



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

**MicroRNAs circulantes como biomarcadores
emergentes para la progresión de la
enfermedad de Huntington**

Carlos Díez Planelles

10 de Julio de 2015

Trabajo Fin de Máster

SUMMARY	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Bases genéticas y neuropatología de la enfermedad de Huntington.....	6
Huntingtina: estructura y funciones	7
Mecanismos fisiopatológicos en la enfermedad de Huntington	8
Alteraciones en el metabolismo energético central.....	9
PGC-1 α y alteraciones del metabolismo energético periférico	10
Alteraciones neuroendocrinas	11
MicroRNAs: biogénesis y función biológica	11
MicroRNAs circulantes como marcadores biológicos.....	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
SUJETOS Y MÉTODOS	16
Diseño del estudio	16
Sujetos del estudio	16
Obtención de las muestras de sangre.....	17
Aislamiento del RNA y qRT-PCR.....	17
Análisis de las rutas y predicción de las dianas de los miRNAs	18
Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
<i>99 miRNAs circulantes plasmáticos se encuentran alterados en la fase sintomática de la EH</i>	<i>19</i>
<i>La expresión de los miRNAs intrónicos en la EH puede estar alterada por su entorno génico</i>	<i>24</i>
<i>Los miRNAs plasmáticos presentan múltiples dianas validadas en la rutas afectadas por EH.....</i>	<i>27</i>
<i>25 miRNAs plasmáticos presentan un alto potencial como marcadores biológicos de la fase sintomática en la EH.....</i>	<i>32</i>
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXO.....	42

SUMMARY

Huntington disease (HD) is a neurodegenerative disorder caused by an expansion of CAG triplet in exon 1 of *HTT* gene, characterized by psychological and motor disturbance. Complementary, HD shows a metabolic dysregulation in peripheral tissues and neurological centers, negatively contributing to patient's quality of life. Taking this systemic alteration, research on biomarkers with ability of compiling central and peripheral alteration during disease course is necessary. In this context, microRNAs (miRNAs) have emerged as a new mechanism of gene expression regulation and intercellular communication, being used as progression biomarkers of different diseases. In this study, we have explored circulating miRNA profile in plasma from six HD symptomatic patients, between 40 and 45 CAG repetitions, and five healthy age-matched controls. Isolated miRNAs from plasma samples have been run against human miRNome panel to amplify 752 miRNAs, using qRT-PCR technique. Our results show that 99 circulating miRNAs were altered in symptomatic HD patients. Many of them have been previously described in HD brain samples, other neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, lateral amyotrophic sclerosis) and metabolic disorders (obesity, type 2 diabetes). Moreover, 25 of 99 miRNAs have as validated targets genes related to coordination of metabolic pathways and high expression in modified tissues during HD progression, probably being able to functionally modify these pathways. Thus, these 25 miRNAs (miR-126-3p, miR-128, miR-130a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-152, miR-181b-5p, miR-181d, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-26a-5p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-301a-3p, miR-30d-5p, miR-335-5p, miR-584-5p, miR-941 y miR-99b-5p) are potential biomarkers of symptomatic HD stage. Determination of the miRNA origins, along with its target tissues, could arise important clues for future disease therapies.

RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión del triplete CAG en el exón 1 del gen *HTT*, caracterizada por alteraciones psicológicas y motoras. Complementariamente, la EH presenta una desregulación metabólica que implica a los tejidos periféricos y centros neuronales, contribuyendo negativamente a la calidad de vida de los pacientes. Ante la afectación sistémica, se hace necesaria la búsqueda de biomarcadores capaces de evaluar el grado de afectación central y periférica durante el curso de la enfermedad. En este contexto, los microRNAs (miRNAs) han emergido como un nuevo mecanismo para el control de la regulación génica y comunicación intercelular, siendo utilizados como biomarcadores de progresión en distintas patologías. En este estudio hemos analizado el perfil de miRNAs circulantes plasmáticos de seis pacientes, que muestran entre 40 y 45 repeticiones CAG, y cinco sujetos control sanos de edad semejante. Los miRNAs aislados de muestras de plasma se han analizado utilizando un panel miRNome para la amplificación de 752 miRNAs humanos, mediante la técnica qRT-PCR. Los resultados obtenidos muestran que 99 miRNAs circulantes se encuentran alterados en los pacientes sintomáticos de la EH. Muchos de estos miRNAs han sido detectados en tejido cerebral de la EH, en otras enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica) y en desordenes metabólicos (obesidad, diabetes tipo 2). Asimismo, 25 de los 99 miRNAs presentan dianas génicas en las principales rutas celulares encargadas de coordinar el estado metabólico y alta expresión en los tejidos modificados en la progresión de la enfermedad, pudiendo participar funcionalmente en la desregulación de estas vías. Por tanto, estos 25 miRNAs (miR-126-3p, miR-128, miR-130a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-152, miR-181b-5p, miR-181d, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-26a-5p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-301a-3p, miR-30d-5p, miR-335-5p, miR-584-5p, miR-941 y miR-99b-5p) presentan un alto potencial como marcadores biológicos de la fase sintomática de la EH. La determinación de los tejidos de origen de los miRNAs plasmáticos, así como sus tejidos diana, permitiría establecer en un futuro terapias enfocadas a ralentizar la progresión de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Bases genéticas y neuropatología de la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica dominante, causada por una expansión inestable del triplete CAG en el exón 1 del gen *HTT*, en un número superior a 35 repeticiones (Bates, 2005). A consecuencia de la mutación se produce una elongación de los residuos de glutamina en el extremo NH₂-terminal de la proteína huntingtina (HTT), dando lugar a una variable mutante de la proteína (m-HTT) característica de la enfermedad (Bates et al., 2015).

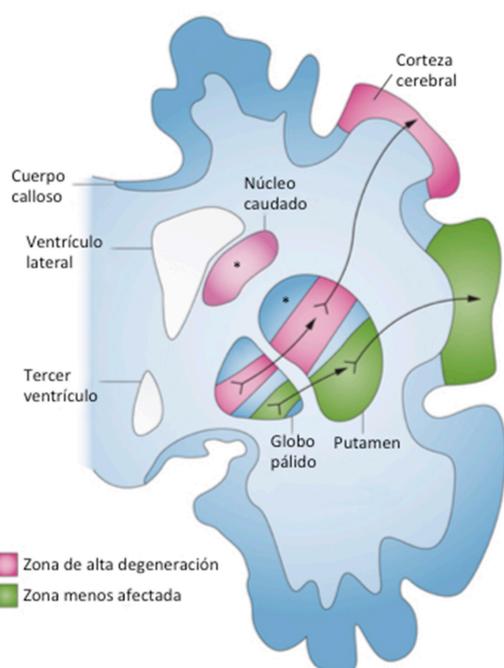


Figura 1. Esquema del posible circuito de neurodegeneración en la enfermedad de Huntington. La neurodegeneración se inicia en la parte dorsal del núcleo estriado, afectando principalmente al núcleo caudado. La corteza cerebral se ve afectada por el progreso de la enfermedad. Sin embargo, la parte ventral de estas estructuras se encuentra mejor conservada. En rosa, las zonas de alta degeneración; en verde, las zonas menos afectadas. Figura tomada y modificada de Ross et al., 2014.

La patología de la EH es significativa en el cerebro, afectando principalmente al núcleo caudado y al putamen, en el núcleo estriado (ver figura 1) (Zuccato et al., 2010). Las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado son las más vulnerables en el proceso de la enfermedad, especialmente aquellas que se proyectan hacia la parte externa del globo pálido (Walker, 2007). Otras áreas encefálicas presentan atrofia a nivel macroscópico, aunque en menor proporción que el estriado. Estas áreas incluyen el globo pálido, el tálamo, el hipocampo y la corteza cerebral. Destaca esta última porque sufre atrofia en individuos asintomáticos y sintomáticos, con posterioridad a la atrofia del estriado, agravándose con el avance de

los síntomas motores. Microscópicamente, se observan anomalías en la orientación de fibras e integridad de la materia blanca y, a nivel subcortical, en la estructura de la materia gris (Ross et al., 2014).

Normalmente, la EH cursa durante 15-20 años desde la aparición de los primeros síntomas, siendo común su desarrollo en la mediana edad. Los síntomas característicos

de la EH incluyen desórdenes psiquiátricos, pérdida de la capacidad cognitiva y disfunciones motoras (Bates, 2005). Durante las últimas etapas de la enfermedad se observan graves deficiencias motoras: distonía, rigidez, bradicinesia, mioclonía, temblor y disfunción ocular; así como demencia y pérdida de los procesos cognitivos. Finalmente, la pérdida de control sobre las funciones motoras conlleva dificultades respiratorias y malnutrición, hasta la muerte de los afectados (Zuccato et al., 2010).

Huntingtina: estructura y funciones

La HTT es una proteína de 348 kDa de expresión ubicua, que presenta altos niveles de expresión en el sistema nervioso central, particularmente en las neuronas piramidales corticales que proyectan hacia el núcleo estriado (Zuccato et al., 2010).

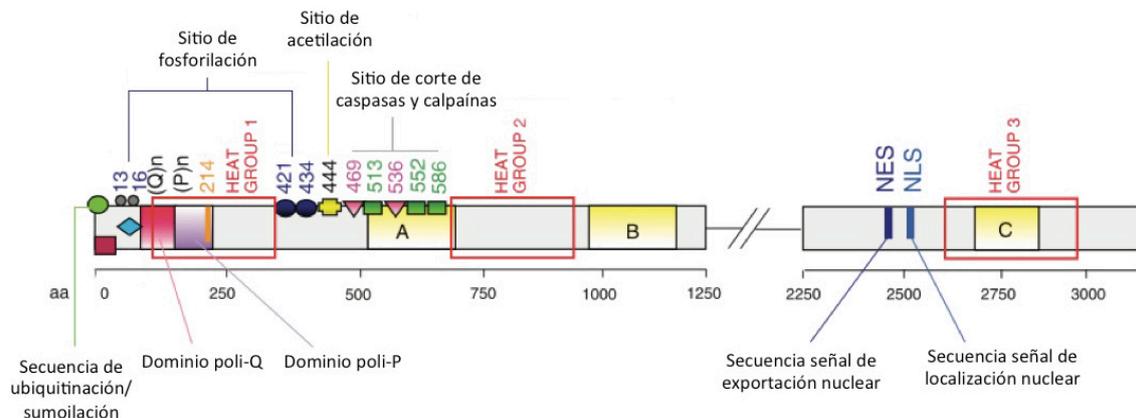


Figura 2. Diagrama de los diferentes dominios y secuencias de la huntingtina (HTT). Q(n) representa el dominio poli-Q; seguido del dominio P(n), poli-P. Los rectángulos rojos representan los dominios HEAT (HEAT groups 1,2 y 3), importantes en la interacción con otras proteínas. Los pequeños cuadrados verdes y triángulos rosas representan los zonas de corte de caspasas y calpaínas respectivamente, acompañadas del número que indica su posición aminoacídica. Las cajas amarillas indican los sitios de escisión de la proteína en diferentes tejidos: B, corteza cerebral; C, núcleo estriado; A, ambos. Regiones de modificación post-traduccional: de ubiquitinación y sumoilación (verde), palmitoilación (naranja), fosforilación (azul), acetilación (amarillo). NES (*nuclear export signal*) y NLS (*nuclear localization sequence*). El rombo azul es la secuencia TPR (*translocated promoter region*) necesaria para la exportación nuclear a través de las proteínas poro. El cuadrado granate representa la secuencia de asociación al aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Figura tomada y adaptada de Zuccato et al., 2010.

La HTT posee un dominio poliglutamina (poli-Q) en su extremo NH₂-terminal, codificado por la secuencia (CAG)_n del exón 1 del gen *HTT*. El dominio poli-Q en HTT abarca 18-35 residuos de glutamina, mientras que en m-HTT contiene más de 35 residuos. El dominio poli-Q forma una estructura polar en forma de cremallera, clave en la regulación de la proteína, modulando su normal funcionamiento celular. Adyacente a la región poli-Q hay una región rica en prolina, conocida como región poli-P (ver figura 2). El dominio poli-P podría estar implicado en la estabilización de los residuos de

glutamina, manteniendo la proteína en un ambiente soluble (Zuccato et al., 2010), y en la interacción con otras proteínas (Bates et al., 2015). Otro dominio, conocido como HEAT (*Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A and TOR1*), se repite varias veces a lo largo de la secuencia proteica, siendo importante en la interacción con otras macromoléculas. Además de los dominios mencionados, existen secuencias consenso para la acción de proteasas (caspasas, calpaínas y distintas endoproteasas) y otras modificaciones post-traduccionales (Bates et al., 2015).

A pesar de esta información estructural, la función biológica de HTT es desconocida. Los estudios funcionales hasta la fecha indican que este factor interactúa con multitud de proteínas. Cabe la posibilidad de que la HTT posea una estructura multifuncional, capaz de asumir actividades o conformaciones específicas dependiendo de su sustrato, localización celular, tipo celular o tejido. Entre los posibles roles de la HTT destacan: modulador del desarrollo embrionario, antiapoptótico, regulador de la producción de neurotrofinas, regulador del transporte vesicular y de la actividad sináptica (Zuccato et al., 2010).

