



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

Carrera de Ciencias Biológicas

**Evaluación de miARNs diferencialmente expresados en niñas
afectadas con el síndrome de Rett para ser utilizados como
biomarcadores con valor diagnóstico y pronóstico de la
severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad**

María Belén Cardillo

Director: Dr. Bruno G. Berardino

**Laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades Tempranas, Departamento de Química
Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.**

Julio 2024

Agradecimientos

Quiero agradecer, en primer lugar, a mi director, Brunito. Gracias por el inmenso aprendizaje, el aguante y la paciencia infinita. Por tu dedicación incansable y el amor que le ponés a tu trabajo, me contagiás entusiasmo y perseverancia todos los días. No me alcanzan las palabras para agradecerte estos años en el laboratorio.

A Edu, que es el motor del laboratorio. Gracias por abrirme las puertas de una forma tan hermosa. Hacés que todos los días sea un placer ir a trabajar y no hay día que no me saques una sonrisa. Te admiro profundamente, laboral y personalmente.

A ambos les quiero agradecer todo lo que me enseñaron y me siguen enseñando todos los días. Gracias por las mil y una oportunidades, explicaciones, reuniones, abrazos y choques de cabeza. Pero por sobre todo quiero agradecerles la confianza, no me alcanzan las palabras para decirles lo mucho que significa para mí. Me hacen sentir que puedo hacer las mil y una cosas que siempre me proponen. Los adoro.

Al hermoso grupo de laboratorio, que hacen un ambiente hermoso y compañero: Marie, Eri, Monse, Lu, Pau, Miki, Fiore, y donde además encontré dos amistades preciosas que me acompañan en todas las felicidades y desgracias de la vida laboratorial, Cami y Jaz. Espero que nos sigamos acompañando en todo lo que sigue.

A ALAPA y la Fundación sinRett por invitarme a ser parte de este hermoso proyecto, con una calidez humana que motoriza cada una de las etapas del proceso. Gracias por el afecto y el aprendizaje.

A Pau, Maru, Caro y Talu, hicieron que la carrera fuera hermosa, porque llorar y reirse siempre es mejor con amigas. Gracias por la infinidad de mates, estudio, laboratorios, crisis, viajes, juntadas, llantos y felicidades. Por bancarnos y alegrarnos entre todas. Las amo a montones, son lo más lindo que me dio la carrera.

A mis compis de cursada y de fútbol, me salvaron cientos de semanas con la simple alegría de jugar un partido. Gracias por la manija y la intensidad.

A Carlita, la hermana que me crucé en la vida hace ya 11 años. No me imagino mi vida sin vos. Crecer juntas fue una de las mejores cosas que me pasó, ojalá sigamos creciendo y acompañándonos mutuamente. Te amo.

A Andy, por acompañarme en este último tramo tan intenso e inestable y ser completamente incondicional. Por bancarme los horarios delirantes; por tu escucha, tu paciencia y tu cariño, te amo.

A mis viejos, por acompañarme en la vida, en cada una de mis decisiones incondicionalmente. Por darme todo y más y enseñarme a disfrutar del proceso, y que el esfuerzo siempre vale la pena. Gracias pa, por armarme siempre un mate antes de irme, por todos los abrazos y charlas infinitas. Por hacerme repensar constantemente y sacarme la ficha en dos segundos. Gracias ma, por estar siempre al pie del cañón, por cuidarme, mimarme y consolarme siempre. Por ayudarme a descubrir la música, que me acompaña en toda mi vida. Los amo, son mi vida entera.

A mis hermanos, Maru y Nico, que son mis compañeros de vida. Por bajarme a tierra y abrazarme, por la complicidad y el amor incondicional. Por acompañarme en todas las angustias y las alegrías. Los amo con todo mi corazón.

A la Universidad pública, por abrirme sus brazos y permitirme iniciar mi camino profesional; por una educación increíble y una lucha incansable. A Exactas, por ser un lugar de estudio y de encuentro, de jornadas eternas y hermosas. Gracias por ser mi segunda casa, para mí es un orgullo formar parte.

