática y a la participación de estudiantes de semilleros de investigación de la UAM

2. Mejoramiento de los protocolos de investigación en el área de biología celular y molecular, gracias a la implementación de nuevas técnicas de recolección y análisis de la información.

3. Aporte a la comunidad científica de nuevos hallazgos relacionados con el perfil genético neuro inflamatorio asociado a la EA en la población colombiana, a través de la divulgación de la información en publicaciones científicas y eventos académicos relacionados.

#### IMPACTOS A MEDIANO PLAZO (4 A 8 AÑOS):

1. Aporte de conocimiento que cimienta la formulación de teorías y modelos emergentes que permitan entender mejor la etiopatogenia asociada a la EA

#### IMPACTOS A LARGO PLAZO (MÁS DE 8 AÑOS):

1. Apertura o fortalecimiento de diversos campos de estudio para la creación de nuevas medidas terapéuticas que puedan ser más eficaces en el manejo de la EA.

### **5.3. Recomendaciones y trabajos futuros**

1. Se recomienda a futuro poder realizar trabajos intergrupales donde se involucren grupos de investigación regionales y nacionales para continuar con la caracterización genética de población colombiana en relación con los factores inflamatorios asociados a la EA.

2. Dado que la EA se comporta como una entidad multifactorial, se recomienda la formulación de nuevos modelos etiopatogénicos que incluyan los nuevos aportes emergentes desde áreas como la neuroinmunogenética.

3. Tomando como referencia la base de datos de sujetos de investigación generada a partir de esta tesis, se sugiere a futuro realizar la caracterización demográfica y epidemiológica de esta población con el fin de identificar la población en riesgo de EA y contribuir al desarrollo socioeconómico de la región.

4. Dado que hasta el momento no existen reportes de estudios que analicen niveles de expresión génica en sujetos colombianos con EA, se sugiere replicar estudios de la misma naturaleza del aquí expuesto con el fin de corroborar los hallazgos y enriquecer el modelo fisiopatológico de la EA en población colombiana.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, N., Bednar, I., Mix, E., Marie, S., Paterson, D., Ljungberg, A., . . . Zhu, J. (2002). Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP SWE transgenic mice. *Journal of neuroimmunology*, 126(1), 50-57.
- Anders, S., & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), R106.
- Appel, K., Buttini, M., Sauter, A., & Gebicke-Haerter, P. (1995). Cloning of rat interleukin-3 receptor beta-subunit from cultured microglia and its mRNA expression in vivo. *Journal of Neuroscience*, 15(8), 5800-5809.
- Araujo, D., & Lapchak, P. (1994). Induction of immune system mediators in the hippocampal formation in Alzheimer's and Parkinson's diseases: selective effects on specific interleukins and interleukin receptors. *Neuroscience*, 61(4), 745-754.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., . . . Eppig, J. T. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1), 25.
- Bagnoli, S., Piaceri, I., Tedde, A., Bessi, V., Bracco, L., Sorbi, S., & Nacmias, B. (2013). TOMM40 polymorphisms in Italian Alzheimer's disease and frontotemporal dementia patients. *Neurological Sciences*, 34(6), 995-998.
- Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S. A., & Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clinical interventions in aging*, 9, 535.
- Batalla Cebey, A. (2015). Estudio de las variaciones de los genes de la familia de la Interleucina 17 en pacientes con psoriasis.
- Bekris, L. M., Galloway, N. M., Montine, T. J., Schellenberg, G. D., & Yu, C. E. (2010). APOE mRNA and protein expression in postmortem brain are modulated by an extended haplotype structure. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 153(2), 409-417.
- Belkhelda, M., Rafa, H., Medjeber, O., Arroul-Lammali, A., Behairi, N., Abada-Bendib, M., . . . Tazir, M. (2014). IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are involved during

- Alzheimer disease progression and correlate with nitric oxide production: a study in Algerian patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(11), 839-847.
- Bennett, D., Schneider, J., Arvanitakis, Z., Kelly, J., Aggarwal, N., Shah, R., & Wilson, R. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*, 66(12), 1837-1844.
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992), 315-321.
- Bizzarro, A., Seripa, D., Acciarri, A., Matera, M. G., Pilotto, A., Tiziano, F. D., . . . Masullo, C. (2009). The complex interaction between APOE promoter and AD: an Italian case–control study. *European Journal of Human Genetics*, 17(7), 938.
- Blalock, E. M., Geddes, J. W., Chen, K. C., Porter, N. M., Markesbery, W. R., & Landfield, P. W. (2004). Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2173-2178.
- Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P., & Grubeck-Loebenstein, B. (2000). Costimulatory effects of interferon- $\gamma$  and interleukin-1 $\beta$  or tumor necrosis factor  $\alpha$  on the synthesis of A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 by human astrocytes. *Neurobiology of disease*, 7(6), 682-689.
- Boutboul, D., Vince, N., Mahevas, M., Bories, J.-C., Fieschi, C., & Group, D. S. (2016). TNFA, ANXA11 and BTNL2 polymorphisms in CVID patients with granulomatous disease. *Journal of clinical immunology*, 36(2), 110-112.
- Brandt, E., Ludwig, A., Petersen, F., & Flad, H. D. (2000). Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunological reviews*, 177(1), 204-216.
- Bro, R., & Smilde, A. K. (2014). Principal component analysis. *Analytical Methods*, 6(9), 2812-2831.

- Brown, A. J., Joseph, P. R. B., Sawant, K. V., & Rajarathnam, K. (2017). Chemokine CXCL7 Heterodimers: Structural Insights, CXCR2 Receptor Function, and Glycosaminoglycan Interactions. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 748.
- Busser, J., Geldmacher, D. S., & Herrup, K. (1998). Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *Journal of Neuroscience*, 18(8), 2801-2807.
- Byrne, S., Elamin, M., Bede, P., Shatunov, A., Walsh, C., Corr, B., . . . Lynch, C. (2012). Cognitive and clinical characteristics of patients with amyotrophic lateral sclerosis carrying a C9orf72 repeat expansion: a population-based cohort study. *The Lancet Neurology*, 11(3), 232-240.
- Carrasquillo, M. M., Zou, F., Pankratz, V. S., Wilcox, S. L., Ma, L., Walker, L. P., . . . Bisceglia, G. D. (2009). Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(2), 192-198.
- Caselli, R. J., Dueck, A. C., Huentelman, M. J., Lutz, M. W., Saunders, A. M., Reiman, E. M., & Roses, A. D. (2012). Longitudinal modeling of cognitive aging and the TOMM40 effect. *Alzheimer's & Dementia*, 8(6), 490-495.
- Catricala, S., Torti, M., & Ricevuti, G. (2012). Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. *Immunity & Ageing*, 9(1), 20.
- Coccia, E. M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M. E., Julkunen, I., . . . Uzé, G. (2004). Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and  $\lambda$  interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *European journal of immunology*, 34(3), 796-805.
- Ley 1286 de 2009, 1286 C.F.R. (2009).
- Consortium, G. O. (2015). Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic acids research*, 43(D1), D1049-D1056.
- Czeh, M., Gressens, P., & Kaindl, A. M. (2011). The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience*, 33(3-4), 199-209.

- Chen, G., & Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 296(5573), 1634-1635.
- Chen, J., Baig, E., & Fish, E. N. (2004). Diversity and relatedness among the type I interferons. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 24(12), 687-698.
- Chen, X.-F., Zhang, Y.-w., Xu, H., & Bu, G. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 6(1), 44.
- Chung, S. J., Kim, M.-J., Kim, J., Kim, Y. J., You, S., Koh, J., . . . Lee, J.-H. (2014). Exome array study did not identify novel variants in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 35(8), 1958. e1913-1958. e1914.
- Chung, S. J., Lee, J.-H., Kim, S. Y., You, S., Kim, M. J., Lee, J.-Y., & Koh, J. (2013). Association of GWAS top hits with late-onset Alzheimer disease in Korean population. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 27(3), 250-257.
- Dá Mesquita, S., Ferreira, A. C., Gao, F., Coppola, G., Geschwind, D. H., Sousa, J. C., . . . Marques, F. (2015). The choroid plexus transcriptome reveals changes in type I and II interferon responses in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 280-292.
- De Sarno, P., Bijur, G. N., Lu, R., Davis, R. E., & Jope, R. S. (2000). Alterations in muscarinic receptor-coupled phosphoinositide hydrolysis and AP-1 activation in Alzheimer's disease cybrid cells☆. *Neurobiology of aging*, 21(1), 31-38.
- De Weerd, N. A., & Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors—distribution and regulation. *Immunology and cell biology*, 90(5), 483-491.
- De Weerd, N. A., Vivian, J. P., Nguyen, T. K., Mangan, N. E., Gould, J. A., Braniff, S.-J., . . . Beddoe, T. (2013). Structural basis of a unique interferon-[beta] signaling axis mediated via the receptor IFNAR1. *Nature immunology*, 14(9), 901-907.
- Degos, V., Peineau, S., Nijboer, C., Kaindl, A. M., Sigaut, S., Favrais, G., . . . Lombet, A. (2013). GRK2 and group I mGluR mediate inflammation-induced sensitization to excitotoxic neurodegeneration. *Annals of neurology*, 73(5).

- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Mailliot, C., Sambo, A. V., Bégard, S., . . . Buée, L. (2002). Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *Journal of neurochemistry*, 83(2), 412-420.
- DeSA, U. N. (2015). *World population prospects: the 2015 revision*. New York: United Nations Secretariat.
- Deshpande, S., Prasad, S., Semwal, P., Bhatia, T., Nimgaonkar, V., & Thelma, B. (2017). Replication Study Of Gwas And Other Strongly Associated Markers From Chromosome 6 In North Indian Population. *European Neuropsychopharmacology*, 27, S457.
- Di Bona, D., Candore, G., Franceschi, C., Licastro, F., Colonna-Romano, G., Cammà, C., . . . Caruso, C. (2009). Systematic review by meta-analyses on the possible role of TNF- $\alpha$  polymorphisms in association with Alzheimer's disease. *Brain research reviews*, 61(2), 60-68.
- Doong, S.-H., Dhruva, A., Dunn, L. B., West, C., Paul, S. M., Cooper, B. A., . . . Langford, D. J. (2015). Associations between cytokine genes and a symptom cluster of pain, fatigue, sleep disturbance, and depression in patients prior to breast cancer surgery. *Biological research for nursing*, 17(3), 237-247.
- Eikelenboom, P., Van Exel, E., Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., Rozemuller, A. J., & Van Gool, W. A. (2010). Neuroinflammation—an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases*, 7(1-3), 38-41.
- El-Gedaily, A., Schoedon, G., Schneemann, M., & Schaffner, A. (2004). Constitutive and regulated expression of platelet basic protein in human monocytes. *Journal of leukocyte biology*, 75(3), 495-503.
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., & Luster, A. D. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nature medicine*, 13(4), 432.
- Enciu, A.-M., & Popescu, B. O. (2013). Is there a causal link between inflammation and dementia? *BioMed research international*, 2013.

- Eriksson, U. K., Pedersen, N. L., Reynolds, C. A., Hong, M.-G., Prince, J. A., Gatz, M., . . . Bennet, A. M. (2011). Associations of gene sequence variation and serum levels of C-reactive protein and interleukin-6 with Alzheimer's disease and dementia. *Journal of Alzheimer's Disease, 23*(2), 361-369.
- Farrar, M. A., & Schreiber, R. D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annual review of immunology, 11*(1), 571-611.
- Feld, M., Krawczyk, M. C., Sol Fustinana, M., Blake, M. G., Baratti, C. M., Romano, A., & Boccia, M. M. (2014). Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease, 40*(1), 69-82.
- Ferencz, B., Karlsson, S., & Kalpouzou, G. (2012). Promising genetic biomarkers of preclinical Alzheimer's disease: the influence of APOE and TOMM40 on brain integrity. *International Journal of Alzheimer's Disease, 2012*.
- Flex, A., Giovannini, S., Biscetti, F., Liperoti, R., Spalletta, G., Straface, G., . . . Ghirlanda, G. (2014). Effect of proinflammatory gene polymorphisms on the risk of Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Diseases, 13*(4), 230-236.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research, 12*(3), 189-198.
- Galvan, V., Banwait, S., Spilman, P., Gorostiza, O. F., Peel, A., Ataie, M., . . . Ichijo, H. (2007). Interaction of ASK1 and the  $\beta$ -amyloid precursor protein in a stress-signaling complex. *Neurobiology of disease, 28*(1), 65-75.
- Gobernación de Caldas. (2016). *Plan de Desarrollo Departamental 2016-2019*. Manizales Retrieved from <https://caldas.gov.co/index.php/inicio/nuestro-gestion/plan-de-desarrollo-2016-2019>.
- Goh, L. K., Lim, W. S., Teo, S., Vijayaraghavan, A., Chan, M., Tay, L., . . . Chong, M. S. (2015). TOMM40 alterations in Alzheimer's disease over a 2-year follow-up period. *Journal of Alzheimer's Disease, 44*(1), 57-61.
- Guerreiro, R., & Hardy, J. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics, 11*(4), 732-737.