Mecanismos fisiopatológicos en la enfermedad de Huntington

La edad de manifestación y progresión de la enfermedad está inversamente relacionada con el número de repeticiones del triplete de bases CAG heredadas (Møllersen et al., 2010). La expansión del dominio poli-Q mutado produce una ganancia de función tóxica en la m-HTT (Hoffner y Dijan, 2014), pudiendo alterar los sitios de modificación post-transcripcional de la proteína al transformar las propiedades estructurales y proteolíticas de la m-HTT (Bates et al., 2015). Un patrón común en las enfermedades poli-Q-dependientes es la formación intraneuronal de agregados citoplasmáticos y nucleares de proteína, fundamentalmente constituidos por m-HTT o fragmentos con el dominio poli-Q expandido (Tomás-Zapico et al., 2012). En la EH, los agregados son comunes en las neuronas del núcleo estriado y corteza cerebral, jugando un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Zuccato et al., 2010). Los agregados se acumulan en diferentes estructuras, tales como fibrillas, oligómeros e inclusiones microscópicas. La diferencia entre la estructura y composición de los agregados parece influir en el grado de toxicidad de los fragmentos poli-Q, donde los agregados estables parecen tener un efecto protector, mientras que las inclusiones de

tamaño intermedio pueden tener efectos citotóxicos al presentar el dominio poli-Q expandido activo (Hoffner y Dijan, 2014).

El efecto tóxico de la m-HTT sobre la maquinaria celular depende de múltiples factores, entre los que se incluyen el nivel de expresión de la proteína, la fase del ciclo celular, el número de repeticiones CAG, la extensión del *splicing* aberrante, la producción de fragmentos bioactivos y la expansión somática de las repeticiones CAG (Bates et al., 2015). Así, durante el transcurso de la EH, previamente a la formación de agregados, fragmentos de m-HTT con dominios poli-Q de distintos tamaños se producen por proteólisis y *splicing* aberrante. Fisiológicamente, la expresión de la m-HTT produce un fallo en la homeostasis proteica, comprometiendo gravemente la función del proteasoma. Finalmente, las diferentes formas citotóxicas de la m-HTT producen deficiencias en muchos procesos celulares, como transcripción, señalización intracelular, transporte intracelular, vías de secreción, endocitosis, metabolismo mitocondrial, actividad sináptica e inmunidad; que amplifican el efecto nocivo de la m-HTT y producen una patología integral y compleja (Bates et al., 2015).

Alteraciones en el metabolismo energético central

El BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) es un factor neurotrófico clave para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central y periférico, que promueve la diferenciación de células madre, expansión de neuritas y sinaptogénesis, previniendo la apoptosis. Su presencia en los principales centros reguladores energéticos hipotalámicos y tejido periférico hace de esta neurotrofina una reguladora de la homeostasis energética, a través de su función anorexigénica, mediando en la respuesta adaptativa a las fluctuaciones energéticas del cerebro y tejido periférico (Marosi y Mattson, 2014). En condiciones normales, las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado reciben un aporte de BDNF, mediante transporte anterógrado, desde el córtex cerebral. En la EH, la síntesis de BDNF en la corteza cerebral se encuentra disminuida en un 50%, contribuyendo a la vulnerabilidad neuronal del núcleo estriado (Zuccato et al., 2010). En la EH, la reducción en la transcripción de *BDNF* está ocasionada por la escisión de la m-HTT del complejo REST (*repressor element-1 silencing transcription factor*), produciendo un aumento de la actividad del represor transcripcional al pasar REST libremente hacia el núcleo (Soldati et al., 2013; Ben M'Barek et al., 2013).

Paralelamente, el transporte anterógrado de BDNF desde el córtex cerebral hasta el núcleo estriado es interrumpido por la m-HTT, al interactuar el dominio poli-Q expandido con las proteínas motoras (HAP-1, *huntingtin associated protein-1*) y microtúbulos (Gauthier et al., 2004).

PGC-1 α y alteraciones del metabolismo energético periférico

La EH es una enfermedad compleja que presenta un componente periférico en su patología (Zielonka et al., 2014). La regulación transcripcional aberrante en la EH es uno de los mecanismos patogénicos más importantes subyacentes a la toxicidad de la m-HTT. Así, la unión de la m-HTT a diversos factores de transcripción o coactivadores puede resultar en una interferencia de la función de los mismos (Chiang et al., 2010).

PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α*) es un coactivador transcripcional que regula varios procesos metabólicos, entre los que se incluyen la biogénesis mitocondrial, fosforilación oxidativa, termogénesis adaptativa, β -oxidación de ácidos grasos, defensa frente al estrés oxidativo, metabolismo de la glucosa y especialización de la fibras musculares (Cui et al., 2006; Lin et al., 2002; McGill y Beal, 2006). *PGC-1 α* presenta altos niveles de expresión en aquellos tejidos con mayor requerimiento energético y alta densidad mitocondrial (McGill y Beal, 2006). El estudio de modelos animales de la EH y tejido post mórtem de pacientes revela una disminución de la expresión de *PGC-1 α* en el núcleo caudado del estriado y músculo esquelético, zonas muy afectadas en el curso de la enfermedad (Cui et al., 2006; Weydt et al., 2006; Zielonka et al., 2014). En la EH, la m-HTT interfiere con los reguladores transcripcionales CREB (*cAMP response element-binding protein*) y TAF4 (*TATA box binding protein-associated factor*), lo que produce una inhibición de la expresión de *PGC-1 α* y limita la capacidad de respuesta a la demanda energética (Cui et al., 2006). A su vez, se cree que la m-HTT puede interactuar directamente con el coactivador PGC-1 α , inactivándolo (Weydt et al., 2006). Finalmente, como consecuencia de la deficiencia en la función o expresión de *PGC-1 α* varios programas génicos importantes en el metabolismo energético se encuentran alterados en la EH (McGill y Beal, 2006; St-Pierre et al., 2006; Weydt et al., 2006).

Alteraciones neuroendocrinas

La ingesta de alimentos está sujeta a control neuroendocrino a través del efecto de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos sobre las diferentes poblaciones neuronales hipotalámicas (Sousa-Ferreira et al., 2011). Asimismo, la composición y función del tejido adiposo repercute en la regulación de la toma de alimentos y peso corporal, dado que este tejido presenta un importante componente paracrino y endocrino mediante la secreción de adipocitocinas que tienen efecto sobre los núcleos reguladores del sistema nervioso central (Aziz et al., 2010). En la EH, la afectación hipotalámica se ha correlacionado con alteraciones del patrón alimentario, traducándose en disfunciones en el peso corporal de los pacientes y modelos animales, y por tanto, presentando gran relevancia en la patología central y periférica en la enfermedad. En las fases iniciales de la enfermedad, la ingestión calórica aumenta, con el consiguiente incremento del peso corporal, en un proceso mediado por la expresión de la m-HTT en el hipotálamo (Hult et al., 2011). Sin embargo, en estados avanzados y modelos animales de rápida progresión se produce una pérdida de peso corporal (Aziz et al., 2010; Phan et al., 2009). Los cambios en la expresión génica del tejido adiposo blanco durante el transcurso de la enfermedad pueden recapitular parte de las alteraciones metabólicas surgidas durante las fases avanzadas de la EH. En los modelos animales de rápida progresión se observa una disminución de los factores de transcripción adipogénicos claves, así como de genes de síntesis y almacenamiento lipídico y adipocitoquinas (Phan et al., 2009).

MicroRNAs: biogénesis y función biológica

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes de ~22 nucleótidos que post-transcripcionalmente silencian genes controlando la traducción del mRNA (Esteller, 2011). Los miRNAs son una familia génica muy abundante y bien conservada evolutivamente, cuya secuencia se presenta en distintos entornos genómicos. En humanos, la mayoría de los miRNAs están incluidos en intrones de transcritos codificantes y no codificantes de proteínas, aunque también pueden ser hallados en exones (Ha y Kim, 2014).

En la biogénesis estándar, los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II, formando miRNAs primarios (pri-miRNA), largos transcritos de RNA de doble cadena intramolecular en forma de horquilla. Posteriormente, los pri-miRNAs se integran en el

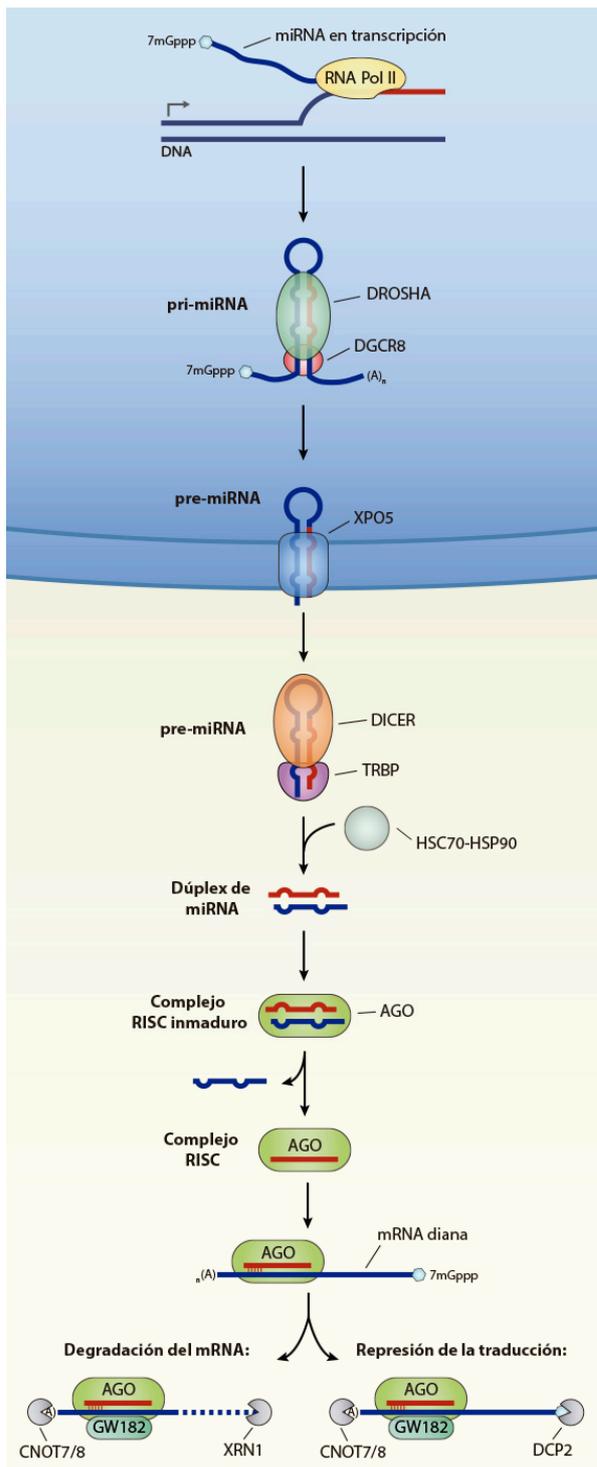


Figura 3. Biogénesis estándar de un miRNA intrínico incluido en una región no codificante de proteína. El transcrito de miRNA sufre varias modificaciones por la acción de nucleasas (DROSHA, DICER), hasta ejercer su función en la degradación y represión del mRNA diana mediante su integración en el complejo RISC en colaboración con CNOT7/8 (complejo de transcripción CCR4-NOT subunidad 7 y 8), XRN1 (5'-3' exorribonucleasa 1) y DCP2 (*decapping mRNA 2*). Figura adaptada de Ameres y Zamore, 2013; Huntzinger e Izaurralde, 2011.

complejo DROSHA / DGCR8, formado por la ribonucleasa DROSHA, y la proteína de unión de RNA DGCR8 (Shenoy y Blelloch, 2014). DROSHA escinde el pri-miRNA en un fragmento en horquilla de ~60 nucleótidos, formando el miRNA precursor o pre-miRNA (ver figura 3). Los pre-miRNAs resultantes son transportados al citoplasma por la XPO5 (*exportin 5*). Una vez en el citoplasma, la endonucleasa DICER, junto con TRBP (*transactivation-response RNA binding protein*), procesa el pre-miRNA formando una doble cadena de RNA de ~22 nucleótidos o dúplex de miRNAs. Con la colaboración de las chaperonas HSC70 y HSP90, el dúplex de miRNA es cargado en la proteína Argonauta (AGO). Finalmente, AGO expulsa una de las cadenas del dúplex de miRNA, formando el complejo RISC (*RNA induced silencing complex*), encargado del silenciamiento de mRNA diana (Ameres y Zamore, 2013; Ha y Kim, 2014).

Más de la mitad de los genes codificantes de proteínas presentan sitios de unión para los miRNAs sugiriendo que su expresión puede estar

sometida a control por medio de los miRNAs (Ameres y Zamore, 2013). Los miRNAs funcionan como guía para la acción represora de la traducción de las proteínas AGO, generalmente mediante el apareamiento con el extremo 3'-UTR (*untranslated region*) del mRNA diana. El reconocimiento del mRNA diana se produce tras la hibridación de los nucleótidos del extremo 5' del miRNA, principalmente entre los nucleótidos 2-7, y de manera accesoria por los nucleótidos 8 y 13-16 (Ha y Kim, 2014). Tras el apareamiento del complejo RISC con el mRNA diana, la asociación de la proteína GW182 con AGO2 induce modificaciones en los extremos 3' y 5' del mRNA (deadenilación y *decapping*), reprimiendo la traducción y promoviendo la degradación del mRNA (Ameres y Zamore, 2013; Huntzinger e Izaurralde, 2011).

MicroRNAs circulantes como marcadores biológicos

Los miRNAs están presentes en numerosos fluidos corporales, incluyendo suero, plasma, orina y saliva (Jin et al., 2013). Sin embargo, su procedencia está sometida a debate, puesto que existe la posibilidad de que sean liberados de manera incontrolada por las células o tejidos dañados, o bien secretados activamente bajo un sistema regulado (Mendell y Olson, 2012). Independientemente del sistema de liberación, los miRNAs circulantes pueden ejercer funciones paracrinas y endocrinas al actuar sobre células distintas a la fuente de origen (Durmortier et al., 2013).

El hallazgo de perfiles característicos de miRNAs circulantes en suero de pacientes con cáncer y diferentes enfermedades cardiovasculares (Lujambio y Lowe, 2012; Mendell y Olson, 2012), ha atraído la atención sobre estas moléculas como posibles biomarcadores diagnósticos y de fase en diferentes patologías (Dumortier et al., 2013). Entre las características que hacen de los miRNAs circulantes potenciales biomarcadores, capaces monitorizar el estado de una enfermedad, se encuentra una alta resistencia al ambiente extracelular (Jin et al., 2013), ya que los miRNAs plasmáticos forman complejos con AGO2 o están embebidos en exosomas (Mendell y Olson, 2012), haciéndolos resistentes a la acción de ribonucleasas, cambios en el pH y temperatura (Jin et al., 2013). Además, los cambios observados en el nivel de los miRNAs circulantes se pueden correlacionar con cambios en los tejidos durante el proceso de una enfermedad, pudiendo ser obtenidos mediante técnicas poco invasivas. Sin embargo, también existen limitaciones en el uso de los miRNAs circulantes como biomarcadores, definidas por

una alta complejidad de los circuitos regulatorios, falta de estandarización de métodos para la extracción y cuantificación, necesidad de un perfil amplio de miRNAs que permita aumentar la sensibilidad, ausencia de controles endógenos para normalizar los datos (Jin et al., 2013) y necesidad de un conocimiento profundo de las bases moleculares de la patología (Esteller, 2011).

Los miRNAs circulantes han sido propuestos como potenciales marcadores biológicos en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Geekiyana et al., 2012; Jin et al., 2013). En la EH, existe una necesidad de desarrollar biomarcadores de fase que permitan predecir la progresión de la enfermedad (Bates et al., 2015). Estudios previos en modelos experimentales y tejido post mórtem de pacientes afectados de la EH han demostrado que el nivel de expresión de diferentes miRNAs se encuentra alterado durante el progreso de la enfermedad (Lee et al., 2011; Maciotta et al., 2013). Sin embargo, hasta el momento, ningún estudio ha descrito un perfil plasmático de miRNAs circulantes en pacientes en fase sintomática de la enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El perfil de miRNAs circulantes plasmáticos se encuentra alterado en pacientes en fase sintomática de la EH, respecto a sujetos sanos y de edad similar, como consecuencia de la alteración central y periférica durante el avance de la enfermedad.

Objetivos

1. Determinar qué miRNAs circulantes plasmáticos se encuentran alterados en la fase manifiesta de la EH.
2. Relacionar los miRNAs circulantes alterados con las rutas moleculares comúnmente desreguladas en la enfermedad.
3. Obtener un perfil de miRNAs circulantes plasmáticos que pueda ser utilizado como biomarcador potencial de fase en la EH.

SUJETOS Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Para llevar a cabo los objetivos propuestos se ha realizado un estudio de casos (pacientes de EH) y controles (sujetos sanos de la misma edad que los casos) de tipo transversal.

El análisis de las muestras utilizadas para el estudio se ha llevado a cabo en el laboratorio del área de Fisiología de la Universidad de Oviedo

Sujetos del estudio

Los sujetos para este estudio han sido reclutados en el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) entre Febrero y Mayo de 2014. Los pacientes de EH se seleccionaron en base a los siguientes criterios de inclusión y de exclusión:

- Criterios de inclusión:
 - 1) Hombres diagnosticados con la EH mediante test genético y en fase manifiesta de la enfermedad.
 - 2) Número de repeticiones del triplete CAG comprendido entre 40 y 45.
 - 3) Firma de consentimiento informado.
- Criterios de exclusión:
 - 1) Pacientes polimedicados para patologías previas.
 - 2) Haber realizado ejercicio físico 72 horas antes de la toma de muestras.

De un total de 30 pacientes de la EH atendidos en el Servicio de Neurología del HUCA, sólo 10 presentaban un rango de repeticiones CAG adecuado para el estudio. De este subgrupo de pacientes de la EH, sólo seis pacientes mostraron su conformidad a participar en el estudio, dando su consentimiento firmado. Los cinco sujetos control han sido reclutados entre los empleados de la Universidad de Oviedo, estableciendo como condición la selección de sujetos sanos que estuviesen en un rango de edad similar al de los pacientes de la EH y que no cumpliesen ninguno de los criterios de exclusión.

Adicionalmente se ha recomendado no cambiar los patrones de dieta antes de la recopilación de las muestras. Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Ético del Hospital Universitario Central de Asturias.

Obtención de las muestras de sangre

Las muestras de sangre de los sujetos control y pacientes de la EH han sido obtenidas, en un estado de ayunas de 8 h previo a la extracción, por personal técnico experimentado, usando técnicas y materiales estandarizados. La sangre se ha recogido en tubos con EDTA y sistema de vacío (Becton Dickinson) e inmediatamente centrifugados a 900 g durante 15 min a 4°C. Las muestras de plasma se han almacenado a -80°C hasta su posterior análisis.

Aislamiento del RNA y qRT-PCR

El RNA total circulante se ha aislado de 200 µl plasma usando el kit *miRCURY RNA* (Exiqon), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El kit RNA *spike-in* (Exiqon) se ha utilizado en todas las extracciones. La presencia de RNA en las muestras de la extracción se ha verificado mediante espectrofotometría en el equipo *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific). El cDNA se ha sintetizado usando el kit *cDNA Synthesis II* (Exiqon). La reacción RT-PCR se ha llevado a cabo en el equipo *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad). Las fases de la RT-PCR han sido: 60' a 42°C, 5' a 95°C y enfriamiento a 4°C para su almacenamiento. Para la cuantificación de los miRNAs se ha utilizado la técnica qRT-PCR, usando el kit *ExiLENT SYBR Green Master Mix* (Exiqon) en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Los ciclos utilizados para la reacción qRT-PCR han sido: 10' a 95°C, 40x (10" a 95°C), 40x (1' a 60°C), 15" a 95°C, 15" a 60°C y 15" a 95°C. Para descartar la presencia de nucleasas, inhibidores o hemólisis, el panel *miRCURY miRNA Quality Control PCR* (Exiqon) se ha usado previamente al análisis de los miRNAs. Los miRNAs de los 11 sujetos del estudio (6 afectados por la EH y 5 controles sanos) se han cuantificado usando paneles de análisis de expresión *Human miRNome Version 3* (Exiqon) que contienen *primers* para 752 miRNAs maduros.

El análisis de la expresión relativa inicial de los miRNAs se ha ejecutado con el software GenEx (MultiD Analyses AB). Los miRNAs que han presentado señal de amplificación en <19% del conjunto de los sujetos han sido descartados. La normalización de la señal de cada grupo del estudio (control y EH) se ha realizado en base a la señal media de expresión de cada grupo. La cuantificación relativa se ha obtenido en base al grupo control. Los datos se han convertido a escala logarítmica

(log₂). La tasa de cambio diferencial para cada miRNA entre los grupos del estudio ha sido obtenida de la diferencia de valores entre el grupo control y pacientes de EH.

Análisis de las rutas y predicción de las dianas de los miRNAs

Las dianas génicas validadas de los miRNAs se han obtenido de la base de datos miRWalk 2.0 (Dweep et al., 2011, 2014) y miRTarBase 4.5 (Hsu et al., 2014), en combinación con el análisis de las rutas de KEGG *Pathways* (*Adipocytokine signaling pathway*, *Huntington disease pathway*, *Neurotrophin signaling*, *AMPK signaling*) y BioCarta (*IGF1R pathway*, *AKT pathway*, *mTOR pathway*). Se ha establecido un sistema de selección de dianas validadas, en el cual sólo se han tenido en cuenta aquellas dianas validadas directamente por ensayos *reporter* de fragmentos 3'-UTR; excluyendo otros métodos indirectos que no implicasen este criterio.

Análisis estadístico

Para la comparación de la expresión de los miRNAs detectados (n=422) entre los sujetos control y los pacientes de EH, se ha utilizado el test T para muestras desapareadas de Student con la corrección de Bonferroni. Tras establecer un valor de significación individual de $P < 0,05$, este algoritmo arrojó un valor de significación corregida de $P < 0,000118$. El análisis estadístico se ha ejecutado con el software GenEx Pro versión 5.4.3.710 (MultiD Analyses AB).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

99 miRNAs circulantes plasmáticos se encuentran alterados en la fase sintomática de la EH

Con el objetivo de determinar un perfil diferencial de miRNAs plasmáticos en fase sintomática de la EH, hemos obtenido muestras de sangre de pacientes de la EH (n=6) y sujetos control de edad semejante (n=5) (ver tabla suplementaria S1). La cuantificación relativa de los miRNAs circulantes en plasma se ha realizado mediante qRT-PCR. Del total de 752 miRNAs analizados, hemos detectado 422 miRNAs en las muestras de plasma. Los resultados obtenidos muestran que 99 miRNAs plasmáticos se hallan significativamente alterados en los pacientes de la EH respecto a los sujetos control (ver tabla 1). De estos, más del 90% de los miRNAs alterados se encuentran sobreexpresados en plasma en los enfermos de la EH, encontrando 96 miRNAs aumentados y únicamente 3 subexpresados (miR-214-3p, miR-520h y miR-632).

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de trastornos caracterizados por la muerte neuronal, cuyos mecanismos patogénicos son complejos. Estas enfermedades suelen presentar aspectos comunes como agregación proteica, neuroinflamación y desregulación mitocondrial (Goodall et al., 2013). Dada la similitud en varios mecanismos patogénicos en las enfermedades neurodegenerativas, hemos buscado una correlación entre el perfil de miRNAs plasmáticos en la EH y el observado en otras enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica. Destacan los trabajos en la enfermedad de Alzheimer, donde se presentan desregulaciones de los miRNAs plasmáticos let-7d-5p, let-7g-5p, miR-191-5p, miR-301a-3p (Kumar et al., 2013) y miR-23a-3p (Galimberti et al., 2014), también hallados en nuestro estudio. Igualmente, la alteración del miR-23a-3p se ha descrito en esclerosis lateral amiotrófica, junto al miR-223-3p (Fenoglio et al., 2013). Si bien la tendencia de la expresión plasmática de los miRNAs en estos estudios es inversa a la obtenida por nosotros en la EH, ya que en las otras patologías los miRNAs alterados están regulados a la baja. Este fenómeno puede deberse a la interacción aberrante de la m-HTT con los reguladores transcripcionales y coactivadores (Sp1, CREB, p53, PGC-1 α , REST), lo que implica una pérdida de la regulación transcripcional normal en los genes controlados por estos mecanismos en la EH (Jin y Johnson, 2010; Moumné et al., 2013). Esta