- Guerreiro, R. J., & Hardy, J. (2012). TOMM40 association with Alzheimer disease: tales of APOE and linkage disequilibrium. *Archives of neurology*, *69*(10), 1243-1244.
- Hamdane, M., Delobel, P., Sambo, A.-V., Smet, C., Bégard, S., Violleau, A., . . . Flament, S. (2003). Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochemical pharmacology*, *66*(8), 1619-1625.
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, *10*(11), 1387.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., . . . Williams, A. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, *41*(10), 1088-1093.
- Harris, P. L., Zhu, X., Pamies, C., Rottkamp, C. A., Ghanbari, H. A., McShea, A., . . . Smith, M. A. (2000). Neuronal polo-like kinase in Alzheimer disease indicates cell cycle changes. *Neurobiology of aging*, *21*(6), 837-841.
- Hashioka, S., Klegeris, A., Schwab, C., & McGeer, P. L. (2009). Interferon- $\gamma$ -dependent cytotoxic activation of human astrocytes and astrocytoma cells. *Neurobiology of aging*, *30*(12), 1924-1935.
- He, Y., Li, C., Yang, Y., Li, Y., Wang, Y., Yang, H., . . . Chen, S. (2016). Meta-analysis of the rs2075650 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Aging clinical and experimental research*, *28*(5), 805-811.
- Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, *117*(8), 919-947.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *16*(6), 358.

- Holmes, C., & Butchart, J. (2011). Systemic inflammation and Alzheimer's disease: Portland Press Limited.
- Holland, S. M. (2008). Principal components analysis (PCA). *Department of Geology, University of Georgia, Athens, GA, 30602-32501*.
- Homer, N. (2011). *TMAP: the Torrent mapping program*: Ion Torrent Systems Inc. .
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., & Asagiri, M. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, *434*(7034), 772.
- Humphries, A. D., Streimann, I. C., Stojanovski, D., Johnston, A. J., Yano, M., Hoogenraad, N. J., & Ryan, M. T. (2005). Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 11535-11543.
- Hurd, M. D., Martorell, P., Delavande, A., Mullen, K. J., & Langa, K. M. (2013). Monetary costs of dementia in the United States. *New England Journal of Medicine*, *368*(14), 1326-1334.
- Hyman, B. T., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Carrillo, M. C., . . . Masliah, E. (2012). National Institute on Aging–Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, *8*(1), 1-13.
- In'T Veld, B. A., Ruitenber, A., Hofman, A., Launer, L. J., van Duijn, C. M., Stijnen, T., . . . Stricker, B. H. (2001). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, *345*(21), 1515-1521.
- Jaworski, T., Lechat, B., Demedts, D., Gielis, L., Devijver, H., Borghgraef, P., . . . Van Leuven, F. (2011). Dendritic degeneration, neurovascular defects, and inflammation precede neuronal loss in a mouse model for tau-mediated neurodegeneration. *The American journal of pathology*, *179*(4), 2001-2015.
- Jay, T. R., von Saucken, V. E., & Landreth, G. E. (2017). TREM2 in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurodegeneration*, *12*(1), 56.
- Jensen, L. J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., . . . Simonovic, M. (2008). STRING 8—a global view on proteins and their

- functional interactions in 630 organisms. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_1), D412-D416.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic acids research*, 45(D1), D353-D361.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Karp, G. (2009). *Cell and molecular biology: concepts and experiments* (6th edition ed.). New York: J. Wiley.
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology*, 7(2), 131.
- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., . . . Prat, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nature medicine*, 13(10), 1173.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461-553.
- Kim, E. K., & Choi, E.-J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396-405.
- Kim, S., Swaminathan, S., Shen, L., Risacher, S., Nho, K., Foroud, T., . . . Huentelman, M. (2011). Genome-wide association study of CSF biomarkers A $\beta$ 1-42, t-tau, and p-tau181p in the ADNI cohort. *Neurology*, 76(1), 69-79.
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., & Schindler, C. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1), 1-24.
- Klegeris, A., Bissonnette, C. J., & McGeer, P. L. (2005). Modulation of human microglia and THP-1 cell toxicity by cytokines endogenous to the nervous system. *Neurobiology of aging*, 26(5), 673-682.

- Klegeris, A., & McGeer, P. L. (2003). Toxicity of human monocytic THP-1 cells and microglia toward SH-SY5Y neuroblastoma cells is reduced by inhibitors of 5-lipoxygenase and its activating protein FLAP. *Journal of leukocyte biology*, 73(3), 369-378.
- Knecht, R., Elez, R., Oechler, M., Solbach, C., von Ilberg, C., & Strebhardt, K. (1999). Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research*, 59(12), 2794-2797.
- Koch, W., Ehrenhaft, A., Griesser, K., Pfeufer, A., Müller, J., Schömig, A., & Kastrati, A. (2002). TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding apolipoprotein E. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 40(11), 1123-1131.
- Kondratick, C. M., & Vandr e, D. D. (1996). Alzheimer's Disease Neurofibrillary Tangles Contain Mitosis-Specific Phosphoepitopes. *Journal of neurochemistry*, 67(6), 2405-2416.
- Koyama, A., O'Brien, J., Weuve, J., Blacker, D., Metti, A. L., & Yaffe, K. (2012). The role of peripheral inflammatory markers in dementia and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 68(4), 433-440.
- Kuhn, H. G., Cooper-Kuhn, C. M., Boekhoorn, K., & Lucassen, P. J. (2007). Changes in neurogenesis in dementia and Alzheimer mouse models: are they functionally relevant? *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 257(5), 281-289.
- Langer, H. F., & Chavakis, T. (2013). Platelets and neurovascular inflammation. *Thromb Haemost*, 110(5), 888-893.
- Lasprilla, J. C. A., & Rivera, D. (2015). *Neuropsicología en Colombia: datos normativos, estado actual y retos a futuro*: Universidad Autonom a de Manizales.
- Lassmann, T., Hayashizaki, Y., & Daub, C. O. (2010). SAMStat: monitoring biases in next generation sequencing data. *Bioinformatics*, 27(1), 130-131.

- Laws, S. M., Hone, E., Gandy, S., & Martins, R. N. (2003). Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *Journal of neurochemistry*, *84*(6), 1215-1236.
- Lee, H.-C., Tan, K.-L., Cheah, P.-S., & Ling, K.-H. (2016). Potential role of JAK-STAT signaling pathway in the neurogenic-to-gliogenic shift in down syndrome brain. *Neural plasticity*, 2016.
- Lee, T.-S., Goh, L., Chong, M. S., Chua, S. M., Chen, G. B., Feng, L., . . . Krishnan, K. R. (2012). Downregulation of TOMM40 expression in the blood of Alzheimer disease subjects compared with matched controls. *Journal of psychiatric research*, *46*(6), 828-830.
- Lee, T. T., Martin, F. C., & Merrill, J. E. (1993). Lymphokine induction of rat microglia multinucleated giant cell formation. *Glia*, *8*(1), 51-61.
- Li, C., Zhao, R., Gao, K., Wei, Z., Yaoyao Yin, M., Ting Lau, L., . . . Cheung Hoi Yu, A. (2011). Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *8*(1), 67-80.
- Li, W., Turner, A., Aggarwal, P., Matter, A., Storvick, E., Arnett, D. K., & Broeckel, U. (2015). Comprehensive evaluation of AmpliSeq transcriptome, a novel targeted whole transcriptome RNA sequencing methodology for global gene expression analysis. *BMC genomics*, *16*(1), 1069.
- Li, Y., Liu, L., Barger, S. W., & Griffin, W. S. T. (2003). Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1605-1611.
- Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nature Reviews Neurology*, *9*(2), 106-118.
- Liu, L., & Chan, C. (2014). The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, *15*, 6-15.

- López-Sánchez, N., Müller, U., & Frade, J. (2005). Lengthening of G2/mitosis in cortical precursors from mice lacking  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Neuroscience*, *130*(1), 51-60.
- Love, M., Anders, S., & Huber, W. (2014). Differential analysis of count data—the DESeq2 package. *Genome Biol*, *15*, 550.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, *15*(12), 550.
- Luterman, J. D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P. S., . . . Pasinetti, G. M. (2000). Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Archives of neurology*, *57*(8), 1153-1160.
- Lyall, D. M., Royle, N. A., Harris, S. E., Bastin, M. E., Maniega, S. M., Murray, C., . . . del Valdés Hernández, M. C. (2013). Alzheimer's disease susceptibility genes APOE and TOMM40, and hippocampal volumes in the Lothian birth cohort 1936. *PloS one*, *8*(11), e80513.
- Ma, X., Reynolds, S. L., Baker, B. J., Li, X., Benveniste, E. N., & Qin, H. (2010). IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes. *The Journal of Immunology*, *184*(9), 4898-4906.
- Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A. E., Plachý, J. í., . . . Vielhauer, V. (2001). Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *The Journal of Immunology*, *166*(7), 4697-4704.
- Manczak, M., Calkins, M. J., & Reddy, P. H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Human molecular genetics*, *20*(13), 2495-2509.
- Mandrekar-Colucci, S., & Landreth, G. E. (2010). Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*, *9*(2), 156-167.

- Marques, C. A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Müller, W. E., & Eckert, A. (2003). Neurotoxic Mechanisms Caused by the Alzheimer's Disease-linked Swedish Amyloid Precursor Protein Mutation OXIDATIVE STRESS, CASPASES, AND THE JNK PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28294-28302.
- Martiskainen, H., Viswanathan, J., Nykänen, N.-P., Kurki, M., Helisalmi, S., Natunen, T., . . . Rauramaa, T. (2015). Transcriptomics and mechanistic elucidation of Alzheimer's disease risk genes in the brain and in vitro models. *Neurobiology of aging*, 36(2), 1221. e1215-1221. e1228.
- Mastrangelo, M. A., Sudol, K. L., Narrow, W. C., & Bowers, W. J. (2009). Interferon- $\gamma$  differentially affects Alzheimer's disease pathologies and induces neurogenesis in triple transgenic-AD mice. *The American journal of pathology*, 175(5), 2076-2088.
- McAdams, H. H., & Arkin, A. (1997). Stochastic mechanisms in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 814-819.
- McCoy, M. K., & Tansey, M. G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*, 5(1), 45.
- Mendez, M. F., Selwood, A., Mastri, A. R., & Frey, W. d. (1993). Pick's disease versus Alzheimer's disease A comparison of clinical characteristics. *Neurology*, 43(2), 289-289.
- Ministerio de Salud y Protección Social, d. C. (2005). Prevalencia de las demencias en Colombia. from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/IETS/prevalencia-demencia-colombia.pdf>
- Morales-Corraliza, J., Wong, H., Mazzella, M. J., Che, S., Lee, S. H., Petkova, E., . . . Mathews, P. M. (2016). Brain-Wide Insulin Resistance, Tau Phosphorylation Changes, and Hippocampal Neprilysin and Amyloid- $\beta$  Alterations in a Monkey Model of Type 1 Diabetes. *Journal of Neuroscience*, 36(15), 4248-4258.

- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., & Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8.
- Mullighan, C. G., Fanning, G. C., Chapel, H. M., & Welsh, K. I. (1997). TNF and lymphotoxin-alpha polymorphisms associated with common variable immunodeficiency: role in the pathogenesis of granulomatous disease. *The Journal of Immunology*, 159(12), 6236-6241.
- Munoz, L., & Ammit, A. J. (2010). Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 58(3), 561-568.
- Muñoz, L., Nomdedéu, J. F., López, O., Carnicer, M. J., Bellido, M., Aventín, A., . . . Sierra, J. (2001). Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*, 86(12), 1261-1269.
- Naert, G., & Rivest, S. (2011). CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 31(16), 6208-6220.
- Naert, G., & Rivest, S. (2012). Hematopoietic CC-chemokine receptor 2 (CCR2) competent cells are protective for the cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine*, 18(1), 297.
- Naj, A. C., Beecham, G. W., Martin, E. R., Gallins, P. J., Powell, E. H., Konidari, I., . . . Scott, W. K. (2010). Dementia revealed: novel chromosome 6 locus for late-onset Alzheimer disease provides genetic evidence for folate-pathway abnormalities. *PLoS genetics*, 6(9), e1001130.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.
- Nicola, N. (1994). *Guidebook to cytokines and their receptors*: Oxford University Press.
- Nielsen, H. M., Mulder, S. D., Beliën, J. A., Musters, R. J., Eikelenboom, P., & Veerhuis, R. (2010). Astrocytic A $\beta$ 1-42 uptake is determined by A $\beta$ -

- aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia*, 58(10), 1235-1246.
- Nordang, G. B., Viken, M. K., Hollis-Moffatt, J. E., Merriman, T. R., Førre, Ø. T., Helgetveit, K., . . . Lie, B. A. (2009). Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology*, 48(4), 367-370.
- Noroozian, M. (2016). Alzheimer's Disease. *Neurologic Clinics*, 34(1), 69-131.
- Ogawa, O., Zhu, X., Lee, H.-G., Raina, A., Obrenovich, M. E., Bowser, R., . . . Smith, M. A. (2003). Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta neuropathologica*, 105(5), 524-528.
- Orellana, D. I., Quintanilla, R. A., Gonzalez-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2005). Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons. *Neurotoxicity research*, 8(3), 295-304.
- Ortega-Rojas, J., Morales, L., Guerrero, E., Arboleda-Bustos, C. E., Mejia, A., Forero, D., . . . Yunis, J. (2016). Association analysis of polymorphisms in TOMM40, CR1, PVRL2, SORL1, PICALM, and 14q32. 13 regions in Colombian Alzheimer disease patients. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 30(4), 305-309.
- Ortega Rojas, J. C. (2012). *Estudio de diez polimorfismos-SNPs-en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) en una muestra colombiana. Aproximación a genotipos haploides*. Universidad Nacional de Colombia.
- Osman, A., Hitzler, W. E., Ameer, A., & Provost, P. (2015). Differential expression analysis by RNA-Seq reveals perturbations in the platelet mRNA transcriptome triggered by pathogen reduction systems. *PloS one*, 10(7), e0133070.
- Ousman, S. S., & Kubes, P. (2012). Immune surveillance in the central nervous system. *Nature neuroscience*, 15(8), 1096-1101.
- Pacheco, M. A., & Jope, R. S. (1996). Phosphoinositide signaling in human brain. *Progress in neurobiology*, 50(2), 255-273.

- Paul, S., Ricour, C., Sommereyns, C., Sorgeloos, F., & Michiels, T. (2007). Type I interferon response in the central nervous system. *Biochimie*, 89(6), 770-778.
- Pearson, A., Byrne, U., MacGibbon, G., Faull, R., & Dragunow, M. (2006). Activated c-Jun is present in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience letters*, 398(3), 246-250.
- Perry, R. T., Collins, J. S., Wiener, H., Acton, R., & Go, R. C. (2001). The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 22(6), 873-883.
- Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature reviews. Immunology*, 7(2), 161.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(4), 193-201.
- Pickford, F., Marcus, J., Camargo, L. M., Xiao, Q., Graham, D., Mo, J.-R., . . . Hering, H. (2011). Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity. *The American journal of pathology*, 178(1), 284-295.
- Pierce, A. L., Bullain, S. S., & Kawas, C. H. (2017). Late-Onset Alzheimer Disease. *Neurologic Clinics*, 35(2), 283-293.
- Pietrzak, M., Papp, A., Curtis, A., Handelman, S. K., Kataki, M., Scharre, D. W., . . . Sadee, W. (2016). Gene expression profiling of brain samples from patients with Lewy body dementia. *Biochemical and biophysical research communications*, 479(4), 875-880.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I-and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 375-386.
- Pope, W. B., Lambert, M. P., Leypold, B., Seupaul, R., Sletten, L., Krafft, G., & Klein, W. L. (1994). Microtubule-associated protein tau is hyperphosphorylated during mitosis in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Experimental neurology*, 126(2), 185-194.
- Popp, N., Chew, E. Y., Wang, J. J., Mitchell, P., Chan, C.-C., & Tuo, J. (2014). The Potential Role of Genetic Variations in MicroRNA Binding Sites in Age-

- Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(13), 2235-2235.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 63-75. e62.
- Puig, B., Gómez-Isla, T., Ribe, E., Cuadrado, M., Torrejón-Escribano, B., Dalfo, E., & Ferrer, I. (2004). Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding  $\beta$ A plaques in APP Tg2576 mice. *Neuropathology and applied neurobiology*, 30(5), 491-502.
- Qidwai, T., & Khan, F. (2011). Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scandinavian journal of immunology*, 74(6), 522-547.
- Quinlan, A. R. (2014). BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Current protocols in bioinformatics*, 11.12. 11-11.12. 34.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842.
- Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., González-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2004). Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Experimental cell research*, 295(1), 245-257.
- Raison, C. L., Demetrashvili, M., Capuron, L., & Miller, A. H. (2005). Neuropsychiatric adverse effects of interferon- $\alpha$ . *CNS drugs*, 19(2), 105-123.
- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*, 12(9), 623.
- Reitz, C. (2015). Genetic diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease: challenges and opportunities. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(3), 339-348.
- Rhee, S. G., Suh, P.-G., Ryu, S.-H., & Lee, S. Y. (1989). Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science*, 244(4904), 546-550.

- Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Sardi, F., Fassina, L., Venturini, L., Inguscio, M., Guerriero, F., Rolfo, E., & Ricevuti, G. (2011). Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmunity reviews*, 11(2), 149-153.
- Sastre, M., Klockgether, T., & Heneka, M. T. (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24(2), 167-176.
- Schindler, C., & Strehlow, I. (1999). Cytokines and STAT signaling. *Advances in pharmacology*, 47, 113-174.
- Schreiber, G., & Piehler, J. (2015). The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends in immunology*, 36(3), 139-149.
- Serpente, M., Bonsi, R., Scarpini, E., & Galimberti, D. (2014). Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to treatment. *Neuroimmunomodulation*, 21(2-3), 79-87.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189.
- Shadfar, S., Hwang, C. J., Lim, M.-S., Choi, D.-Y., & Hong, J. T. (2015). Involvement of inflammation in Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic potential of anti-inflammatory agents. *Archives of pharmacal research*, 38(12), 2106-2119.
- Shearer, W. T., Rosenwasser, L. J., Bochner, B. S., Martinez-Moczygemba, M., & Huston, D. P. (2003). Biology of common  $\beta$  receptor–signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(4), 653-665.
- Shimohama, S., Fujimoto, S., Taniguchi, T., & Kimura, J. (1992). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in the postmortem human brain: No alteration in Alzheimer's disease. *Brain research*, 579(2), 347-349.

- Shimohama, S., Homma, Y., Suenaga, T., Fujimoto, S., Taniguchi, T., Araki, W., . . . Kimura, J. (1991). Aberrant accumulation of phospholipase C-delta in Alzheimer brains. *The American journal of pathology*, 139(4), 737.
- Shimohama, S., Matsushima, H., Fujimoto, S., Takenawa, T., Taniguchi, T., Kameyama, K., & Kimura, J. (1995). Differential involvement of phospholipase C isozymes in Alzheimer's disease. *Gerontology*, 41(Suppl. 1), 13-19.
- Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 3(11), 900.
- Simpson, J., Ince, P., Lace, G., Forster, G., Shaw, P., Matthews, F., . . . Wharton, S. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of aging*, 31(4), 578-590.
- Skovronsky, D. M., Lee, V. M.-Y., & Praticò, D. (2001). Amyloid precursor protein and amyloid  $\beta$  peptide in human platelets Role of cyclooxygenase and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), 17036-17043.
- Smith, T. F., & Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *Journal of molecular biology*, 147(1), 195-197.
- Sondag, C. M., Dhawan, G., & Combs, C. K. (2009). Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *Journal of neuroinflammation*, 6(1), 1.
- Streit, W. J., Condeelis, J. R., & Harrison, J. K. (2001). Chemokines and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 22(6), 909-913.
- Sun, A., Liu, M., Nguyen, X. V., & Bing, G. (2003). P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Experimental neurology*, 183(2), 394-405.
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*, 63(1), 8-20.
- Sy, M., Kitazawa, M., Medeiros, R., Whitman, L., Cheng, D., Lane, T. E., & LaFerla, F. M. (2011). Inflammation induced by infection potentiates tau pathological

- features in transgenic mice. *The American journal of pathology*, 178(6), 2811-2822.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., . . . Tsafou, K. P. (2014). STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*, 43(D1), D447-D452.
- Tabner, B. J., El-Agnaf, O. M., Turnbull, S., German, M. J., Paleologou, K. E., Hayashi, Y., . . . Allsop, D. (2005). Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 35789-35792.
- Takeuchi, Y., Ariza-Araujo, Y., & Prada, S. (2014). PREVALENCE ESTIMATES OF DEMENTIA IN COLOMBIA (2005-2020): TRANSITIONS AND STAGE OF DISEASE. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 10(4), P758.
- Tatebayashi, Y., Planel, E., Chui, D.-H., Sato, S., Miyasaka, T., Sahara, N., . . . Rivka, R. (2006). c-jun N-terminal kinase hyperphosphorylates R406W tau at the PHF-1 site during mitosis. *The FASEB journal*, 20(6), 762-764.
- Taylor, J. M., Minter, M. R., Newman, A. G., Zhang, M., Adlard, P. A., & Crack, P. J. (2014). Type-1 interferon signaling mediates neuro-inflammatory events in models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 35(5), 1012-1023.
- TDB, T. (2014). *BSgenome.Hsapiens.USCS.hg19: Full genome sequences for Homo sapiens (UCSC version hg19*. Retrieved from: <https://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/BSgenome.Hsapiens.USCS.hg19.html>
- Thal, D. R. (2012). The role of astrocytes in amyloid  $\beta$ -protein toxicity and clearance. *Experimental neurology*, 236(1), 1-5.
- Tokumitsu, Y., Mori, M., Tanaka, S., Akazawa, K., Nakano, S., & Niho, Y. (1999). Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *International journal of oncology*, 15(4), 687-779.

- Tweedie, D., Ferguson, R. A., Fishman, K., Frankola, K. A., Van Praag, H., Holloway, H. W., . . . Russo, I. (2012). Tumor necrosis factor- $\alpha$  synthesis inhibitor 3, 6'-dithiothalidomide attenuates markers of inflammation, Alzheimer pathology and behavioral deficits in animal models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 9(1), 106.
- Twine, N. A., Janitz, K., Wilkins, M. R., & Janitz, M. (2011). Whole transcriptome sequencing reveals gene expression and splicing differences in brain regions affected by Alzheimer's disease. *PloS one*, 6(1), e16266.
- Valdés Gallego, N. (2015). Neoplasia endocrina múltiple tipo 1. Caracterización clínica, genética y molecular.
- Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C.-Y., & Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 7(4), 399-412.
- Vukic, V., Callaghan, D., Walker, D., Lue, L.-F., Liu, Q. Y., Couraud, P.-O., . . . Zhang, W. (2009). Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiology of disease*, 34(1), 95-106.
- Wan, J., Fu, A. K., Ip, F. C., Ng, H.-K., Hugon, J., Page, G., . . . Ip, N. Y. (2010). Tyk2/STAT3 signaling mediates  $\beta$ -amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6873-6881.
- Wang, S., Zhang, C., Sheng, X., Zhang, X., Wang, B., & Zhang, G. (2014). Peripheral expression of MAPK pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(5), 810-814.
- Wang, T. (2015). TNF-alpha G308A polymorphism and the susceptibility to Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *Archives of medical research*, 46(1), 24-30. e21.
- Wenk, G. L. (2006). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*, 67, 3.