Tabla 1. miRNAs plasmáticos alterados en la fase sintomática de la EH

miRNA	Tasa de cambio diferencial (\log_2)	P-valor	miRNA	Tasa de cambio diferencial (\log_2)	P-valor
hsa-let-7d-3p	-2,99394	5,75E-06	hsa-miR-28-5p	-2,29371	0,00010962
hsa-let-7d-5p	-2,76053	1,53E-05	hsa-miR-301a-3p	-3,09497	8,13E-06
hsa-let-7g-3p	-2,66020	3,34E-05	hsa-miR-301b	-2,48766	4,31E-07
hsa-let-7g-5p	-2,36572	1,68E-05	hsa-miR-30b-5p	-2,64094	2,37E-05
hsa-let-7i-5p	-2,16070	2,44E-05	hsa-miR-30d-3p	-2,69211	4,14E-05
hsa-miR-106a-5p	-1,88490	6,10E-05	hsa-miR-30d-5p	-3,18109	6,37E-05
hsa-miR-125a-5p	-2,35062	1,27E-05	hsa-miR-30e-3p	-3,90179	0,00010246
hsa-miR-126-3p	-2,80504	7,80E-08	hsa-miR-323a-3p	-2,95369	1,21E-07
hsa-miR-126-5p	-3,27515	1,46E-06	hsa-miR-326	-3,62437	8,16E-05
hsa-miR-128	-2,78058	2,70E-07	hsa-miR-335-5p	-3,85671	4,50E-06
hsa-miR-130a-3p	-3,17158	3,80E-05	hsa-miR-337-5p	-4,90651	9,63E-06
hsa-miR-130b-3p	-3,34049	1,45E-05	hsa-miR-338-3p	-3,40013	3,80E-08
hsa-miR-130b-5p	-2,20079	7,55E-06	hsa-miR-361-5p	-2,69660	5,45E-07
hsa-miR-132-3p	-1,63754	7,93E-05	hsa-miR-374b-5p	-3,27885	2,31E-07
hsa-miR-134	-3,64536	4,40E-05	hsa-miR-376a-3p	-3,60695	3,09E-06
hsa-miR-140-5p	-2,05081	5,11E-05	hsa-miR-376b-3p	-4,53738	1,31E-07
hsa-miR-142-5p	-3,93753	1,39E-07	hsa-miR-381-3p	-4,99964	1,37E-06
hsa-miR-145-5p	-2,82769	9,55E-05	hsa-miR-382-5p	-2,98573	8,33E-06
hsa-miR-146a-5p	-3,32874	2,08E-05	hsa-miR-409-3p	-2,73866	4,93E-05
hsa-miR-146b-5p	-2,55397	3,45E-05	hsa-miR-421	-2,03012	9,45E-05
hsa-miR-148b-3p	-3,32341	2,86E-07	hsa-miR-423-3p	-3,17617	4,14E-06
hsa-miR-151a-3p	-3,52479	1,12E-05	hsa-miR-425-5p	-1,55323	2,78E-05
hsa-miR-151a-5p	-2,67450	3,85E-06	hsa-miR-431-5p	-3,95597	2,14E-05
hsa-miR-152	-2,87921	0,00010489	hsa-miR-432-5p	-3,31366	1,27E-05
hsa-miR-154-5p	-3,64938	8,07E-05	hsa-miR-433	-4,70787	7,73E-05
hsa-miR-181b-5p	-2,54846	2,06E-05	hsa-miR-487a	-3,44444	1,69E-05
hsa-miR-181d	-2,67480	3,77E-06	hsa-miR-487b	-2,88621	7,41E-07
hsa-miR-187-3p	-2,43469	0,00010252	hsa-miR-495-3p	-2,99547	5,61E-06
hsa-miR-18a-5p	-2,53984	4,13E-06	hsa-miR-503-5p	-2,23385	3,92E-05
hsa-miR-18b-5p	-2,22176	2,98E-05	hsa-miR-505-3p	-1,84262	8,88E-05
hsa-miR-1908	-2,83136	4,16E-05	hsa-miR-520h	3,24977	2,77E-05
hsa-miR-191-5p	-2,99479	9,12E-07	hsa-miR-548c-5p	-2,55288	5,10E-06
hsa-miR-195-5p	-3,42976	6,66E-05	hsa-miR-556-3p	-3,86304	1,35E-06
hsa-miR-199a-3p	-4,49217	6,89E-06	hsa-miR-574-3p	-1,52231	9,41E-05
hsa-miR-199a-5p	-3,62575	1,51E-05	hsa-miR-584-5p	-3,28745	2,40E-05
hsa-miR-19b-3p	-1,41083	3,37E-05	hsa-miR-590-5p	-3,13820	6,20E-05
hsa-miR-21-5p	-2,88196	5,48E-06	hsa-miR-628-3p	-2,66198	8,51E-05
hsa-miR-214-3p	2,96441	7,40E-05	hsa-miR-628-5p	-3,02142	2,82E-05
hsa-miR-22-5p	-3,30358	2,34E-06	hsa-miR-632	4,60705	1,99E-06
hsa-miR-221-3p	-3,30052	3,07E-07	hsa-miR-652-3p	-2,68588	3,22E-07
hsa-miR-222-3p	-1,91264	2,64E-05	hsa-miR-654-5p	-4,21188	3,05E-06
hsa-miR-223-3p	-3,38838	1,00E-08	hsa-miR-671-5p	-2,64986	0,00011607
hsa-miR-223-5p	-3,23180	9,98E-05	hsa-miR-744-5p	-4,27470	5,66E-06
hsa-miR-23a-3p	-3,32420	5,54E-06	hsa-miR-877-5p	-2,99666	6,49E-05
hsa-miR-23b-3p	-2,80997	1,53E-07	hsa-miR-889	-2,47403	8,19E-05
hsa-miR-24-3p	-3,15492	1,12E-07	hsa-miR-941	-3,30858	1,61E-05
hsa-miR-26a-5p	-2,86358	1,78E-06	hsa-miR-98-5p	-3,85715	6,06E-06
hsa-miR-27a-3p	-5,53711	0,00010617	hsa-miR-99b-3p	-3,57155	5,67E-05
hsa-miR-27b-3p	-3,48393	6,37E-06	hsa-miR-99b-5p	-2,65325	6,27E-05
hsa-miR-28-3p	-2,81130	5,45E-05			

La tasa de cambio diferencial entre los grupos se ha obtenido de la diferencia de valores entre el grupo control y pacientes de la EH, expresada en escala logarítmica (\log_2). Valores negativos de la tasa de cambio diferencial representan un aumento de los miRNAs plasmáticos en la EH. Valores positivos de la tasa de cambio diferencial representan descenso de los miRNAs plasmáticos en la EH. P -valor<0,000118

condición puede dar lugar a una expresión génica diferencial observada en modelos animales y enfermos de la EH (Luthi-Carter, 2000, 2002; Seredenina y Luthi-Carter, 2012), pudiendo aumentar los niveles de miRNAs al verse modificada la relación entre miRNA y transcrito diana.

La utilización de modelos experimentales de la EH ha permitido evaluar la interacción de la m-HTT en la biogénesis y expresión de los miRNAs (Lee et al., 2011). El único estudio que ha buscado la presencia de miRNAs circulantes plasmáticos en la EH ha partido del estudio de modelos celulares de la enfermedad (Gaughwin et al., 2011). En este trabajo Gaughwin y colaboradores hallan una elevación significativa del miR-34b y miR-1285 en un modelo celular transfectado con el exón 1 de la m-HTT (73Q-HTT y 145Q-HTT). Tras ampliar su estudio a pacientes en diferentes fases de la enfermedad, encuentran que solo el miR-34b se presenta elevado en el plasma de pacientes asintomáticos. A pesar de la novedad del estudio, el diseño experimental presenta ciertas limitaciones. La búsqueda de miRNAs se efectúa en cultivos de una única línea celular transfectada exclusivamente con el exón 1 de la m-HTT con la intención de ser extrapolable al plasma de pacientes, sin tener en cuenta el carácter sistémico y complejo de la EH, limitando a dos miRNAs el potencial del estudio en humanos. Este hecho se ve reflejado en el perfil diferencial del modelo *in vitro*, donde se pueden observar cambios en varios de los miRNAs que nosotros sí obtenemos desregulados en las muestras de plasma en la EH (ver figura suplementaria S2). Nuestro trabajo, a diferencia del de Gaughwin y colaboradores, parte directamente de muestras plasmáticas de pacientes, lo que nos permite determinar gran número de miRNAs alterados y, por tanto, aumentar la proyección del estudio a la hora de encontrar diferencias entre los enfermos y los sujetos sanos.

Los miRNAs en circulación sanguínea podrían tener su origen en las estructuras celulares dañadas en condiciones patológicas (Dumortier et al., 2013). Dada la especificidad tisular y celular de los miRNAs, los cambios en los miRNAs circulantes reflejan las alteraciones en los tejidos o células dañadas durante el proceso de una enfermedad (Jin et al., 2013). La atrofia del estriado y corteza cerebral es un proceso muy importante en la patogénesis de la EH, pudiendo ser observada en individuos asintomáticos y sintomáticos (Ross et al., 2014; Zuccato et al., 2010). Varios estudios se

han centrado en el análisis de la expresión de los miRNAs en tejido neuronal en la EH. Martí y colaboradores (Martí et al., 2010) analizan la expresión de miRNAs en tejido post mórtem de corteza frontal y estriado de 6 pacientes en un rango de repeticiones CAG similar al nuestro, obteniendo que mayoritariamente los miRNAs se presentan elevados (59%), lo que sugiere que la sobreexpresión de los miRNAs es un rasgo característico de la EH. Al comparar nuestros resultados con los obtenidos por estos autores, observamos que cuatro miRNAs (miR-148b-3p, miR-151a-3p, miR-19b-3p, miR-27b-3p) elevados en corteza cerebral y estriado, también se presentan con la misma tendencia en plasma en nuestro estudio. Sin embargo, la expresión de los miRNAs: miR-128, miR-181d, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-382-5p, miR-432-5p y miR-433, se encuentra disminuida en los tejidos post mórtem, difiriendo de nuestros resultados en plasma. Otros estudios han analizado la expresión de miRNAs en corteza motora de pacientes de la EH, basándose en la selección de miRNAs con dianas potenciales en genes implicados en la patología de la EH, como REST (Johnson et al., 2008, Packer et al., 2008). REST es un regulador transcripcional importante en la patogénesis de la EH, ya que reprime genes fundamentales para el desarrollo neuronal, como BDNF (Soldati et al., 2013; Zuccato et al., 2010). En su estudio, Johnson y colaboradores muestran una reducción significativa del miR-132 en el área 4 de Brodmann (corteza motora) en pacientes afectados por la EH, en contraposición a los resultados obtenidos por Packer y colaboradores (2008) en la misma área de la corteza motora y a los obtenidos por nosotros en plasma. Recientemente, un trabajo de Hoss y colaboradores (2015) ha identificado varios miRNAs sobreexpresados en corteza prefrontal en una larga cohorte de pacientes de la EH, correlacionando su expresión con el grado de neurodegeneración y progresión de la EH. De estos miRNAs alterados en el área 9 de Brodmann, solo el miR-196a-5p y miR-106-5p se presentan elevados en nuestro estudio en plasma. Sin embargo, 6 miRNAs aumentados en tejido post mórtem, que no han mostrado relación con la neurodegeneración y progresión, sí se encuentran elevados en plasma: miR-106a-5p, miR-126-5p, miR-142-5p, miR-199a-5p, miR-223-3p y miR-28-5p. A pesar de ello, numerosos miRNAs que han sido descritos en estos estudios alterados en tejido cerebral en la EH no se presentan modificados en nuestro estudio en plasma (ver tabla suplementaria S2).

Las alteraciones del metabolismo energético tienen gran importancia en la patología de la EH (McGill y Beal, 2006; Phan et al., 2009). Comúnmente, la EH se manifiesta con cambios en la composición de la masa corporal de los pacientes y en el patrón de ingesta de alimentos (Aziz et al., 2010; Hult et al., 2011). Las alteraciones en el metabolismo de la glucosa se traducen en un aumento de la resistencia a la insulina, predisponiendo a los pacientes de la EH a desarrollar diabetes mellitus (Lalić et al., 2008; Phan et al., 2009). Por ello, nos preguntamos si el perfil de miRNAs obtenidos en plasma de pacientes con obesidad y diabetes de tipo 2 presenta analogía con nuestros resultados obtenidos en la EH. Al igual que nuestro estudio, la elevación de los miRNAs miR-140-5p y miR-222-3p ha sido descrita en pacientes con obesidad mórbida (Ortega et al., 2013) y diabetes mellitus de tipo 2 (Ortega et al., 2014). El aumento plasmático del miR-140-5p está asociado a la resistencia a la insulina, mientras que la elevación plasmática del miR-222-3p es inducible en situaciones de alta concentración periférica de insulina (Ortega et al., 2014). La elevación del miR-221-3p, presente en pacientes de obesidad mórbida sometidos a intervención quirúrgica para la pérdida de peso, sugiere una relación entre los niveles circulantes del miR-221-3p y la masa corporal (Ortega et al., 2013). Asimismo, la elevación plasmática del miR-326 se ha encontrado inversamente correlacionada con los niveles de adiponectina en pacientes diabéticos (Santovito et al., 2014), sugiriendo un mecanismo regulatorio entre las dos moléculas.

El hecho de que el patrón de miRNAs circulantes plasmáticos y el citoplasmático obtenido en tejido cerebral sea distinto, podría deberse a que la EH presenta un importante componente periférico en la patogénesis, reflejado en el perfil de miRNAs circulantes. A pesar de ello, es probable que los miRNAs plasmáticos sean secretados activamente por los diferentes tejidos, por lo que la determinación de este sistema de secreción sería necesaria para comprender el origen de los miRNAs circulantes en la enfermedad. Aun así, las semejanzas observadas entre el perfil plasmático de miRNAs en la EH y los correspondientes a patologías como diabetes y obesidad, apoya la idea de que durante el curso de la EH se producen alteraciones metabólicas potencialmente detectables a través de los miRNA circulantes. Por ello, la acción de la m-HTT en tejido periférico parece contribuir a la modificación de los niveles de miRNAs plasmáticos. Por tanto, es posible que el perfil de miRNAs observado en el plasma sea la suma de las aportaciones de los diferentes tejidos afectados durante la enfermedad. Sin

embargo, para afirmar esta hipótesis sería necesario ampliar el estudio haciendo un perfil de miRNAs en distintos tejidos y fases de la enfermedad en un mayor número de pacientes.

La expresión de los miRNAs intrónicos en la EH puede estar alterada por su entorno génico

Dependiendo de la localización genómica, la transcripción de los miRNAs puede estar sometida a control por parte de promotores propios o de los genes en los que se incluyen (Dumortier et al., 2013). Normalmente, los miRNAs intrónicos comparten promotor con su gen portador, aunque algunas veces pueden presentar promotores distintos a los de los genes en los que se localizan (Ha y Kim, 2014). Independientemente de las dianas de los miRNAs, se ha examinado el entorno génico de los miRNAs plasmáticos alterados ante la posibilidad de que los miRNAs intrónicos se encuentren codificados en genes cuya expresión pueda estar modificada en la EH y, por tanto, pueda influir en el nivel de expresión de los mismos (ver tabla suplementaria S3). Cinco miRNAs intrónicos, miR-128-2, miR-26a-5p, miR-301a-3p, miR-584-5p y miR-941, se presentan en genes codificantes que son susceptibles de estar alterados en la enfermedad, bien por estar sometidos a control transcripcional por reguladores afectados en la EH, o bien por estar contenidos en proteínas con funciones importantes en las rutas patogénicas. Por ello, la sobreexpresión de estos miRNAs intrónicos puede estar condicionada por la expresión genes que los albergan.