- Witten, D. M. (2011). Classification and clustering of sequencing data using a Poisson model. *The Annals of Applied Statistics*, 2493-2518.
- Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 2(1-3), 37-52.
- Wyss-Coray, T., & Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), a006346.
- Xia, M., & Hyman, B. T. (1999). Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *Journal of neurovirology*, 5(1), 32-41.
- Yang, J., Kou, J., Lalonde, R., & Fukuchi, K.-i. (2017). Intracranial IL-17A overexpression decreases cerebral amyloid angiopathy by upregulation of ABCA1 in an animal model of Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*.
- Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R., & Shen, Y. (2002). Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *Journal of Neuroscience*, 22(8), 3025-3032.
- Yang, L., Lu, R., Jiang, L., Liu, Z., & Peng, Y. (2009). Expression and genetic analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) G-308A polymorphism in sporadic Alzheimer's disease in a Southern China population. *Brain research*, 1247, 178-181.
- Yang, Q., Wang, E.-y., Jia, H.-w., & Wang, Y.-p. (2016). Association between polymorphisms in transforming growth factor- $\beta$ 1 and sporadic Alzheimer's disease in a Chinese population. *International Journal of Neuroscience*, 126(11), 979-984.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., . . . Lee, V. M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, 53(3), 337-351.

- Young, R. A., Talbot, K., Gao, Z.-y., Trojanowski, J. Q., & Wolf, B. A. (1999). Phospholipase pathway in Alzheimer's disease brains: decrease in G  $\alpha$  i in dorsolateral prefrontal cortex. *Molecular brain research*, 66(1), 188-190.
- Zambrano, A., Otth, C., B Maccioni, R., & I Concha, I. (2010). IL-3 control TAU modifications and protects cortical neurons from neurodegeneration. *Current Alzheimer Research*, 7(7), 615-624.
- Zhang, J., Ke, K.-F., Liu, Z., Qiu, Y.-H., & Peng, Y.-P. (2013). Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of a $\beta$ 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PloS one*, 8(10), e75786.
- Zheng, C., Zhou, X.-W., & Wang, J.-Z. (2016). The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$ . *Translational neurodegeneration*, 5(1), 7.
- Zhu, X., Lee, H.-g., Raina, A. K., Perry, G., & Smith, M. A. (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals*, 11(5), 270-281.

## 7. ANEXOS

### Anexo I. Acta de aprobación de comité de Ética para el desarrollo del proyecto de investigación y formato de consentimiento informado para la participación voluntaria

AGENDA VICERRECTORÍA ACADÉMICA UNIDAD DE INVESTIGACION COMITÉ DE BIOÉTICA Acta No. 47 de 2015		
<b>Fecha:</b> Junio 24 de 2015		
<b>Hora:</b> 4 a 5.00 pm.		
<b>Lugar:</b> Sala de juntas		
<b>Integrantes del comité:</b>		
Maria del Carmen Vergara Q	Coordinadora de la Unidad de Investigación	Asistió
Mérida Cristina Fraume	Representante del CEA	Asistió
Andrea del Pilar González Marín	Representante del área clínica de fisioterapia	Se excusó
Jackeline Mulet	Representante del área clínica de Odontología	Se excusó
Giovanny Herrera	Representante del Departamento de Ciencias Humanas	Asistió
<b>ORDEN DEL DÍA:</b>		
1. Verificación del quórum		
2. Lectura del acta número 46 enviada previamente por correo electrónico		
3. Presentación de políticas nacionales e internacionales que fomentan la investigación y sus aspectos éticos		
GRUPO	PROYECTO	INTEGRANTES
NEUROAPRENDIZAJE	Identificación de SNPs por secuenciación del transcriptoma de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en enfermedad de Alzheimer (EA)	<b>Investigador principal</b> Carlos Andrés Naranjo <b>Colinvestigadores</b> Mary Orrego Cardozo Francía Restrepo de Mejía Mauricio Medina Salcedo Kelly Yojanna Cardona Londoño <b>Semillero de Investigación</b> Yéssica Paola López Echeverri
<b>DESARROLLO DE LA SESIÓN</b>		
1. Verificación del quórum		
2. Lectura del acta número 46 enviada previamente por correo electrónico, se aprueba por unanimidad.		
3. Presentación de proyectos de investigación previamente aprobados por comité de currículo de los programas de maestrías o comité de investigación institucional.		
1		

**Grupo: Neuroaprendizaje**

**Proyecto:** Identificación de SNPs por secuenciación del transcriptoma de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA. BIOS

**Investigadores:**

**Investigador principal**

Carlos Andrés Naranjo

**Colaboradores**

Mary Orrego Cardozo

Francia Restrepo de Mejía

Mauricio Medina Salcedo

Kelly Yojanna Cardona Londoño

**Semillero de Investigación**

Yéssica Paola López Echeverri

**Consideraciones:** el objetivo del proyecto es determinar por secuenciación del transcriptoma la asociación entre los SNPs en genes de respuesta inmune y los procesos inflamatorios en una muestra de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos. Se realizará bajo la metodología enfoque empírico - analítico, alcance descriptivo e inferencial, información predominantemente cuantitativa. Con una muestra intencional de 40 sujetos: 20 casos y 20 controles.

Los criterios de inclusión para el estudio son: >= 65 años, ambos géneros, escolaridad mínima quinto de primaria, consentimiento informado, diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer CDR 1-3. Se realizará el diagnóstico de EA y se hará extracción de ARN en sangre en ambos grupos de pacientes en el laboratorio de microbiología, elaboración del perfil de expresión genética.

**Riesgo:** Se les pregunta quién firmará el consentimiento, cuando la EA es de nivel 3 (grave), el estudio supone un riesgo mínimo al momento de la muestra de sangre como pueden ser: Sangrado excesivo, desmayo o sensación de mareo, Inflamación local (flebitis) e infección local. Se aprueba el consentimiento y se recomienda realizar el protocolo que contemple los pasos antes-durante y después de la muestra de sangre, así como mejorar el vocabulario del consentimiento apropiado para las personas mayores de 65 años y sus acudientes.

Siendo las 6:00 pm se da por finalizado el comité.

**Relatora:**

María del Carmen Vergara Quintero

Integrante del comité

Coordinadora de la Unidad de Investigación



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA  
PARTICIPACIÓN  
EN INVESTIGACIONES

CÓDIGO: GIN-FOR-16

VERSIÓN: 1

FECHA ELABORACIÓN DEL  
FORMATO : 04/JUN/2015

GRUPO DE INVESTIGACIÓN NEUROAPRENDIZAJE

**INVESTIGACIÓN:**

**título: "Identificación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) por secuenciación del transcriptoma de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en enfermedad de Alzheimer (EA)"**

Ciudad y fecha:

CÓD:

Yo, \_\_\_\_\_ una vez informado sobre los propósitos, objetivos, procedimientos de intervención y evaluación que se llevarán a cabo en esta investigación y los posibles riesgos que se puedan generar de ella, autorizo a \_\_\_\_\_ docente de la Universidad Autónoma de Manizales, para la realización de los siguientes procedimientos:

1. Evaluación neurocognitiva mediante pruebas neuropsicológicas
2. Toma de muestra de sangre

Adicionalmente se me informó que:

- Mi participación en esta investigación es completamente libre y voluntaria, estoy en libertad de retirarme de ella en cualquier momento.
- No recibiré beneficio personal de ninguna clase por la participación en este proyecto de investigación. Sin embargo, se espera que los resultados obtenidos permitirán establecer un perfil inicial de la expresión de genes de respuesta inmune en individuos sanos e individuos diagnosticados con enfermedad de Alzheimer, que contribuirá como referencia al desarrollo de futuros estudios.
- Toda la información obtenida y los resultados de la investigación serán tratados confidencialmente. Esta información será archivada en papel y medio electrónico. El archivo del estudio se guardará en la Universidad Autónoma de Manizales bajo la responsabilidad de los investigadores.
- Puesto que toda la información en este proyecto de investigación es llevada al anonimato, los resultados personales no pueden estar disponibles para terceras personas como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros u otras instituciones educativas. Esto también se aplica a mi cónyuge, a otros miembros de mi familia y a mis médicos.

Hago constar que el presente documento ha sido leído y entendido por mí en su integridad de manera libre y espontánea.

HUELLA

Firma del Participante  
Documento de identidad  
Huella Índice derecho:

No.

de



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIONES

CÓDIGO: GIN-FOR-16

VERSIÓN: 1

FECHA ELABORACIÓN DEL FORMATO : 04/JUN/2015

Firma del acudiente  
Documento de identidad

No.

de

Huella Índice derecho:

HUELLA

Proyecto aprobado por el comité de Bioética de la UAM, según consta en el acta No 047 de junio de 2015

***“Identificación de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) por secuenciación del transcriptoma de genes de respuesta inmune asociados a procesos inflamatorios en EA”***

**OBJETIVO:**

Determinar por secuenciación del transcriptoma la asociación entre los SNPs en genes de respuesta inmune y los procesos inflamatorios en una muestra de pacientes con enfermedad de Alzheimer y controles sanos

**JUSTIFICACIÓN:**

La evaluación neurocognitiva nos permitirá conocer si usted está sano o tiene la enfermedad de Alzheimer y que tan adelantada esta y así podremos clasificarlo en alguno de los dos grupos de estudio que tenemos.

Con el análisis genético de la muestra de sangre podremos identificar genes de respuesta inmune asociados a inflamación en EA, con el fin de aportar al conocimiento que se tiene de la enfermedad y tener una referencia para futuras investigaciones.

**PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:**

Si usted acepta participar, se le tomará una encuesta con algunos datos personales, se le realizará una evaluación neurocognitiva por medio de una serie de pruebas que evalúan diferentes capacidades del cerebro por medio de preguntas y ejercicios simples, posteriormente se extraerá una muestra de sangre de aproximadamente 10ml, finalmente, haremos un análisis genético de la muestra de sangre para analizar la variación en la expresión de sus genes.

**RIESGOS:**

El siguiente trabajo supone riesgo bajo para los participantes del estudio

- Sangrado excesivo
- Desmayo o sensación de mareo
- Inflamación local (flebitis)



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIONES

CÓDIGO: GIN-FOR-16

VERSIÓN: 1

FECHA ELABORACIÓN DEL FORMATO : 04/JUN/2015

Infección local

**BENEFICIOS:**

Con su participación, se busca conocer mejor la influencia de la inflamación en la enfermedad de Alzheimer, ya que esta es una de las teorías que soportan la causa de la enfermedad, investigar en este campo servirá como evidencia a futuras investigaciones que busquen enfrentar la problemática de la EA para proponer posibles soluciones.

No se trata de un estudio terapéutico por lo tanto no existe compromiso de realizar un tratamiento. Usted no recibirá beneficios económicos por la participación en esta investigación.

**AUTORIZACIÓN PARA USO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO:**

Usted autoriza que los datos obtenidos en este estudio puedan ser utilizados en futuras comparaciones con nuevas bases de datos obtenidos en otros estudios; todo dentro de la absoluta confidencialidad y previa Aprobación del Comité de Bioética de investigación de la Universidad Autónoma de Manizales para la realización de dichos estudios.

## Anexo II. Protocolo para la toma de muestras de sangre



# PROTOCOLO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE

---

LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR – UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

*Julio de 2015*

1

## Tabla de contenido

Pautas generales de seguridad .....	3
Preparación del paciente .....	3
Preparación del equipo para la toma de la muestra.....	3
Procedimiento para la toma de la muestra .....	4
Rotulado de la muestra .....	5
Cuidados del paciente posterior a la extracción .....	6
Transporte de la muestra .....	6
Manejo y disposición de los residuos .....	6
Bibliografía.....	7

## **Pautas generales de seguridad**

- La toma de muestras de sangre debe realizarse siempre por personal calificado para tal actividad (enfermera, auxiliar de enfermería).
- Es obligatorio utilizar la bata dentro de las instalaciones del laboratorio.
- Es requisito el uso de guantes a la hora de tomar la muestra, se debe utilizar un par de guantes diferente para atender a cada paciente.
- Es recomendable el uso de gafas de protección.
- No se permite consumir alimentos, bebidas o fumar en el laboratorio.
- Se recomienda el uso de gorro y tapabocas.
- Se debe realizar lavado de manos frecuente durante el día, además es obligatorio realizar el lavado de manos antes y después del contacto con el paciente y al salir o llegar al laboratorio.

## **Preparación del paciente**

### *Identificación del paciente*

La identificación correcta del paciente es indispensable, pregunte por el nombre y documento de identificación del paciente, y el grupo de estudio al que pertenece (si es caso o control), si el paciente es incapaz de darle ésta información, pídale al acompañante o acudiente del paciente.

### *Explicación del procedimiento*

Trate siempre al paciente de manera cordial, explique a éste el procedimiento que le va a realizar en forma clara y sencilla, si el paciente no puede comprenderle explique el procedimiento a su acompañante o acudiente, si el paciente o acompañante tienen dudas, trate de responder a sus inquietudes de manera cordial y clara. Pida siempre la autorización del paciente y/o acudiente para la realización del procedimiento, aun cuando el consentimiento informado ya haya sido firmado pida una autorización verbal, si el paciente o el acudiente se niegan a la realización del procedimiento trate de ser comprensivo y no lo fuerce, pida asistencia a un miembro del grupo de investigación a cargo del proyecto.

## **Preparación del equipo para la toma de la muestra**

"Se debe preparar el equipo necesario para la obtención, la conservación y el transporte correctos de la muestra. Las propiedades biológicas de esta pueden ser alteradas por variables medioambientales como: tiempo, contenedor, contaminación externa" (Secretaría distrital de salud de Bogotá, 2008)

### *Equipo para la recolección de la muestra*

- *Tubos PAXgene™ Blood RNA System*: que permiten la estabilización y purificación del RNA intracelular.
- *Agujas*: Están numeradas dependiendo de su calibre. Las agujas de 0.9 mm a 1.1 mm de diámetro se utilizan normalmente para punción venosa en adultos.
- *Adaptador para tubos-Vacutainer*: Se utilizan para tubos al vacío.
- *Torniquete para adulto*

#### *Equipo de asepsia y antisepsia*

- Guantes estériles
- Gasas estériles
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%
- Curita o venda adhesiva
- Yodopovidona

### **Procedimiento para la toma de la muestra**

#### *Preparación de la persona encargada de tomar la muestra*

El profesional que va a realizar el procedimiento de toma de la muestra de sangre debe realizar el correcto lavado de manos (es recomendable seguir el método de lavado de manos sugerido por la Organización mundial de la salud - OMS), debe utilizar los elementos de protección personal como: bata, tapabocas y guantes.

#### *Acomodación del paciente*

“La muestra debe tomarse correctamente y bajo las condiciones más favorables para evitar errores. Esto incluye la absoluta identificación del paciente, el sitio a puncionar y el volumen a coleccionar. El paciente debe estar en posición cómoda, de preferencia en una silla especial para venopunción con descanso para los brazos.”(Demar, 2015)

#### *Selección del área de recolección de la muestra*

Al momento de elegir el sitio donde se realizará la punción para la toma de la muestra, se deben evitar las zonas heridas, laceradas o con alergias. El área de preferencia para la toma de la muestra es en la región cubital anterior de uno de los miembros superiores.

#### *Palpación de la vena a punzar*

Previo a la punción, se debe escoger la vena. La mejor manera es realizando una palpación con la yema de los dedos tratando de seguir el recorrido de las venas. Para ello coloque el torniquete 3 a 4 pulgadas por encima del sitio seleccionado, para visualizarlas mejor. Debe tener presente el no mantener el torniquete por más de 3 minutos, para evitar la hemoconcentración. Las venas más utilizadas para la venopunción, están localizadas en el área antecubital, entre éstas: la vena mediana cubital, la vena cefálica y la vena basilica.

#### *Limpieza y desinfección de la piel*

Con una gasa estéril o algodón impregnado de alcohol al 70% o yodopovidona, se debe limpiar el área donde está ubicada la vena elegida para la punción, con movimientos circulares desde el centro hacia la periferia, posteriormente, debe dejarse secar el área de manera natural, una vez realizada la desinfección no se debe volver a tocar el área de la vena elegida.

#### *Extracción de la muestra de sangre<sup>1</sup>*

- Pida al paciente que posicione el brazo en forma horizontal y luego que cierre y abra el puño continuamente para bombear la sangre, luego pídale que deje el puño cerrado.
- Coloque la punta de la aguja en un ángulo de 15 a 30 grados sobre la superficie de la vena escogida y atravesese la piel con un movimiento firme y seguro, hasta el lumen de la vena.
- sostenga firmemente el vacutainer con una mano y con la otra inserte, llene y retire el tubo.
- Afloje el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de colectar, sin apretar el área de la punción con el algodón.
- Presione el algodón sobre el sitio de la punción aplicando una presión adecuada y no excesiva para evitar la formación de hematoma.
- Descarte la aguja en el contenedor para elementos cortopunzantes (guardián)
- Coloque una curita o venda adhesiva en el sitio de la punción.

#### **Rotulado de la muestra**

El rotulado de la muestra debe realizarse inmediatamente después de la recolección de la muestra de sangre. Dentro de los datos que se deben incluir para la identificación de la muestra se encuentran:

- Nombre del paciente
- Número de identificación del paciente
- Fecha de toma de la muestra
- Grupo al que pertenece el paciente: caso o control
- Iniciales del profesional que realizó la toma de la muestra

<sup>1</sup> Adaptado de: Demar. *Manual de flebotomía*.

## Cuidados del paciente posterior a la extracción

Una vez finalizado el proceso de extracción de la muestra de sangre, quien realizó la toma de la muestra debe verificar el estado en el que se encuentra el paciente y si éste puede retirarse por sus propios medios y de inmediato, ya que, algunos pacientes pueden sufrir mareo o desmayo posterior a la extracción de sangre, por lo que es indispensable preguntar al paciente si se siente bien.

Si el paciente presenta sudoración, palidez o temblor, pudiera necesitar nuestra ayuda, le podemos ofrecer un estímulo olfativo fuerte como alcohol; si además ocurre un desmayo se le deben elevar sus piernas, para favorecer la llegada de sangre al cerebro.

## Transporte de la muestra

Cuando el proceso de recolección de muestras termina, éstas deben ser trasladadas lo antes posible al laboratorio para su análisis y procesamiento,<sup>3</sup> se recomienda transportar las muestras al laboratorio en los primeros 15 minutos de la recolección a temperatura ambiente" (Secretaría distrital de salud de Bogotá, 2008)

## Manejo y disposición de los residuos<sup>2</sup>

Finalizado el proceso de toma de muestras de sangre los residuos generados del procedimiento deben descartarse según el Plan de gestión integral de los residuos de la Universidad Autónoma de Manizales.

Los residuos generados de la realización de procedimientos asistenciales son considerados residuos peligrosos de riesgo biológico y deben desecharse así:

- Los residuos biosanitarios como: gasas, algodones y guantes utilizados para la toma de las muestras deben desecharse en la caneca roja rotulada como *riesgo biológico biosanitario*
- Las agujas utilizadas para la extracción de la sangre deben desecharse en el recipiente para *residuos cortopunzantes* de color rojo (guardián)
- La mesa o espacio donde se dispusieron los materiales para la toma de la muestra de sangre debe ser desinfectada con hipoclorito
- Los residuos son recolectados diariamente en la ronda del personal de servicios generales de la universidad Autónoma de Manizales, verifique que dicho personal realice siempre el procedimiento utilizando los elementos de protección personal y de acuerdo al protocolo para la recolección interna de residuos de la fundación IPS.

<sup>3</sup> Adaptado de: Universidad Autónoma de Manizales – Centro de estudios ambientales "Mélida Restrepo de Fraume" - CEA. *Plan de gestión integral de residuos hospitalarios y similares* –PGIRHS

### Anexo III. Niveles de calidad y concentración de ADN

# Medición	Absorbancia	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1		0,1	ng/μl	0,001	0,006	0,23
2		0,1	ng/μl	0,002	0,007	0,29
3		18,7	ng/μl	0,373	0,226	1,65
4		15,8	ng/μl	0,317	0,193	1,64
5		27,9	ng/μl	0,558	0,353	1,58
6		11,6	ng/μl	0,231	0,138	1,67
7		15,9	ng/μl	0,317	0,239	1,33
8		21,4	ng/μl	0,427	0,267	1,6
9		22,5	ng/μl	0,449	0,296	1,51
10		24,7	ng/μl	0,494	0,288	1,72
11		49,8	ng/μl	0,997	0,631	1,58
12		11,8	ng/μl	0,236	0,14	1,69
13		21,4	ng/μl	0,429	0,268	1,6
14		34,8	ng/μl	0,696	0,407	1,71
15		23,3	ng/μl	0,465	0,291	1,6
16		38,8	ng/μl	0,776	0,446	1,74
17		29	ng/μl	0,58	0,336	1,73
18		11,8	ng/μl	0,237	0,146	1,63
19		59,9	ng/μl	1,198	0,677	1,77
20		23,4	ng/μl	0,469	0,274	1,71
21		11,9	ng/μl	0,238	0,152	1,57
22		96,3	ng/μl	1,926	1,17	1,65
23		21,8	ng/μl	0,436	0,265	1,65
24		27,4	ng/μl	0,549	0,385	1,42
25		33	ng/μl	0,66	0,376	1,76
26		13,3	ng/μl	0,267	0,162	1,64
27		59,3	ng/μl	1,186	0,708	1,67
28		47,6	ng/μl	0,952	0,539	1,77
29		26,3	ng/μl	0,527	0,354	1,49
30		86,5	ng/μl	1,73	1,012	1,71
31		21,2	ng/μl	0,424	0,254	1,67
32		46,9	ng/μl	0,938	0,534	1,76
33		35,9	ng/μl	0,718	0,402	1,79
35		16,1	ng/μl	0,322	0,239	1,35
37		14,7	ng/μl	0,294	0,193	1,52
41		15,4	ng/μl	0,307	0,178	1,72

42	83,1	ng/μl	1,662	0,91	1,83
43	22,2	ng/μl	0,445	0,266	1,67
44	60,5	ng/μl	1,21	0,718	1,69
45	31,9	ng/μl	0,638	0,354	1,8
46	56,4	ng/μl	1,129	0,616	1,83
47	51,3	ng/μl	1,026	0,589	1,74
48	96,1	ng/μl	1,922	1,108	1,73
49	27,9	ng/μl	0,558	0,325	1,71
50	43,9	ng/μl	0,878	0,487	1,8
51	66,3	ng/μl	1,325	0,736	1,8
52	40,2	ng/μl	0,804	0,466	1,72
53	16,7	ng/μl	0,334	0,192	1,74
54	24,9	ng/μl	0,498	0,283	1,76
55	30	ng/μl	0,6	0,346	1,73
56	34,7	ng/μl	0,694	0,506	1,37
57	18,8	ng/μl	0,375	0,227	1,65
58	71,7	ng/μl	1,433	0,787	1,82
59	28	ng/μl	0,559	0,317	1,76
60	46	ng/μl	0,919	0,519	1,77
61	34,4	ng/μl	0,688	0,43	1,6
62	37,9	ng/μl	0,758	0,427	1,78
63	13,4	ng/μl	0,268	0,153	1,75
64	11,7	ng/μl	0,233	0,133	1,76
65	20,5	ng/μl	0,411	0,223	1,84
66	18	ng/μl	0,36	0,209	1,72
67	57,8	ng/μl	1,155	0,668	1,73
68	20	ng/μl	0,4	0,231	1,73
70	10,8	ng/μl	0,217	0,123	1,76
71	92,3	ng/μl	1,846	1,005	1,84
72	24	ng/μl	0,48	0,526	0,91
73	41,7	ng/μl	0,834	0,454	1,84
74	28,1	ng/μl	0,561	0,321	1,75
75	33,7	ng/μl	0,674	0,449	1,5
76	35	ng/μl	0,699	0,471	1,49
77	55,3	ng/μl	1,106	0,668	1,65
78	48,1	ng/μl	0,962	0,665	1,45
79	54,4	ng/μl	1,088	1,043	1,04
80	32	ng/μl	0,64	0,379	1,69
81	78,4	ng/μl	1,569	0,889	1,77