El miRNA intrónico miR-128 regula el comportamiento motor modulando las redes de señalización y excitabilidad neuronal. El miR-128-2 codificado en el gen *ARPP21* (*21-kD cAMP-regulated phosphoprotein*), contribuye mayoritariamente a la expresión de este miRNA en el cerebro (Tan et al., 2013). *ARPP21*, codifica la proteína RCS (*regulator of calmodulin signaling*), importante en la integración de señales de los neurotransmisores en las neuronas espinosas medianas del estriado (Rakhilin et al., 2004). La fosforilación del RCS, a través de las señales de proteínas receptoras G dependientes de la activación de PKA (*protein kinase A*), produce una inhibición competitiva de las enzimas dependientes de calmodulina, suprimiendo el flujo de Ca^{2+} en las neuronas del estriado (Rakhilin et al., 2004). La disfunción en la señalización de Ca^{2+} es uno de los mecanismos patogénicos asociados a la acción aberrante de la m-HTT en las neuronas

del estriado, donde la acumulación de Ca^{2+} conduce a la apoptosis neuronal (Zuccato et al., 2010). La expresión de *ARPP21* se ha encontrado disminuida en la EH, asociada a cambios en la señalización de las proteínas receptoras G (Seredenina y Luthi-Carter, 2012) y a una supresión de *BDNF* en modelos animales (Ivkovic y Ehrlich, 1999). Debido a la importancia de esta ruta en la regulación del Ca^{2+} en el estriado y dada la modificación en la expresión de *ARPP21* en la EH, cabría esperar un descenso de los niveles de expresión del miR-128. Por lo que el estudio de la regulación génica del miR-128 se hace necesario para comprender el mecanismo subyacente a la elevación plasmática del miRNA en la fase sintomática de la EH.

El miR-26a está codificado en las fosfatasas *CTDSPL* (*CTD small phosphatase-like*) y *CTDSP2* (*CTD small phosphatase-2*). La expresión de estas fosfatasas es exclusiva de los tejidos no neuronales, siendo reclutadas por el complejo REST/NRSF (*repressor element 1 (RE-1)-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor*) para el silenciamiento de genes neuronales (Yeo et al., 2005). El represor transcripcional REST se encuentra asociado a la HTT en el citoplasma. En la EH, esta asociación está interrumpida, incrementando la actividad del complejo (Soldati et al., 2013). La interacción de la m-HTT con el complejo REST/NRSF ha sido descrita como una de los principales mecanismos patogénicos neuronales en la EH. En la enfermedad, la acción del complejo en los tejidos no neuronales puede aumentar la restricción génica de manera aberrante (Zuccato et al., 2010). Por lo que el aumento de la expresión del miR-26a podría ser reflejo del incremento de las CTDSPLs en los tejidos no neuronales, ante la mayor actividad del complejo REST/NRSF en la EH.

El miR-301a aumenta indirectamente la expresión del gen en el que está codificado, *SKA2* (*spindle and kinetochore associated complex subunit 2*). Este miRNA interactúa con el extremo 3'UTR de *MEOX2* (*mesenchyme homeobox 2*) inhibiendo su expresión. La inhibición de *MEOX2* permite la expresión y activación de ERK1/ERK2 (*extracellular regulated kinases*) y, seguidamente, la fosforilación de CREB, que se une al promotor *SKA2* regulando su expresión (Cao et al., 2010). La regulación transcripcional a través de CREB se encuentra alterada en la EH (McGill y Beal, 2006; Seredenina y Luthi-Carter, 2012; Zuccato et al., 2010). El dominio poli-Q expandido de la m-HTT interfiere en su forma soluble y agregada con CREB y sus cofactores, impidiendo su

normal funcionamiento (Moumné et al., 2013; Seredenina y Luthi-Carter, 2012). Del mismo modo, el gen SH3TC2 (*SH3 domain tetratricopeptide repeat domain 2*), en el que está incluido el miR-584, presenta un *enhancer* regulado por CREB a 150 kb del inicio de transcripción. Curiosamente, un polimorfismo en este elemento regulador se ha asociado a la severidad de la neuropatía de *Charcot-Marie-Tooth* al reducir la actividad transcripcional de SH3TC2 (Brewer et al., 2014). Por ello, la investigación de los mecanismos regulatorios de estos dos miRNAs es imprescindible para entender como las interacciones entre la m-HTT, CREB y sus cofactores pueden inducir una expresión plasmática aberrante del miR-301a y miR-584 obtenida en la EH, ya que normalmente en la patología estos mecanismos se encuentran asociados a una disminución de la transcripción de los genes que regulan.

El miR-941 se encuentra integrado en el gen *DNAJC5*, codificante de la proteína CSP (*cysteine string protein*), expresada en las vesículas secretoras y sinápticas (Cadieux-Dion et al., 2013). La CSP promueve la inhibición de las proteínas G y canales de Ca^{2+} , reprimiendo la liberación de neurotransmisores en el mantenimiento de las sinapsis (Miller et al., 2003). En modelos *in vitro* de la EH, Miller y colaboradores (2003) encuentran que la expansión del dominio poli-Q en la m-HTT produce un secuestro de la CSP, bloqueando la inhibición de canales de Ca^{2+} . Por tanto, de manera similar a lo que sucede con el miR-128, la sobreexpresión del miR-941 puede deberse a las alteraciones en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} observada en la EH, al secuestrar la m-HTT el producto proteico del gen *DNAJC5* e interferir directamente en la ruta de señalización.

Como el entorno génico de estos miRNAs intrónicos parece encontrarse modificado a distintos niveles por los efectos de la m-HTT, los miRNAs miR-128-2, miR-26a-5p, miR-301a-3p, miR-584-5p y miR-941 son candidatos a una validación funcional en posteriores estudios. Además, se hace necesario investigar la implicación en los mecanismos patogénicos de las proteínas en las que se encuentran codificados, con el objetivo ampliar el conocimiento de sus mecanismos reguladores e identificar qué papel presentan en la EH.

Los miRNAs plasmáticos presentan múltiples dianas validadas en la rutas afectadas por EH

En la EH, la desregulación del transcriptoma incluye una larga lista de genes asociados a la señalización de neurotrofinas, regulación metabólica, señalización intracelular, homeostasis energética y regulación transcripcional (Bates et al., 2015; Seredenina y Luthi-Carter, 2012; Zuccato et al., 2010). Desde el punto de vista funcional, la validación de la alteración de los miRNAs en las enfermedades neurodegenerativas depende del conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad, permitiendo determinar que genes o vías se ven afectados por la acción de los miRNAs en la patología (Esteller, 2011). Para acotar los numerosos miRNAs plasmáticos alterados que hemos encontrado en los pacientes de nuestro estudio y con el objetivo de establecer una relación directa con las principales rutas desreguladas en la enfermedad, hemos seleccionado los miRNAs que poseen dianas validadas sobre los genes de dichas rutas. Tras el análisis bioinformático, encontramos que 30 genes de las distintas rutas biológicas analizadas son dianas validadas de 33 miRNAs alterados en el estudio (ver tabla 2).

Tabla 2. Genes diana de los miRNAs alterados en plasma en la EH para las rutas biológicas analizadas

Gen	miRNA	Gen	miRNA
<i>BBC3</i>	miR-221-3p, -222-3p	<i>MDM2</i>	miR-18b-5p, -145-5p, -221-3p,
<i>BCL2</i>	miR-181d, -181b-5p, -195-5p, 21-5p	<i>MTOR</i>	miR-99b-5p
<i>BCL2L1</i>	let-7g-5p	<i>PIK3</i>	miR-126-3p, -221-3p, -376a-3p
<i>BDNF</i>	miR-195-5p	<i>PRKAA</i>	miR-19b-3p
<i>CHUK</i>	miR-195-5p, -223-3p, -23b-3p	<i>PPARG</i>	miR-130a-3p, -130b-3p, -27b-3p
<i>CREB</i>	miR-134, -214-3p	<i>PPARGC1a</i>	miR-23a-3p
<i>FOXO3</i>	miR-221-3p, -222-3p, -23a-3p	<i>PTEN</i>	miR-19b-3p, -21-5p, -214-3p, -221-3p, -222-3p, -23a-3p, -26a-5p
<i>G6PC</i>	miR-23a-3p	<i>RAF1</i>	miR-195-5p
<i>HDAC2</i>	miR-145-5p	<i>RASA1</i>	miR-21-5p, -335-5p
<i>IGF1</i>	miR-27a-3p	<i>SIRT1</i>	miR-128, -132-3p, -140-5p, -181b-5p, -195-5p, -199a-5p
<i>IGF1R</i>	miR-152, -181b-5p, -223-3p, -335-5p, -376a-3p	<i>SOCS3</i>	miR-19b-3p
<i>IKBKB</i>	miR-199a-5p	<i>SOD2</i>	miR-222-3p
<i>IRS1</i>	miR-126-3p, -145-5p, -152	<i>SP1</i>	miR-21-5p, -335-5p
<i>MAPK1</i>	miR-28-5p, -335-5p	<i>TBP</i>	miR-146a-5p
<i>MCL1</i>	miR-181b-5p	<i>TP53</i>	miR-125a-5p, -214-3p, -30d-5p

Las dianas génicas validadas se han obtenido de las bases de datos miRWalk 2.0 y miRTarBase 4.5

Ruta de AKT. En la progresión de la EH se produce una reducción de la señalización de la vía AKT que estimula la apoptosis celular y la disfunción mitocondrial (Bowles y Jones, 2014; Ribeiro et al., 2014). Además, la hipofosforilación de la m-HTT por AKT provoca una mayor proteólisis, acumulación de agregados y deficiencia en el transporte de neurotrofinas (Zuccato et al, 2010). Como los miRNAs pueden contribuir

a la regulación génica de esta ruta, hemos analizado los miRNAs alterados en el plasma de pacientes en busca de posibles candidatos que puedan interferir en la señalización de la vía. Ninguno de los 99 miRNA analizados presenta como diana *AKT*. Sin embargo, numerosos miRNAs sobreexpresados en plasma de los pacientes tienen como dianas a los factores de crecimiento *BDNF* (miR-195-5p), *IGF1* (miR-27a-3p); el receptor *IGF1R* (miR-152, miR-181b-5p, miR-223-3p, miR-335-5p, miR-376a-3p) y los transductores *RASA1* (miR-21-5p, miR-335-5p), *IRS1* (miR-126-3p, miR-145-5p, miR-152), *PIK3* (miR-126-3p, miR-221-3p, miR-376a-3p), *RAF1* (miR-195-5p) y *MAPK1* (miR-28-5p, miR-335-5p). Así como, los genes antiapoptóticos activados por la señalización de la vía, incluyendo *BCL2* (miR-181d, miR-181b-5p, miR-195-5p, miR-21-5p), *BCL2L1* (let-7g-5p) y *MCL1* (miR-181b-5p). Además observamos que gran número de los miRNAs del estudio tienen como diana el regulador negativo de la vía *PTEN* (miR-19b-3p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-26a-5p). Por ello, la elevación de estos miRNAs, que mayoritariamente hacen diana en los genes que incrementan la señalización de la ruta, podría resultar en un incremento de la inhibición de la vía, amplificando los efectos pro-apoptóticos de la m-HTT en la enfermedad. Por lo que sería necesario evaluar la captación de estos miRNAs circulantes por los distintos tejidos y de qué manera contribuyen a los efectos pro-apoptóticos en esta ruta desregulada en la EH.

Ruta de mTOR. En la EH, el secuestro de mTOR en los agregados tiene un papel protector al inducir autofagia y reducir los niveles de agregados (Zuccato et al., 2010). Sin embargo, esta inhibición de mTOR, junto con el secuestro de los coactivadores de la ruta PPAR- γ y PGC-1 α por la m-HTT, induce fallos en la adipogénesis, la respuesta al estrés oxidativo y el metabolismo mitocondrial y lipídico (Jin et al., 2012; Laplante y Sabatini, 2012). Por ello, la acción de los miRNAs plasmáticos elevados en los pacientes pueden contribuir a la desregulación del metabolismo periférico observada en la EH. Los efectos de la m-HTT y el hallazgo de la elevación plasmática del miR-99b-5p, diana de *MTOR*, junto con la elevación plasmática de los miRNAs miR-130a-3p, miR-130b-3p y miR-27b-3p, dianas de *PPARG*, y miR-23a-3p, diana de *PPARGC1A*, sugiere que la hipofunción de esta ruta contribuye a la patogénesis metabólica en la EH. Asumiendo la función endocrina de los miRNAs circulantes sugerida por varios estudios (Dumortier et al., 2013; Mendell y Olson, 2012), en general, podemos decir que estos

miRNAs interferentes en la ruta de mTOR pueden contribuir a la disregulación metabólica sistémica observada en la EH, ya que podrían exacerbar los defectos metabólicos al disminuir la retroalimentación entre las vías afectadas de AKT y mTOR. La experimentación en modelos de la enfermedad permitiría averiguar si la sobreexpresión de estos miRNAs contribuyen a los defectos metabólicos en tejido cerebral y periférico o son simplemente artefactos en nuestro estudio.

Vía IKK/ NFκB. La HTT está sujeta a modificaciones post-traduccionales por el complejo IKK (*IκB kinase*), promoviendo la degradación de la proteína en el proteosoma. La expansión del dominio poli-Q en la EH conduce a un menor nivel de degradación de la m-HTT, al interactuar defectuosamente con IKK, acumulándose en agregados citotóxicos (Thompson et al., 2009). Generalmente, la activación de NFκB (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) tiene efectos pro-supervivencia en las células. Sin embargo, la activación crónica de la vía IKK/NFκB, induce una respuesta inflamatoria elevada que al ser mantenida en el tiempo tiene efectos neurotóxicos en la EH (Bowles y Jones, 2014). En nuestro estudio observamos la elevación plasmática de diversos miRNAs diana sobre el complejo *IKK*. Concretamente los miRNAs miR-195-5p, miR-223-3p, miR-23b-3p (*CHUK*) y miR-199a-5p (*IKBK*), pudiendo contribuir al descenso de la señalización de la ruta IKK/NFκB en la EH y, por tanto, presentando un papel antiinflamatorio.

TP53. La unión de la m-HTT a p53 produce un aumento de la expresión de p53, incrementando su actividad transcripcional, lo que produce la sobreexpresión de los genes pro-apoptóticos *BAX* (*BCL2-associated X protein*) y *BBC3* (*BCL2 binding component 3*) (Bowles y Jones, 2014; Zuccato et al., 2010). Hasta la fecha, un único trabajo valora la alteración de los miRNAs y la sobreexpresión de p53 en modelos celulares y animales de la EH (Ghose et al., 2011). Al igual que Ghose y colaboradores, hallamos modificaciones en los niveles del miR-146a-5p, aunque con distinta tendencia. Si bien no hemos encontrado alterados los niveles plasmáticos de los miRNAs miR-125b y miR-150 que tienen como diana génica *TP53*, sí observamos un descenso del miR-214-3p, que tiene como diana a este supresor tumoral. A pesar de ello otros miRNAs dianas de *TP53*, *MDM2* y el gen pro-apoptótico *BBC3* se encuentran elevados (ver tabla 2). Las diferencias entre ambos estudios son obvias, pero dado que

nuestro estudio se centra en el entorno plasmático de pacientes y no en un entorno intracelular, no podemos argumentar que las diferencias observadas sean excluyentes entre sí.

Ruta de las adipocitocinas. En la EH, la respuesta a las adipocitocinas orexigénicas y anorexigénicas mediante la señalización de AMPK (5' *AMP-activated protein kinase*) se puede ver interrumpida por la interferencia directa de la m-HTT con SIRT (*sirtuin*), PGC-1 α y CREB, e indirectamente con FOXO3 (*forkhead box O3*) (Aziz et al., 2010; Kannike et al., 2014; Mounmé et al., 2013; Zhang et al., 2009). En la EH, la actividad de la AMPK en el músculo esquelético es baja, induciendo un fallo en la regulación metabólica, mientras que en el cerebro la actividad de la AMPK es alta, potenciando las señales pro-apoptóticas (Ju et al., 2012). Debido a la importancia de la vía de AMPK en la coordinación del estado metabólico en tejido cerebral y músculo esquelético, dos de los tejidos más afectados en la EH, es necesario determinar qué papel presentan los miRNAs circulantes en la interferencia de la señalización en esta ruta. En nuestro estudio no hemos encontrado ningún miRNA que tenga a la leptina (*LEP*) o a su receptor (*LEPR*) como dianas. Sin embargo sí obtenemos miRNAs con dianas sobre AMPK o *PRKAA* (miR-19b-3p), *FOXO3* (miR-221-3p, miR-222-3p, miR-23a-3p), *SIRT1* (miR-128, miR-132-3p, miR-140-5p, miR-181b-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p), *SOCS3* (miR-19b-3p) y *SOD2* (miR-222-3p). Las consecuencias funcionales de la elevación plasmática de estos miRNAs, que mayoritariamente regulan negativamente esta vía, son desconocidas; pero a nivel celular supondría la reducción de los efectos pro-apoptóticos producidos por la activación de la AMPK en tejido cerebral, pudiendo ser perjudicial para la regulación de la función metabólica en tejido periférico.

Reguladores transcripcionales. La m-HTT puede interactuar directamente y secuestrar en los agregados los factores de transcripción, coactivadores y represores transcripcionales, tales como CREB, REST, PGC-1 α , p53, TAF4, Sp1 (*Specificity protein-1*), CBP (*CREB-binding protein*), TBP (*TATA box binding protein*) alterando su normal funcionamiento (Mounmé et al., 2013; Seredenina et al., 2012; Zuccato et al., 2010). El análisis de la dianas validadas muestra que varios miRNAs aumentados en plasma de pacientes de la EH tienen como dianas *CREB* (miR-134), *SP1* (miR-21-5p y miR-335) y *TBP* (miR-146a-5p). Por ello, la pérdida de la homeostasis de estos miRNAs

plasmáticos observada en nuestro estudio puede ser complementaria a la acción de la m-HTT, incrementando la desregulación génica al verse aumentada la expresión de miRNAs que presentan dianas en estos reguladores transcripcionales.

Globalmente, podemos observar que los miRNAs plasmáticos alterados en la EH presentan dianas génicas a varios niveles de rutas importantes para el correcto funcionamiento celular, como la señalización de AKT, mTOR, NFκB, p53, adipocitocinas y reguladores transcripcionales (ver figura 4). Además, gran número de los miRNAs presentan dianas en los genes encargados de coordinar el estado metabólico celular, por lo que podrían ser potenciales biomarcadores de las alteraciones metabólicas ocurridas en la progresión de la patología. Sin embargo, la caracterización funcional de estas complejas interacciones entre miRNA y mRNA es imprescindible para poder comprender los mecanismos patogénicos en la EH desde un punto de vista más amplio e integral.

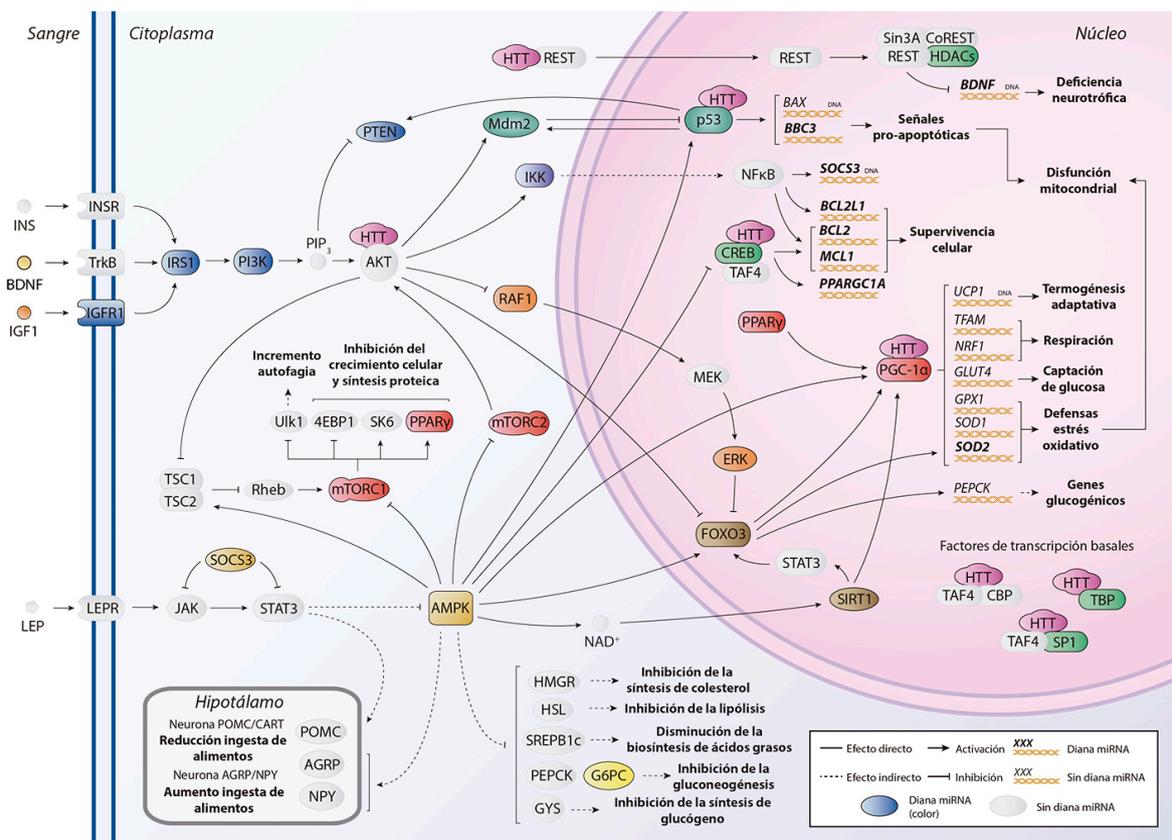


Figura 4. Rutas biológicas analizadas en las que interviene la huntingtina (HTT) y los miRNAs plasmáticos alterados en la EH. La HTT aparece junto a las proteínas con las que interactúa directamente. Las proteínas codificadas por genes que son dianas validadas de los miRNAs alterados en plasma de pacientes de la EH se muestran en color. Los genes que son dianas validadas de los miRNAs se muestran destacados en negrita. Ver la tabla 2 para conocer los miRNAs dianas de los genes representados en la figura. La interconexión entre las rutas se ha representado utilizando la combinación de las bases de datos de rutas KEGG Pathways y BioCarta.

25 miRNAs plasmáticos presentan un alto potencial como marcadores biológicos de la fase sintomática en la EH

La EH es una enfermedad neurodegenerativa muy compleja que precisa del desarrollo de marcadores biológicos que permitan orientar las intervenciones terapéuticas dirigidas a reducir los efectos de la progresión de la enfermedad (Bates et al., 2015; Zuccato et al., 2010). Dada la expresión ubicua de la m-HTT y sus efectos a nivel central y periférico, se abre la posibilidad de utilizar los miRNAs circulantes como biomarcadores capaces de recopilar las alteraciones tisulares observadas en la EH.

Atendiendo a la tasa de cambio diferencial de los miRNAs plasmáticos observada entre controles y pacientes de la EH, hemos fijado un valor límite por el cual los miRNAs plasmáticos con una tasa de cambio diferencial comprendida entre $\pm 2,5$ (\log_2) han sido descartados. Esto nos permite minimizar el error producido por la dispersión de los valores en la cuantificación relativa dentro de los grupos del estudio (ver figura suplementaria S1), ya que el número de pacientes incluido en el estudio es reducido y no todos presentan la misma fase de la enfermedad. Complementariamente, se ha analizado el enriquecimiento de los miRNAs en diferentes tejidos con los datos procedentes de GEO *DataSets* (*Gene Expression Omnibus*). La expresión de los miRNAs en sujetos control se ha obtenido en los siguientes tejidos: músculo esquelético (GSE23572), tejido adiposo (GSE18470) y corteza prefrontal (GSE64977); permitiéndonos seleccionar aquellos miRNAs que presentan mayor expresión en estos tejidos, comúnmente modificados en la EH, como posible fuente o diana de los miRNAs plasmáticos. Finalmente, integrando el análisis bioinformático correspondiente al entorno genómico y dianas génicas de los miRNAs en las rutas analizadas, hemos obtenido 25 miRNAs plasmáticos que presentan potencial como marcadores biológicos de la alteración sistémica observada en la fase sintomática de la EH (ver tabla 3).

Tabla 3. miRNAs circulantes plasmáticos que presentan un alto potencial para ser marcadores biológicos de la fase sintomática de la EH

miRNA	P-valor	Tasa de cambio diferencial (\log_2)	Dianas génicas (n)	Expresión en músculo esquelético ¹	Expresión en tejido adiposo ¹	Expresión en corteza prefrontal ¹
hsa-miR-126-3p	7,80E-08	-2,80504	2	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-128	2,70E-07	-2,78058	1	Alta	Media	Alta
hsa-miR-130a-3p	3,80E-05	-3,17158	1	Media	Alta	Alta
hsa-miR-145-5p	9,55E-05	-2,82769	4	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-146a-5p	2,08E-05	-3,32874	1	Media	Media	Alta
hsa-miR-152	1,05E-04	-2,87921	2	Alta	Media	Alta
hsa-miR-181b-5p	2,06E-05	-2,54846	4	Media	Media	Alta
hsa-miR-181d	3,77E-06	-2,67480	1	Media	Media	Alta
hsa-miR-195-5p	6,66E-05	-3,42976	5	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-199a-5p	1,51E-05	-3,62575	2	Media	Alta	Media
hsa-miR-21-5p	5,48E-06	-2,88196	4	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-214-3p	7,40E-05	2,96441	3	Alta	Media	Media
hsa-miR-221-3p	3,07E-07	-3,30052	5	Media	Media	Alta
hsa-miR-223-3p	1,00E-08	-3,38838	2	Media	Alta	Media
hsa-miR-23a-3p	5,54E-06	-3,32420	5	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-23b-3p	1,53E-07	-2,80997	2	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-26a-5p	1,78E-06	-2,86358	1	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-27a-3p	1,06E-04	-5,53711	1	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-27b-3p	6,37E-06	-3,48393	1	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-301a-3p	8,13E-06	-3,09497	-	Alta	Alta	Alta
hsa-miR-30d-5p	6,37E-05	-3,18109	1	Media	Media	Alta
hsa-miR-335-5p	4,50E-06	-3,85671	3	Media	Media	Alta
hsa-miR-584-5p	2,40E-05	-3,28745	-	Media	Media	Alta
hsa-miR-941	1,61E-05	-3,30858	-	Media	Media	Alta
hsa-miR-99b-5p	6,27E-05	-2,65325	1	Alta	Media	Alta

1: el nivel de expresión de los miRNAs en músculo esquelético, tejido adiposo y corteza prefrontal se ha obtenido de la expresión promedio de 834, 263 y 934 miRNAs respectivamente (calculado como Media \pm Desviación estándar). Los datos se han obtenido de la base de datos GEO *DataSets*: GSE23572, GSE18470 y GSE64977.