---

<b>82</b>	37,5	ng/μl	0,75	0,449	1,67
<b>83</b>	29,7	ng/μl	0,594	0,366	1,62
<b>84</b>	46	ng/μl	0,92	0,554	1,66
<b>85</b>	40	ng/μl	0,799	0,479	1,67
<b>86</b>	24,4	ng/μl	0,489	0,292	1,67
<b>87</b>	35,1	ng/μl	0,702	0,424	1,65
<b>88</b>	33	ng/μl	0,66	0,408	1,62
<b>89</b>	47,6	ng/μl	0,953	0,607	1,57
<b>90</b>	21,2	ng/μl	0,424	0,3	1,41
<b>91</b>	32,5	ng/μl	0,651	0,445	1,46
<b>92</b>	16,9	ng/μl	0,338	0,203	1,67
<b>93</b>	53,5	ng/μl	1,07	0,805	1,33
<b>95</b>	38,5	ng/μl	0,77	0,491	1,57
<b>98</b>	30,2	ng/μl	0,603	0,443	1,36
<b>100</b>	31	ng/μl	0,62	0,397	1,56

---

#### Anexo IV. Valores de cuantificación del ARN para secuenciación

Muestra	Fluorimetría (ng/ul)	Espectrofotometría (ng/ul)	260/230	260/280	Chip 1	Chip 2
C1	100	87,5	2,241	2,034	6,4	6,1
C3	>200	107	2,229	2,038	6,1	5,8
C4	>200	107,6	2,235	2,035	3,5	3,9
P5	>200	105,7	2,244	2,041	6,1	-
C5	97	86,6	2,218	2,042	5,4	-
C7	93	83,7	2,293	2,045	5,9	-
P6	96	87,3	2,277	2,049	5,8	-
C6	45,1	24,025	2,635	2,063	6,6	-
C8	69	43,97	2,341	2,061	6,8	-
P8	84	71,25	2,288	2,046	6,5	-
C9	99	102,3	2,244	2,048	4,4	-
P9	45	26,725	2,417	2,06	7,1	7,2
C10	63	40,8	2,278	2,056	7	7,1
P10	83	70,15	2,209	2,049	6,5	6,4
C11	100	94,9	2,237	2,05	5,5	5,6

## Anexo V. Procedimientos bioinformáticos previo análisis de expresión diferencial

### ANÁLISIS DE CALIDAD DE SECUENCIAS UTILIZANDO LA HERRAMIENTA SAMSTAT V 1.5.

```
#!/bin/bash

#SBATCH -J samstat4
#SBATCH -o stdout_samstat4.txt
#SBATCH -e error_samstat4.txt
#SBATCH -n 32

module load software/bioinformatics/samstat/1.5.1

for file in /BIOS-Share/home/kycardonal/Mapped_Final/*.bam
do
samstat ${file}
done
```

### MAPEO SOBRE LA ANOTACIÓN DE REFERENCIA UCSC HG19 MEDIANTE EL ION TORRENT MAPPING ALIGNMENT PROGRAM (TMAP)

```
#!/bin/bash

#SBATCH -J Mapping_Final
#SBATCH -o Mapped_Data_Final.txt
#SBATCH -e errors_Final.txt
#SBATCH -n 32

module load software/bioinformatics/tmap/5.2.16

mkdir /BIOS-Share/home/kycardonal/Mapped_Final

for file in /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/*.fastq
do

tmap mapall -f /BIOS-Share/home/kycardonal/Reference_genome/
hgl9_ampliseq_transcriptome_ercc_v1.fasta -r $file -i fq -s $file.bam -n 32 -o
2 -v stage1 --stage-keep-all map1 map2 map3 map4 stage2 mapvsw

mv $file.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Mapped_Final/

done
```

## ESTIMACIÓN DE ABUNDANCIAS CON BEDTOOLS V 2.26 MEDIANTE EL LLAMADO AL COMANDO MULTICOV

```
#!/bin/bash

#SBATCH -J multicov_count
#SBATCH -o stdout_multicov_count.txt
#SBATCH -e errors_multicov_count.txt
#SBATCH -n 32

bedtools multicov -bams /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_001_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_002_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_003_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_004_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_005_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_006_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_007_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_008_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_009_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_010_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-
CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_011_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_012_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-
CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_013_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_014_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-
CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_015_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam -
bed hg19_AmpliSeq_Transcriptome_21K_v1.bed > Counts_matrix.cnt

#!/bin/bash

#SBATCH -J multicov_count_pm
#SBATCH -o stdout_multicov_count_pm.txt
#SBATCH -e errors_multicov_count_pm.txt
#SBATCH -n 2

bedtools multicov -q 20 -s -bams /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_001_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_002_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_003_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_004_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_005_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_006_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_007_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_008_R_2016_07_08_03_03_58_user_genetracer-110-
CHEF_IATHGEP_Sample_1_Reanalysis_Chip_1.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_009_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_010_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-
CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_011_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_012_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-
CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_013_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /
BIOS-Share/home/kycardonal/Data/IonXpress_014_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-
CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam /BIOS-Share/home/kycardonal/Data/
IonXpress_015_R_2016_07_08_05_44_35_user_genetracer-111-CHEF_IATHGEP_Sample_2_Reanalysis_Chip_2.bam -
bed hg19_AmpliSeq_Transcriptome_21K_v1.bed > Counts_matrix_pm.cnt
```

## Anexo VI. Procedimiento para análisis de expresión diferencial

```
#ANALISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL A PARTIR DE DESEQ2

#####PREPROCESAMIENTO DE LOS DATOS#####

#Cargando la librería
library(DESeq2)
#Cargando los datos: countdata va a contener los conteos a cada gen y coldata, la info de
#las muestras
countdata <- read.csv("Matriz_conteos.tsv", header=TRUE, sep = "\t")
coldata <- read.csv("ColData.tsv", header=TRUE, sep = "\t")

#Construyendo el objeto en DeSeq2 para poder hacer el analisis
ddsMat<-DESeqDataSetFromMatrix(countData = countdata,colData = coldata, design = ~TYPE )

#Prefiltrado del conjunto de Datos, lo que se hace es eliminar los ceros, para así reducir
#el conjunto de datos y que el analisis sea más rápido

#Primero veo el total de filas inicial
inicial_rows <- nrow(ddsMat)
#Luego filtro y veo cuantas quedan, reasigno a mi objeto para poder que se reduzca la dimension
ddsMat <- ddsMat[rowSums(counts(ddsMat)) >1, ]
filter_rows <- nrow(ddsMat)

#Se aplica una transformación a los datos para estalilizar la varianza en relación a la media,
#es decir se realiza una normalización de los datos, esto con el fin de asegurar que las
#diferencias en los analisis se deben a los genes y a factores biologicos en sí y no a
#diferencias en la escala.

#Para un conjunto de datos pequeño, funcional mejor la transformación logaritmica regularizada
#cuando bind=FALSE indica que el analisis se hace asumiendo que el grupo no influye en la
#varianza de los datos
rld <- rlog(ddsMat, blind = FALSE)
#Visualización de la transformación rlog
plot(assay(rld),pch=16, cex=0.3, main="rlog")

#Distancias Euclidianas entre muestras: permite mirar las similitudes entre las muestras y si esto s
#adapta a las expectativas del diseño experimental, para visualizarlas las grafico en mapas
#de calor con la libreria pretty heatmap

library(pheatmap)
library(RColorBrewer)

sampleDist <-dist(t(assay(rld)))
sampleDistMatrix <- as.matrix( sampleDist )
rownames(sampleDistMatrix) <- paste( rld$SAMPLE,rld$TYPE, sep="-" )
colnames(sampleDistMatrix) <- NULL
colors <- colorRampPalette( rev(brewer.pal(9, "Blues")) )(255)
pheatmap(sampleDistMatrix,
          clustering_distance_rows=sampleDist,
          clustering_distance_cols=sampleDist,
          col=colors)
```

```
#Análisis de componentes principales PCA
library("ggplot2")

pcaData <- plotPCA(r1d, intgroup = c( "SAMPLE", "TYPE"), returnData=TRUE)
percentVar <- round(100 * attr(pcaData, "percentVar"))
d<- ggplot(pcaData, aes(PC1, PC2, color=SAMPLE, shape=TYPE, label=rownames(pcaData))) +
  xlab(paste0("PC1: ",percentVar[1],"% variance")) +
  ylab(paste0("PC2: ",percentVar[2],"% variance")) +
  coord_fixed()
d + geom text()
```

## Anexo VII. Frecuencias genotípicas para los SNP de interés

Official symbol	rs number	Genotypes cases			Genotypes Healthy controls			P value	OR(95% IC)
		GG	GA	AA	GG	GA	AA		
<b>TNF</b>	rs1800610	GG 1.2%)	GA 2 (8.3%)	AA 21 (87.5%)	GG 65 (41.1%)	GA 46 (29.1%)	AA 47 (29.8%)	<b>0.0005</b>	<b>15.44(2.03-117.4)</b>
<b>TNF</b>	rs1800630	CC 19 (76%)	CA 1 (4%)	AA 5 (20%)	CC 117 (75%)	CA 24 (15.4%)	AA 15 (9.6%)	0.1192	0.42(0.13-1.29)
<b>TNF</b>	rs1799724	CC 21 (84%)	CT 3 (12%)	TT 1 (4%)	CC 108 (69.2%)	CT 45 (28.9%)	TT 3 (1.9%)	0.0899	2.38(0.77-7.30)
<b>TNF</b>	rs1800629	GG 19 (79.2%)	GA 4 (16.7%)	AA 1 (4.2%)	GG 132 (83.5%)	GA 24 (15.2%)	AA 2 (1.3%)	0.3457	0.29(0.02-3.36)
<b>TREM2</b>	rs75932628	CC 21 (77.8%)	CT 5 (18.5%)	TT 1 (3.7%)	CC 141 (88.7%)	CT 15 (9.4%)	TT 3 (1.9%)	0.1090	0.44(0.15-1.25)
<b>IL17</b>	rs10484879	GG 10 (38.5%)	GT 7 (26.9%)	TT 9 (34.6%)	GG 106 (67.5%)	GT 37 (23.6%)	TT 14 (8.9%)	<b>0.0001</b>	<b>4.24(1.77-10.11)</b>
<b>IL17</b>	rs7747909	GG 4 (14.8%)	GA 13 (48.1%)	AA 10 (37%)	GG 77 (48.7%)	GA 33 (20.9%)	AA 48 (30.4%)	<b>0.0016</b>	<b>4.86(1.61-14.67)</b>
<b>IL17</b>	rs2275913	GG 20 (74.1%)	GA 7 (25.9%)	AA 2 (0%)	GG 91 (58%)	GA 52 (33.1%)	AA 14 (8.9%)	0.0837	2.07(0.82-5.18)

<b>APOE</b>	rs429358	TT	TC	CC	TT	TC	CC	<b>0.0065</b>	<b>3.72(1.47-9.40)</b>
		14 (58.3%)	10 (41.7)	0 (0%)	120 (76%)	31 (19.6)	7 (4.4%)		
<b>APOE</b>	rs7412	CC	CT	TT	CC	CT	TT	0.4143	1.60(0.35-7.35)
		22 (91.7%)	2 (8.3%)	0 (0%)	137 (87.3)	19 (12.1)	1 (0.6%)		
<b>APOE</b>	rs440446	GG	GC	CC	GG	GC	CC	0.2071	2.01(0.60-6.76)
		7 (38.9%)	7 (38.9%)	4 (22.2)	65 (42.5%)	69 (45.1)	19 (12.4)		
<b>TOMM40</b>	rs2075650	AA	AG	GG	AA	AG	GG	<b>0.0309</b>	<b>2.38(1.04-5.45)</b>
		12 (44.4%)	12 (44.4%)	3 (11.1%)	105 (66%)	42 (26.4%)	12 (7.5%)		
<b>IL10</b>	rs1800872	GG	GT	TT	GG	GT	TT	0.3753	0.79(0.33-1.87)
		12 (50%)	10 (41.7%)	2 (8.3%)	88 (55.7%)	57 (36.1%)	13 (8.2%)		
<b>IL10</b>	rs1800896	TT	TC	CC	TT	TC	CC	0.1963	1.71(0.65-4.44)
		9 (33.3%)	11 (40.7%)	7 (25.9%)	67 (42.1%)	65 (40.9%)	27 (17%)		