A pesar de que los resultados obtenidos son prometedores, este trabajo presenta varias limitaciones. Debido a los criterios de inclusión y exclusión del estudio, junto con el hecho de que la EH sea una enfermedad de baja prevalencia, el número de sujetos incluidos en el estudio no nos permite tener una alta potencia estadística. Por ello, sería necesario aumentar el número de pacientes con el objetivo de validar los resultados obtenidos, siendo conveniente establecer diferentes grupos en función del estadio de la enfermedad, ante la imposibilidad de descartar que los perfiles de miRNAs sean específicos en las diferentes fases sintomáticas de la patología. Asimismo, el estudio está centrado en la búsqueda de 752 miRNAs presentes en el panel comercial utilizado, por lo que la utilización de técnicas como la secuenciación masiva permitiría ampliar, con carácter general, los resultados obtenidos.

Pese a los problemas a la hora de esclarecer los procesos subyacentes a la desregulación de los miRNAs circulantes en los procesos patológicos; teniendo en cuenta las relaciones descriptivas que hemos podido establecer en este estudio, los miRNAs circulantes se perfilan como futuros biomarcadores de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la EH. La utilidad de estas moléculas de RNA como marcadores biológicos de fase y pronóstico permitiría establecer intervenciones terapéuticas con el objetivo de ralentizar el progreso de la EH, pudiendo tener un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, es necesario profundizar en el conocimiento de las interacciones entre los miRNAs y mRNAs a nivel sistémico, lo que nos permitiría entender el significado funcional de estas alteraciones en la EH y esclarecer su contribución a la progresión de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. El perfil plasmático de los miRNAs circulantes en la EH se encuentra alterado en la fase sintomática de la enfermedad.
2. Los miRNAs alterados en la fase sintomática de la EH presentan dianas génicas involucradas en algunas de las principales rutas modificadas por la acción de la m-HTT.
3. Proponemos a los miRNAs circulantes miR-126-3p, miR-128, miR-130a-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-152, miR-181b-5p, miR-181d, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-26a-5p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-301a-3p, miR-30d-5p, miR-335-5p, miR-584-5p, miR-941 y miR-99b-5p como candidatos para ser validados en un mayor número de pacientes de EH y poder confirmar su potencial como biomarcadores de la fase sintomática de la EH.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; **14**(8):475-88.
- 2) Aziz NA, Pijl H, Frölich M, van der Graaf AW, Roelfsema F, Roos RA. Leptin secretion rate increases with higher CAG repeat number in Huntington's disease patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; **73**(2):206-11.
- 3) Bates GP. History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nat Rev Genet.* 2005; **6**(10):766-73.
- 4) Bates, GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, Nance M, Ross CA, Scahill RI, Wetzel R, Wild EJ, Tabrizi SJ. Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers.* [Internet] 23 de Abril de 2015 [citado el 28 Mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nrdp20155>
- 5) Ben M'Barek K, Pla P, Orvoen S, Benstaali C, Godin JD, Gardier AM, Saudou F, David DJ, Humbert S. Huntingtin mediates anxiety/depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* 2013; **33**(20):8608-20.
- 6) Bowles KR, Jones L. Kinase signalling in Huntington's disease. *J Huntingtons Dis.* 2014; **3**(2):89-123.
- 7) Brewer MH, Ma KH, Beecham GW, Gopinath C, Baas F, Choi BO, Reilly MM, Shy ME, Züchner S, Svaren J, Antonellis A. Haplotype-specific modulation of a SOX10/CREB response element at the Charcot-Marie-Tooth disease type 4C locus SH3TC2. *Hum Mol Genet.* 2014; **23**(19):5171-87.
- 8) Cadieux-Dion M, Andermann E, Lachance-Touchette P, Ansorge O, Meloche C, Barnabé A, Kuzniecky RI, Andermann F, Faught E, Leonberg S, Damiano JA, Berkovic SF, Rouleau GA, Cossette P. Recurrent mutations in DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease. *Clin Genet.* 2013; **83**(6):571-5.
- 9) Cao G, Huang B, Liu Z, Zhang J, Xu H, Xia W, Li J, Li S, Chen L, Ding H, Zhao Q, Fan M, Shen B, Shao N. Intronic miR-301 feedback regulates its host gene, ska2, in A549 cells by targeting MEOX2 to affect ERK/CREB pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; **396**(4):978-82.
- 10) Chiang MC, Chen CM, Lee MR, Chen HW, Chen HM, Wu YS, Hung CH, Kang JJ, Chang CP, Chang C, Wu YR, Tsai YS, Chern Y. Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Hum Mol Genet.* 2010; **19**(20):4043-58.
- 11) Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell.* 2006; **127**(1):59-69.
- 12) Dumortier O, Hinault C, Van Obberghen E. MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell Metab.* 2013; **18**(3):312-24.

- 13) Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods Mol Biol.* 2014; **1182**:289-305.
- 14) Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011; **44**(5):839-47.
- 15) Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011; **12**(12):861-74.
- 16) Fenoglio C, Ridolfi E, Cantoni C, De Riz M, Bonsi R, Serpente M, Villa C, Pietroboni AM, Naismith RT, Alvarez E, Parks BJ, Bresolin N, Cross AH, Piccio LM, Galimberti D, Scarpini E. Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2013; **19**(14):1938-42.
- 17) Galimberti D, Villa C, Fenoglio C, Serpente M, Ghezzi L, Cioffi SM, Arighi A, Fumagalli G, Scarpini E. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2014; **42**(4):1261-7.
- 18) Gaughwin PM, Ciesla M, Lahiri N, Tabrizi SJ, Brundin P, Björkqvist M. Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2011; **20**(11):2225-37.
- 19) Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell.* 2004; **118**(1):127-38.
- 20) Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C. Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2012; **235**(2):491-6.
- 21) Ghose J, Sinha M, Das E, Jana NR, Bhattacharyya NP. Regulation of miR-146a by RelA/NFkB and p53 in STHdh(Q111)/Hdh(Q111) cells, a cell model of Huntington's disease. *PLoS One.* 2011; **6**(8):e23837.
- 22) Goodall EF, Heath PR, Bandmann O, Kirby J and Shaw PJ. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 2013; **7**:178.
- 23) Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; **15**(8):509-24.
- 24) Hoffner G, Djian P. Monomeric, oligomeric and polymeric proteins in Huntington disease and other diseases of polyglutamine expansion. *Brain Sci.* 2014; **4**(1):91-122.
- 25) Hoss AG, Labadorf A, Latourelle JC, Kartha VK, Hadzi TC, Gusella JF, MacDonald ME, Chen JF, Akbarian S, Weng Z, Vonsattel JP, Myers RH. miR-10b-5p expression in Huntington's disease brain relates to age of onset and the extent of striatal involvement. *BMC Med Genomics.* 2015; **8**:10.
- 26) Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, Chu CF, Huang HY, Lin CM, Ho SY, Jian TY, Lin FM, Chang TH, Weng SL, Liao KW, Liao IE, Liu CC, Huang HD. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2014; **42**(Database issue):D78-85.

- 27) Hult S, Soyly R, Björklund T, Belgardt BF, Mauer J, Brüning JC, Kirik D, Petersén Å. Mutant huntingtin causes metabolic imbalance by disruption of hypothalamic neurocircuits. *Cell Metab.* 2011; **13**(4):428-39.
- 28) Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* 2011; **12**(2):99-110.
- 29) Ivkovic S, Ehrlich ME. Expression of the striatal DARPP-32/ARPP-21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 1999; **19**(13):5409-19.
- 30) Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2013; **33**(5):601-13.
- 31) Jin YN, Hwang WY, Jo C, Johnson GV. Metabolic state determines sensitivity to cellular stress in Huntington disease: normalization by activation of PPAR γ . *PLoS One.* 2012; **7**(1):e30406.
- 32) Jin YN, Johnson GV. The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2010; **42**(3):199-205.
- 33) Johnson R, Zuccato C, Belyaev ND, Guest DJ, Cattaneo E, Buckley NJ. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 2008; **29**(3):438-45.
- 34) Ju TC, Lin YS, Chern Y. Energy dysfunction in Huntington's disease: insights from PGC-1 α , AMPK, and CKB. *Cell Mol Life Sci.* 2012; **69**(24):4107-20.
- 35) Kannike K, Sepp M, Zuccato C, Cattaneo E, Timmusk T. Forkhead transcription factor FOXO3a levels are increased in Huntington disease because of overactivated positive autofeedback loop. *J Biol Chem.* 2014; **289**(47):32845-57.
- 36) Kumar P, Dezso Z, MacKenzie C, Oestreicher J, Agoulnik S, Byrne M, Bernier F, Yanagimachi M, Aoshima K, Oda Y. Circulating miRNA biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013; **8**(7):e69807.
- 37) Lalić NM, Marić J, Svetel M, Jotić A, Stefanova E, Lalić K, Dragasević N, Milčić T, Lukić L, Kostić VS. Glucose homeostasis in Huntington disease: abnormalities in insulin sensitivity and early-phase insulin secretion. *Arch Neurol.* 2008; **65**(4):476-80.
- 38) Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012; **149**(2):274-93.
- 39) Lee ST, Chu K, Im WS, Yoon HJ, Im JY, Park JE, Park KH, Jung KH, Lee SK, Kim M, Roh JK. Altered microRNA regulation in Huntington's disease models. *Exp Neurol.* 2011; **227**(1):172-9.
- 40) Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002; **418**(6899):797-801.

- 41) Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012; **482**(7385):347-55.
- 42) Luthi-Carter R, Hanson SA, Strand AD, Bergstrom DA, Chun W, Peters NL, Woods AM, Chan EY, Kooperberg C, Krainc D, Young AB, Tapscott SJ, Olson JM. Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Hum Mol Genet*. 2002; **11**(17):1911-26.
- 43) Luthi-Carter R, Strand A, Peters NL, Solano SM, Hollingsworth ZR, Menon AS, Frey AS, Spektor BS, Penney EB, Schilling G, Ross CA, Borchelt DR, Tapscott SJ, Young AB, Cha JH, Olson JM. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2000; **9**(9):1259-71.
- 44) Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci*. 2013; **7**:265.
- 45) Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab*. 2014; **25**(2):89-98.
- 46) Martí E, Pantano L, Bañez-Coronel M, Llorens F, Miñones-Moyano E, Porta S, Sumoy L, Ferrer I, Estivill X. A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2010; **38**(20):7219-35.
- 47) McGill JK, Beal MF. PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell*. 2006; **127**(3):465-8.
- 48) Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012; **148**(6):1172-87.
- 49) Miller LC, Swayne LA, Chen L, Feng ZP, Wacker JL, Muchowski PJ, Zamponi GW, Braun JE. Cysteine string protein (CSP) inhibition of N-type calcium channels is blocked by mutant huntingtin. *J Biol Chem*. 2003; **278**(52):53072-81.
- 50) Møllersen L, Rowe AD, Larsen E, Rognes T, Klungland A. Continuous and periodic expansion of CAG repeats in Huntington's disease R6/1 mice. *PLoS Genet*. 2010; **6**(12):e1001242.
- 51) Moumné L, Betuing S and Caboche J. Multiple aspects of gene dysregulation in Huntington's disease. *Front. Neurol*. 2013; **4**:127.
- 52) Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, Gómez-Ambrosi J, Anglada R, Fernández-Formoso JA, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013; **59**(5):781-92.
- 53) Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, Xifra G, Martínez C, Ricart W, Rieusset J, Rome S, Karczewska-Kupczewska M, Strackowski M, Fernández-Real JM. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care*. 2014; **37**(5):1375-83.
- 54) Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2008; **28**(53):14341-6.