**Anexo VIII. Genes diferencialmente expresados (padj<0.05, FDR<0,1, LOG2FC >0,5 y < -0.5)**

<b>Gene Symbol</b>	<b>log2FoldChange</b>	<b>pvalue</b>	<b>padj</b>
<b>ETV7</b>	1,507233666	1,96451E-07	0,000458
<b>PLXDC1</b>	1,336513653	2,23566E-06	0,001862
<b>SLC26A6</b>	1,190249776	9,46045E-06	0,004242
<b>NRG1</b>	1,189525901	1,41313E-05	0,005315
<b>EPST1</b>	1,16367211	1,22362E-05	0,004919
<b>PARP9</b>	1,119477684	2,69033E-09	3,14E-05
<b>IFI44</b>	1,08616012	5,06162E-07	0,000843
<b>XAF1</b>	1,085641001	1,26654E-05	0,004922
<b>GSDMA</b>	1,052923604	8,6925E-05	0,016152
<b>NANOG</b>	1,043483508	8,82002E-07	0,001055
<b>C1QB</b>	1,038486756	0,000299153	0,034194
<b>CD163</b>	1,024477074	6,08781E-07	0,000887
<b>IL3RA</b>	1,010883767	0,000306725	0,034311
<b>FOLR2</b>	1,008620441	0,000500142	0,042876
<b>SLAMF8</b>	1,003063231	0,000356208	0,035496
<b>IFI44L</b>	0,99266673	0,000190126	0,025031
<b>CDKN2B</b>	0,983317964	0,000193227	0,025031
<b>MVB12B</b>	0,973439647	3,42601E-05	0,009289
<b>ANKRD22</b>	0,966609295	0,000316004	0,034311
<b>FMNL2</b>	0,934949761	0,000449725	0,040333
<b>CYP1B1</b>	0,928899705	0,000329603	0,034311
<b>FAM20C</b>	0,924751506	0,000776376	0,056749
<b>TNFAIP6</b>	0,919081017	4,28874E-06	0,002632
<b>PLCXD1</b>	0,908452434	0,000479933	0,041758
<b>ATP2B1-AS1</b>	0,906153259	0,001669992	0,090141
<b>MS4A14</b>	0,90171481	0,001271327	0,07564
<b>C1QA</b>	0,897128094	0,000652035	0,052069
<b>DDI1</b>	0,89619709	0,001992531	0,096272
<b>SASH1</b>	0,89314122	0,000797311	0,05703
<b>OAS1</b>	0,88844714	6,26005E-05	0,012584
<b>FZD1</b>	0,876593003	3,63311E-05	0,009413
<b>GPBAR1</b>	0,8706083	3,78946E-05	0,009605
<b>COL6A2</b>	0,865463319	0,000117903	0,017909
<b>OR52K1</b>	0,863048314	2,16395E-05	0,006819

<b>FCGR1A</b>	0,861570375	0,00147648	0,083397
<b>PLAGL1</b>	0,859409786	0,000328459	0,034311
<b>PLSCR1</b>	0,857203442	5,55482E-06	0,003238
<b>NETO2</b>	0,854958071	0,001477239	0,083397
<b>OR52K2</b>	0,845039003	1,80897E-05	0,006074
<b>MYOF</b>	0,827812547	0,001045307	0,066368
<b>NEDD9</b>	0,81692803	0,001511205	0,084707
<b>TFEC</b>	0,810989586	0,000696642	0,053965
<b>LAP3</b>	0,800977081	0,000667571	0,052826
<b>ID2</b>	0,79999148	0,001033253	0,066191
<b>MCOLN2</b>	0,798184086	0,001102483	0,069107
<b>OSBPL5</b>	0,798058151	0,000368275	0,036387
<b>STAT2</b>	0,797573138	1,83227E-06	0,001643
<b>CLEC1A</b>	0,78679759	0,00152153	0,084878
<b>SMARCD3</b>	0,782751622	0,000446434	0,040333
<b>MGST1</b>	0,775426949	6,9365E-05	0,013258
<b>ERCC1</b>	0,772557784	0,000722694	0,054714
<b>C9orf72</b>	0,770099262	4,49981E-05	0,010371
<b>GBP1</b>	0,764437694	0,000320601	0,034311
<b>SMCO4</b>	0,764332368	0,001912476	0,094116
<b>ARAP2</b>	0,764017749	0,000260526	0,030681
<b>PAQR7</b>	0,757722165	1,98955E-05	0,006443
<b>WARS</b>	0,742728099	0,000427583	0,039537
<b>SLED1</b>	0,73648691	0,00110932	0,069163
<b>RASSF4</b>	0,727012133	1,54251E-05	0,00562
<b>CLUH</b>	0,716577841	0,001401358	0,081286
<b>DGCR11</b>	0,711890588	0,000926941	0,06211
<b>TNS3</b>	0,71141915	0,001147127	0,070764
<b>RIN3</b>	0,702107089	0,000131437	0,018919
<b>TK2</b>	0,697982633	0,000321621	0,034311
<b>TMEM150B</b>	0,697362472	0,001773803	0,092668
<b>IFI35</b>	0,686678983	0,000182777	0,024494
<b>LPAR1</b>	0,683687445	0,00088932	0,061175
<b>LY6E</b>	0,673683941	0,000898527	0,061175
<b>FAM198B</b>	0,672908977	0,001904187	0,094116
<b>STAB1</b>	0,667761456	0,001180648	0,071694
<b>HCG26</b>	0,649856579	6,7281E-06	0,003566
<b>SLC2A6</b>	0,649847525	0,001737493	0,091663
<b>MTF1</b>	0,644770618	0,000511957	0,043569

<b>STAT1</b>	0,628991246	0,00020636	0,02587
<b>PRMT7</b>	0,628142837	0,000864029	0,061175
<b>SYNE2</b>	0,624445155	0,000413071	0,038839
<b>P2RX4</b>	0,623442732	0,000394291	0,037681
<b>IRF5</b>	0,621513486	0,000620202	0,050215
<b>CCR2</b>	0,6158715	0,000675109	0,052826
<b>LIMK1</b>	0,609513569	0,000573938	0,047458
<b>APOL6</b>	0,596246056	0,000478717	0,041758
<b>TRIM22</b>	0,595073224	0,001029494	0,066191
<b>TYMP</b>	0,586463077	0,000868622	0,061175
<b>CLIP4</b>	0,582829003	0,000339256	0,034696
<b>PLCB2</b>	0,580471566	0,00199225	0,096272
<b>TMEM170B</b>	0,578236068	0,000908673	0,061238
<b>SCARNA9</b>	0,570659477	0,000737637	0,055108
<b>ZNF106</b>	0,565830914	0,001629985	0,088556
<b>PEPD</b>	0,561159313	0,001349323	0,078659
<b>CNDP2</b>	0,550542942	0,00140968	0,081364
<b>ADAM15</b>	0,54308155	0,001833983	0,094116
<b>ACVR1B</b>	0,543024754	0,000403686	0,038265
<b>JAK2</b>	0,534235135	0,001012169	0,065927
<b>DPYD</b>	0,520660939	0,001969556	0,096272
<b>RMRP</b>	-0,514605669	0,001809596	0,093769
<b>PBXIP1</b>	-0,517034119	0,001269499	0,07564
<b>BABAM1</b>	-0,519703061	0,001904513	0,094116
<b>UBE2D3</b>	-0,524647322	0,000439667	0,040047
<b>RPS15A</b>	-0,530943595	0,000890988	0,061175
<b>RBX1</b>	-0,536784639	0,000708184	0,053965
<b>RPS25</b>	-0,537249911	0,000107957	0,017909
<b>RPL18A</b>	-0,549128671	0,001127093	0,069898
<b>TAGLN2</b>	-0,557164473	0,000478002	0,041758
<b>SUSD3</b>	-0,568289393	0,001307964	0,077018
<b>WBP2</b>	-0,56919847	0,001998271	0,096272
<b>MBOAT2</b>	-0,571187434	0,000966582	0,064031
<b>NLK</b>	-0,583790153	0,000947885	0,063151
<b>PDCD10</b>	-0,589114017	0,001342992	0,078659
<b>RSC1A1</b>	-0,600172158	0,00013001	0,018919
<b>EMC3</b>	-0,604720318	0,001780394	0,092668
<b>ZDHC20</b>	-0,608343122	0,001913151	0,094116
<b>NUP54</b>	-0,609122118	0,001879175	0,094116

<b>UBAP2</b>	-0,621230939	0,001478746	0,083397
<b>ENDOD1</b>	-0,621776342	0,001480669	0,083397
<b>OAZ1</b>	-0,645756684	3,12667E-06	0,002278
<b>FAM20B</b>	-0,649827141	0,001467948	0,083397
<b>LTB</b>	-0,653207205	0,000224935	0,027605
<b>TBPL1</b>	-0,654526005	0,001155782	0,070922
<b>POLR1D</b>	-0,655811817	0,000566394	0,047168
<b>GRINA</b>	-0,659242571	0,000202317	0,025639
<b>BRAP</b>	-0,670312045	0,000981809	0,064672
<b>CD28</b>	-0,676051651	0,001021186	0,066145
<b>TPGS2</b>	-0,678042869	0,000374078	0,03665
<b>KAT2B</b>	-0,684883809	0,000387785	0,037565
<b>PPDPF</b>	-0,693136602	0,000778778	0,056749
<b>CKAP2</b>	-0,696318831	0,00089588	0,061175
<b>PPBP</b>	-0,699480067	0,001271596	0,07564
<b>TOP1</b>	-0,706697207	0,000119291	0,017909
<b>KIAA1586</b>	-0,709152172	0,001993395	0,096272
<b>TCP11L2</b>	-0,714824969	0,001302069	0,077018
<b>DNAJA4</b>	-0,717235741	0,000350905	0,035269
<b>SRRD</b>	-0,71787513	0,001895891	0,094116
<b>NEK1</b>	-0,722212484	0,000791122	0,056936
<b>PHOSPHO1</b>	-0,731405174	0,001575177	0,087452
<b>ELOF1</b>	-0,733983288	0,000201528	0,025639
<b>SLC25A38</b>	-0,73497706	0,000173605	0,023812
<b>MITD1</b>	-0,735391552	0,000699805	0,053965
<b>APLF</b>	-0,7468337	0,001169791	0,071406
<b>UBA52</b>	-0,747150649	2,32339E-05	0,007129
<b>SLC38A5</b>	-0,756812994	0,001841445	0,094116
<b>ODC1</b>	-0,759253655	0,000164873	0,022884
<b>MAP3K7</b>	-0,75977725	0,001633028	0,088556
<b>PBX1</b>	-0,76066597	5,10736E-05	0,011235
<b>CEP85</b>	-0,763344408	0,001711437	0,090743
<b>RAB2B</b>	-0,763429962	0,000989477	0,064811
<b>SUZ12P1</b>	-0,765618993	0,001226388	0,074085
<b>YBX1</b>	-0,767051663	3,09464E-06	0,002278
<b>ANKH</b>	-0,767818988	0,000192722	0,025031
<b>ANLN</b>	-0,770143869	0,001901368	0,094116
<b>STAU1</b>	-0,772266967	0,000430667	0,039537
<b>TFRC</b>	-0,772526505	0,000465732	0,04145