- 55) Phan J, Hickey MA, Zhang P, Chesselet MF, Reue K. Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease mouse models. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**(6):1006-16.
- 56) Rakhilin SV, Olson PA, Nishi A, Starkova NN, Fienberg AA, Nairn AC, Surmeier DJ, Greengard P. A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science.* 2004; **306**(5696):698-701.
- 57) Ribeiro M, Rosenstock TR, Oliveira AM, Oliveira CR, Rego AC. Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic Biol Med.* 2014; **74**:129-44.
- 58) Ross CA, Aylward EH, Wild EJ, Langbehn DR, Long JD, Warner JH, Scahill RI, Leavitt BR, Stout JC, Paulsen JS, Reilmann R, Unschuld PG, Wexler A, Margolis RL, Tabrizi SJ. Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat Rev Neurol.* 2014; **10**(4):204-16.
- 59) Santovito D, De Nardis V, Marcantonio P, Mandolini C, Paganelli C, Vitale E, Buttitta F, Bucci M, Mezzetti A, Consoli A, Cipollone F. Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; **99**(9):E1681-5.
- 60) Seredenina T, Luthi-Carter R. What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol Dis.* 2012; **45**(1):83-98.
- 61) Shenoy A, Belloch RH. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; **15**(9):565-76.
- 62) Soldati C, Bithell A, Johnston C, Wong KY, Stanton LW, Buckley NJ. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease. *J Neurochem.* 2013; **124**(3):418-30.
- 63) Sousa-Ferreira L, Álvaro AR, Aveleira C, Santana M, Brandão I, Kügler S, de Almeida LP, Cavadas C. Proliferative hypothalamic neurospheres express NPY, AGRP, POMC, CART and Orexin-A and differentiate to functional neurons. *PLoS One.* 2011; **6**(5):e19745.
- 64) St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006; **127**(2):397-408.
- 65) Tan CL, Plotkin JL, Venø MT, von Schimmelmann M, Feinberg P, Mann S, Handler A, Kjems J, Surmeier DJ, O'Carroll D, Greengard P, Schaefer A. MicroRNA-128 governs neuronal excitability and motor behavior in mice. *Science.* 2013; **342**(6163):1254-8.
- 66) Thompson LM, Aiken CT, Kaltenbach LS, Agrawal N, Illes K, Khoshnan A, Martinez-Vincente M, Arrasate M, O'Rourke JG, Khashwji H, Lukacsovich T, Zhu YZ, Lau AL, Massey A, Hayden MR, Zeitlin SO, Finkbeiner S, Green KN, LaFerla FM, Bates G, Huang L, Patterson PH, Lo DC, Cuervo AM, Marsh JL, Steffan JS. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol.* 2009; **187**(7):1083-99.

- 67) Tomás-Zapico C, Díez-Zaera M, Ferrer I, Gómez-Ramos P, Morán MA, Miras-Portugal MT, Díaz-Hernández M, Lucas JJ. α -Synuclein accumulates in huntingtin inclusions but forms independent filaments and its deficiency attenuates early phenotype in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 2012; **21**(3):495-510.
- 68) Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007; **369**(9557):218-28.
- 69) Weydt P, Pineda VV, Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, Gilbert ML, Morton GJ, Bammler TK, Strand AD, Cui L, Beyer RP, Easley CN, Smith AC, Krainc D, Luquet S, Sweet IR, Schwartz MW, La Spada AR. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.* 2006; **4**(5):349-62.
- 70) Yeo M, Lee SK, Lee B, Ruiz EC, Pfaff SL, Gill GN. Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science.* 2005; **307**(5709):596-600.
- 71) Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2009; **9**(5):407-16.
- 72) Zielonka D, Piotrowska I, Marcinkowski JT, Mielcarek M. Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Front Physiol.* 2014; **5**:380.
- 73) Zuccato C, Valenza M, Cattaneo E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev.* 2010; **90**(3):905-81.

ANEXO

Tabla suplementaria S1. Características de los sujetos del estudio

Grupo (n)	Edad (2014) ^a	Repeticiones CAG ^a	Edad de manifestación ^a	Edad de diagnóstico ^a	Años de progresión ^a	Fase de la enfermedad (n)
Control (5)	47,50 (43-51,75)	-	-	-	-	-
EH (6)	50 (42-58,50)	42,50 (40,75-44,50)	41,50 (33-55)	49 (40,50-57,75)	7,50 (0,75-10,50)	Temprana (3) Intermedia (1) Avanzada (2)

a: valores descriptivos presentados como Media (Rango intercuartílico)

Tabla suplementaria S2. miRNAs alterados en otros estudios de la EH

miRNA	Tipo de Cambio	Fuente	Referencia
miR-29a, -330 miR-132	Aumenta Disminuye	Área 4 de Brodmann	Johnson et al., 2008
miR-132 , -196, -486 miR-9, -9*, -124, -17-3p, -22, -222, -29b, 485-5p, -500	Aumenta Disminuye	Área 4 de Brodmann	Packer et al., 2008
miR-100, -106b, -148b , -151-3p/5p , -15b, -16, -17, -193b, -19b , -20a, -219-2-3p, -219-5p, -27b , -33b, -363, -451, -486-5p, -887, -92a miR-124, -127-3p, -128 , -139-3p, -181d , -221 , -222 , -382 , -383, -409-5p, -432 , -433 , -485-3p, -485-5p, -95	Aumenta Disminuye	Corteza frontal y estriado	Martí et al., 2010
miR-34b miR-487b , -130b , -1908 , -23b miR-421 , -381 , -19b	Aumenta Aumenta Disminuye	Plasma <i>in vitro</i> ¹	Gaughwin et al., 2011
miR-10b-3p/5p, -106a-5p , 126-5p , 142-5p , -196a-5p , -199a-5p , -196b-5p, -223-3p , -28-5p , -302a-3p miR-132-3p , -431-5p , -877-5p	Aumenta Disminuye	Área 9 de Brodmann ²	Hoss et al., 2015

Destacados en negrita los miRNAs que se presentan alterados en plasma de pacientes de la EH. 1: miRNAs del estudio *in vitro* de Gaughwin y cols. que no se presentan significativamente modificados, pero sí se presentan modificados en nuestro estudio en plasma. 2: Debido al alto número de miRNAs analizados por Hoss y cols. se representan los miRNAs correlacionados con el grado de neurodegeneración (miR-10b-5p, miR-10b-3p y miR-302a-3p) y progresión de la enfermedad (miR-10b-5p, miR-196a-5p, miR-196b-5p, miR-10b-3p y miR-106a-5p), junto a aquellos que se encuentran alterados en nuestro estudio en plasma.

Tabla suplementaria S3. Entorno genómico de los miRNAs intrónicos alterados en plasma de pacientes de la EH

miRNA	Gen	Localización genómica ¹	miRNA	Gen	Localización genómica ¹
hsa-let-7g	<i>WDR82</i>	3: 52268267:52268377 [-]	hsa-miR-335	<i>MEST</i>	7: 130496111:130496204 [+]
hsa-miR-126	<i>EGFL7</i>	9: 136670602:136670686 [+]	hsa-miR-361	<i>CHM</i>	X: 85903611:85903722 [-]
hsa-miR-128-1	<i>R3HDM1</i>	2: 135665383:135665493 [+]	hsa-miR-423	<i>NSRP1</i>	17: 30117079:30117172 [+]
hsa-miR-128-2	<i>ARPP21</i>	3: 35744476:35744559 [+]	hsa-miR-505	<i>ATP11C</i>	X: 139924126:139924237 [-]
hsa-miR-140	<i>WWP2</i>	16: 69933073:69933182 [+]	hsa-miR-548c	<i>RASSF3</i>	12: 64622509:64622605 [+]
hsa-miR-148b	<i>COPZ1</i>	12: 54337208:54337316 [+]	hsa-miR-556	<i>NOS1AP</i>	1: 162342530:162342638 [+]
hsa-miR-151a	<i>PTK2</i>	8: 140732565:140732676 [-]	hsa-miR-574	<i>FAM114A1</i>	4: 38868032:38868127 [+]
hsa-miR-152	<i>COPZ2</i>	17: 48037154:48037262 [-]	hsa-miR-584	<i>SH3TC2</i>	5: 149062304:149062414 [-]
hsa-miR-1908	<i>FADS1</i>	11: 61815161:61815240 [-]	hsa-miR-590	<i>EIF4H</i>	7: 74191198:74191294 [+]
hsa-miR-23b	<i>C9orf3</i>	9: 95085208:95085304 [+]	hsa-miR-628	<i>CCPG1</i>	15: 55372921:55373032 [-]
hsa-miR-26a-1	<i>CTDSPL</i>	3: 37969404:37969480 [+]	hsa-miR-652	<i>TMEM164</i>	X: 110055319:110055427 [+]
hsa-miR-26a-2	<i>CTDSP2</i>	12: 57824609:57824692 [-]	hsa-miR-671	<i>CHPF2</i>	7: 151238421:151238538 [+]
hsa-miR-27b	<i>C9orf3</i>	9: 95085435:95085542 [+]	hsa-miR-744	<i>MAP2K4</i>	17: 12081899:12081996 [+]
hsa-miR-28	<i>LPP</i>	3: 188688781:188688866 [+]	hsa-miR-877	<i>ABCF1</i>	6: 30584312:30584425 [+]
hsa-miR-301a	<i>SKA2</i>	17: 59151136:59151221 [-]	hsa-miR-941	<i>DNAJC5</i>	20: 63919756:63919827 [+]
hsa-miR-30e	<i>NFYC</i>	1: 40754351:40754463 [+]	hsa-miR-98	<i>HUWE1</i>	X: 53556223:53556341 [-]
hsa-miR-326	<i>ARRB1</i>	11: 75335092:75335186 [-]			

1: localización genómica en el genoma humano de referencia 38 (GRCh38) presentada como cromosoma: secuencia de nucleótidos en el DNA: hebra del DNA (+ hebra *forward*, - hebra *reverse*)

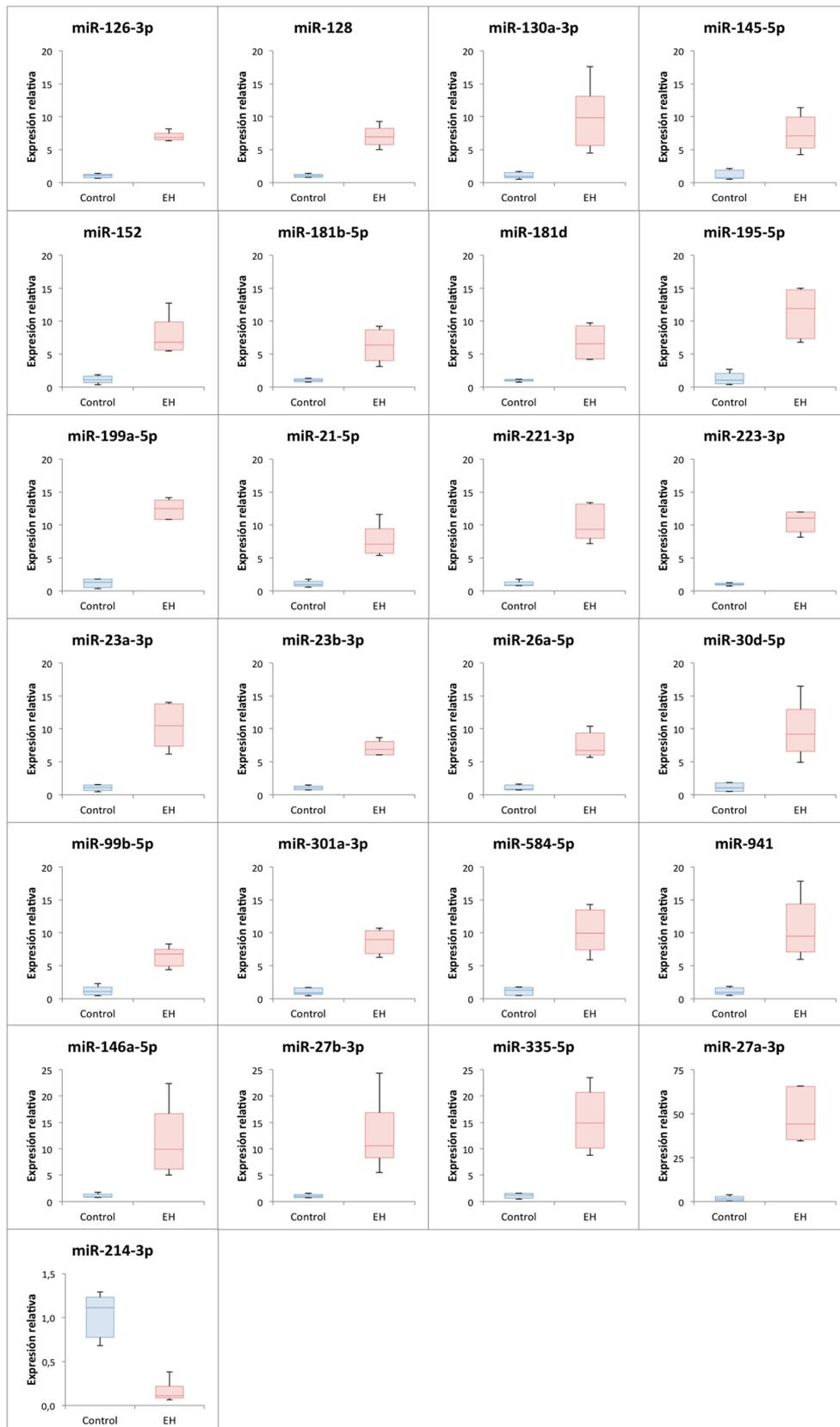


Figura suplementaria S1. Diagrama de cajas de los miRNAs seleccionados como potenciales biomarcadores de la fase sintomática en la EH en pacientes y sujetos control. Dispersión de los valores de la cuantificación relativa lineal obtenida en los distintos grupos del estudio. La expresión relativa lineal representada se ha calculado en base al grupo control. Grupo control: cajas azules; enfermos EH: cajas naranjas