<b>FBXO7</b>	-0,774165716	0,00011835	0,017909
<b>GPX1</b>	-0,775316215	0,000117373	0,017909
<b>FNTA</b>	-0,780129349	0,000234498	0,028479
<b>CDKN2D</b>	-0,784164236	9,99502E-05	0,017393
<b>POC1B</b>	-0,786686172	0,000121352	0,017909
<b>SMOX</b>	-0,786722837	0,000616978	0,050215
<b>GPR146</b>	-0,789379074	0,001625716	0,088556
<b>TRAK2</b>	-0,794238229	0,000313893	0,034311
<b>ABCB10</b>	-0,796601052	4,99679E-05	0,011203
<b>ORMDL3</b>	-0,799621529	0,000218258	0,027071
<b>SNORA16A</b>	-0,80950193	0,000347742	0,035255
<b>RPS12</b>	-0,81111059	1,42987E-06	0,001516
<b>FRMD4A</b>	-0,811719729	0,001854385	0,094116
<b>FUNDC2</b>	-0,814386531	0,000486395	0,042006
<b>CHRNA2</b>	-0,81488872	0,001709186	0,090743
<b>YIPF6</b>	-0,816022045	3,90919E-05	0,009697
<b>CCS</b>	-0,819241986	0,001099972	0,069107
<b>SPTA1</b>	-0,827315892	0,000557216	0,046738
<b>JAM3</b>	-0,832137706	0,000336149	0,034683
<b>ST6GAL2</b>	-0,832952914	0,002054937	0,098191
<b>HAUS1</b>	-0,833361886	0,000110378	0,017909
<b>GID4</b>	-0,835775571	0,000735902	0,055108
<b>GATA1</b>	-0,837353049	0,000326021	0,034311
<b>FCMR</b>	-0,839604627	0,000291251	0,033621
<b>FSTL1</b>	-0,8435171	0,000902487	0,061175
<b>RFX2</b>	-0,84438156	0,000113913	0,017909
<b>LGALS3</b>	-0,844472587	0,000429789	0,039537
<b>DPM2</b>	-0,850829966	0,000595524	0,048896
<b>RBPM2</b>	-0,85462787	0,000255724	0,030456
<b>UBE2O</b>	-0,856128378	0,000704826	0,053965
<b>LSS</b>	-0,862558728	0,002072045	0,098604
<b>MICALCL</b>	-0,866113696	0,001601469	0,088073
<b>UBXN6</b>	-0,866890531	4,39283E-05	0,010371
<b>GYPC</b>	-0,870381399	0,000117448	0,017909
<b>CD79A</b>	-0,874478262	0,001047404	0,066368
<b>ZNF569</b>	-0,875501254	0,00030254	0,034246
<b>USP32P1</b>	-0,875944254	0,001766325	0,092668
<b>AK5</b>	-0,876072248	0,002048913	0,098191
<b>FKBP1B</b>	-0,879184086	0,001584994	0,08758

<b>GSKIP</b>	-0,883167756	0,0001506	0,021155
<b>MASTL</b>	-0,885306325	6,60662E-05	0,013055
<b>RPIA</b>	-0,88792987	5,86929E-05	0,01222
<b>PRDX6</b>	-0,892753669	3,81514E-06	0,002471
<b>ASCC2</b>	-0,895212627	9,88797E-05	0,017393
<b>ZNF860</b>	-0,898927923	0,001909626	0,094116
<b>NMNAT3</b>	-0,899789653	0,001838893	0,094116
<b>DNAJC6</b>	-0,90416748	8,72787E-05	0,016152
<b>IGF2BP2</b>	-0,912871371	3,54308E-05	0,009388
<b>KANK2</b>	-0,916696336	0,000673512	0,052826
<b>EMID1</b>	-0,919761113	0,00078649	0,056936
<b>AQP3</b>	-0,92072413	9,04522E-07	0,001055
<b>FCRLA</b>	-0,921444188	0,000777874	0,056749
<b>VRK1</b>	-0,921830602	4,53652E-05	0,010371
<b>BLVRB</b>	-0,931885397	6,2577E-05	0,012584
<b>GCSAM</b>	-0,932435844	0,000389857	0,037565
<b>SNX22</b>	-0,932799561	9,04436E-05	0,016476
<b>DLGAP5</b>	-0,939488949	0,000313075	0,034311
<b>ICAM4</b>	-0,940145228	0,000873027	0,061175
<b>UBL5</b>	-0,943031401	1,80384E-05	0,006074
<b>BUB1B</b>	-0,944005777	0,000550408	0,046501
<b>PRDX2</b>	-0,946388234	8,56035E-06	0,003992
<b>BAG1</b>	-0,953642108	3,35252E-05	0,009289
<b>RHAG</b>	-0,958549642	0,000141443	0,020111
<b>PSMF1</b>	-0,959355981	3,41666E-06	0,002343
<b>LSR</b>	-0,975988973	0,000742086	0,055108
<b>CDKN3</b>	-0,987707626	0,00011251	0,017909
<b>SNORA71D</b>	-0,989698062	1,17536E-05	0,004894
<b>POLE2</b>	-0,990216972	0,000285808	0,033322
<b>CLEC9A</b>	-1,002315038	0,000180361	0,024452
<b>KIF15</b>	-1,016713074	5,64691E-05	0,01197
<b>DNA2</b>	-1,019119596	6,80938E-05	0,013232
<b>PLEK2</b>	-1,026902658	9,73793E-05	0,017393
<b>NT5M</b>	-1,032148524	2,73582E-05	0,00778
<b>TSPAN5</b>	-1,032373896	3,1717E-07	0,000616
<b>GUK1</b>	-1,035326931	1,73295E-06	0,001643
<b>LOC730101</b>	-1,036612124	0,000256002	0,030456
<b>NINJ2</b>	-1,052845739	1,50985E-07	0,00044
<b>OR2W3</b>	-1,062850241	1,8233E-05	0,006074

---

<b>RGCC</b>	-1,064709629	2,50811E-05	0,007498
<b>RANBP17</b>	-1,073135607	7,43785E-06	0,003618
<b>CCDC34</b>	-1,075691533	2,57829E-05	0,007515
<b>ACKR1</b>	-1,081478132	0,000104049	0,01784
<b>BARD1</b>	-1,086084386	1,11301E-05	0,004806
<b>CMAS</b>	-1,086439843	2,44432E-08	9,5E-05
<b>PLD6</b>	-1,113075892	0,000120687	0,017909
<b>ITLN1</b>	-1,140893649	5,4092E-05	0,011679
<b>KLF1</b>	-1,154097243	6,02105E-06	0,003343
<b>TNFRSF13C</b>	-1,156366181	4,38642E-05	0,010371
<b>ZNF215</b>	-1,292311441	7,44688E-06	0,003618
<b>NUSAP1</b>	-1,361999333	1,25503E-08	7,32E-05

---

## Anexo IX. Análisis de enriquecimiento por términos de ontología - GO para genes sobre expresados

### ONTOLOGÍA PROCESO BIOLÓGICO (BP)

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20170413)  
 Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2017-09-26  
 Analyzed List: upload\_1 (Homo sapiens)  
 Reference List: Homo sapiens (all genes in database)  
 Bonferroni correction: true  
 Bonferroni count: 8638

GO biological process complete	Homo sapiens - REFLIST (21002)	upload_1 (93)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
interferon-gamma-mediated signaling pathway (GO:0060333)	71	7	.31	+	22.26	3.20E-04
type I interferon signaling pathway (GO:0060337)	65	6	.29	+	20.85	4.60E-03
cellular response to type I interferon (GO:0071357)	65	6	.29	+	20.85	4.60E-03
response to type I interferon (GO:0034340)	70	6	.31	+	19.36	7.04E-03
cellular response to interferon-gamma (GO:0071346)	127	8	.56	+	14.23	9.96E-04
response to interferon-gamma (GO:0034341)	149	8	.66	+	12.12	3.30E-03
defense response to virus (GO:0051607)	181	8	.80	+	9.98	1.40E-02
response to virus (GO:0009615)	268	9	1.19	+	7.58	2.84E-02
innate immune response (GO:0045087)	675	15	2.99	+	5.02	2.53E-03
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	602	13	2.67	+	4.88	2.31E-02
defense response (GO:0006952)	1227	23	5.43	+	4.23	2.49E-05
response to stress (GO:0006950)	3333	35	14.76	+	2.37	2.73E-03
response to stimulus (GO:0050896)	8009	57	35.47	+	1.61	4.48E-02
Unclassified (UNCLASSIFIED)	3579	8	15.85	-	.50	0.00E00

### ONTOLOGÍA COMPONENTE CELULAR (CC)

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20170413)  
 Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2017-09-26  
 Analyzed List: upload\_1 (Homo sapiens)  
 Reference List: Homo sapiens (all genes in database)  
 Bonferroni correction: true  
 Bonferroni count: 1345

GO cellular component complete	Homo sapiens - REFLIST (21002)	upload_1 (93)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
Unclassified (UNCLASSIFIED)	2490	4	11.03	-	.36	0.00E00

### ONTOLOGÍA FUNCIÓN MOLECULAR (MF)

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20170413)  
 Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2017-09-26  
 Analyzed List: upload\_1 (Homo sapiens)  
 Reference List: Homo sapiens (all genes in database)  
 Bonferroni correction: true  
 Bonferroni count: 3154

GO molecular function complete	Homo sapiens - REFLIST (21002)	upload_1 (93)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (P-value)
Unclassified (UNCLASSIFIED)	3569	10	15.80	-	.63	0.00E00

## **Anexo X. Análisis de enriquecimiento por términos de ontología - GO para genes sub expresados**

### **ONTOLOGÍA PROCESO BIOLÓGICO (BP)**

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20170413)  
 Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2017-09-26  
 Analyzed List: upload\_1 (Homo sapiens)  
 Reference List: Homo sapiens (all genes in database)  
 Bonferroni correction: true  
 Bonferroni count: 8638  
 GO biological process complete Homo sapiens - REFLIST (21002) upload\_1 (145) upload\_1 (expected) upload\_1 (over/under) upload\_1 (fold Enrichment) upload\_1 (P-value)  
 mitotic cell cycle process (GO:1903047) 647 18 4.47 + 4.03 5.35E-03  
 mitotic cell cycle (GO:0000278) 703 19 4.85 + 3.91 3.92E-03  
 regulation of cell cycle (GO:0051726) 1132 24 7.82 + 3.07 8.42E-03  
 biological regulation (GO:0065007) 11993 109 82.80 + 1.32 3.94E-02  
 biological\_process (GO:0008150) 17423 140 120.29 + 1.16 3.24E-03  
 Unclassified (UNCLASSIFIED) 3579 5 24.71 - .20 0.00E00

### **ONTOLOGÍA COMPONENTE CELULAR (CC)**

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20170413)  
 Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2017-09-26  
 Analyzed List: upload\_1 (Homo sapiens)  
 Reference List: Homo sapiens (all genes in database)  
 Bonferroni correction: true  
 Bonferroni count: 1345  
 GO cellular component complete Homo sapiens - REFLIST (21002) upload\_1 (145) upload\_1 (expected) upload\_1 (over/under) upload\_1 (fold Enrichment) upload\_1 (P-value)  
 cytoplasm (GO:0005737) 11346 111 78.33 + 1.42 2.23E-05  
 cytoplasmic part (GO:0044444) 9411 92 64.97 + 1.42 6.53E-03  
 intracellular part (GO:0044424) 14208 122 98.09 + 1.24 7.16E-03  
 intracellular (GO:0005622) 14552 122 100.47 + 1.21 4.20E-02  
 cell part (GO:0044464) 16748 138 115.63 + 1.19 1.46E-04  
 cell (GO:0005623) 16776 138 115.82 + 1.19 1.76E-04  
 Unclassified (UNCLASSIFIED) 2490 6 17.19 - .35 0.00E00

### **ONTOLOGÍA FUNCIÓN MOLECULAR (MF)**

Analysis Type: PANTHER Overrepresentation Test (release 20170413)  
 Annotation Version and Release Date: GO Ontology database Released 2017-09-26  
 Analyzed List: upload\_1 (Homo sapiens)  
 Reference List: Homo sapiens (all genes in database)  
 Bonferroni correction: true  
 Bonferroni count: 3154  
 GO molecular function complete Homo sapiens - REFLIST (21002) upload\_1 (145) upload\_1 (expected) upload\_1 (over/under) upload\_1 (fold Enrichment) upload\_1 (P-value)  
 Unclassified (UNCLASSIFIED) 3569 14 24.64 - .57 0.00E00