Resumen

El síndrome de Rett (RTT) es una enfermedad neurológica severa que afecta mayormente a niñas y es causada por mutaciones en el gen *MECP2*. Esta enfermedad se caracteriza por una regresión en el desarrollo después de un periodo de desarrollo típico y se manifiesta con síntomas como pérdida del habla y habilidades motoras, movimientos estereotipados de las manos, y convulsiones. Debido a la complejidad y el costo del diagnóstico basado en la clínica y las pruebas genéticas, cobra especial relevancia la búsqueda de biomarcadores accesibles y eficaces.

En este estudio, se evaluaron microARNs (miARNs) diferencialmente expresados en niñas con RTT para su uso como biomarcadores diagnósticos y pronósticos de la severidad de las manifestaciones clínicas. Se extrajeron ARNs pequeños de muestras de sangre de niñas diagnosticadas con RTT (grupo RTT) y de niñas sin patologías del neurodesarrollo (grupo Control) y se midió su expresión por RT-qPCR. No se hallaron diferencias de expresión en los miARNs analizados entre los grupos RTT y Control. Además, se buscó evaluar una posible asociación entre la expresión de los distintos miARNs y la severidad de las manifestaciones clínicas pero no se hallaron correlaciones significativas entre ellos.

A pesar de no encontrar diferencias significativas en la expresión de los miARNs estudiados entre los grupos, los resultados subrayan la importancia de continuar investigando otros miARNs y biomarcadores potenciales que puedan ser útiles para el diagnóstico y manejo del RTT. Estos hallazgos aportan información valiosa para futuras investigaciones que busquen mejorar el diagnóstico temprano y la precisión en la evaluación de la severidad del RTT, así como abrir nuevas perspectivas para el tratamiento de la enfermedad.

Evaluation of differentially expressed miRNAs in girls affected with Rett syndrome to be used as biomarkers with diagnostic and prognostic value of the severity of the clinical manifestations of the disease

Abstract

Rett syndrome (RTT) is a severe neurological disorder that primarily affects girls and is caused by mutations in the MeCP2 gene. This disease is characterized by a regression in development after a period of normal growth, manifesting with symptoms such as loss of speech and motor skills, stereotypic hand movements, and seizures. Given the complexity and cost of clinical and genetic diagnostic tests, it's crucial to find accessible and effective diagnosis biomarkers.

In this study, differentially expressed microRNAs (miRNAs) were evaluated in girls with RTT for use as diagnostic and prognostic biomarkers of the severity of clinical manifestations. Small RNAs were extracted from blood samples of girls diagnosed with RTT and from girls without neurodevelopmental disorders (Control), and their expression was measured by RT-qPCR. No differences were found in the expression of the analyzed miRNAs between the Control and Rett groups. Additionally, an attempt was made to evaluate a possible association between the expression of different miRNAs and the severity of clinical manifestations, but no significant correlations were found.

Despite not finding significant differences in the expression of the studied miRNAs between the groups, the results underscore the importance of keep investigating other miRNAs and potential biomarkers that may be useful for the diagnosis and management of RTT. These findings provide valuable information for future research aimed at improving early diagnosis and accuracy in assessing the severity of RTT, as well as opening new perspectives for the treatment of the disease.

Índice

1. Introducción.....	6
1.1 Enfermedades Poco Frecuentes.....	6
1.2. Síndrome de Rett.....	6
1.3 Marcas epigenéticas.....	9
1.4. miARNs.....	10
1.5. Biogénesis de microARNs.....	11
1.6. miARNs y MeCP2.....	14
2. Objetivos e Hipótesis.....	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
2.3. Hipótesis.....	16
3. Materiales y Métodos.....	17
3.1. Participantes y toma de muestras.....	17
3.2. Selección de miARNs candidatos.....	18
3.3. Extracción de miARNs de sangre total.....	19
3.4. Determinación de la expresión de miARNs seleccionados en sangre.....	20
3.4.1. Retrotranscripción (RT) de miARNs.....	20
3.4.2. PCR en tiempo real (qPCR).....	22
3.5. Identificación de miARNs diferencialmente expresados.....	23
3.6. Construcción de curva ROC.....	24
3.7. Determinación de asociaciones entre la expresión de miARNs y la severidad de las manifestaciones clínicas.....	24
3.8. Predicción del tamaño muestral.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Selección de miARNs.....	25
4.2. Extracción de ARN e integridad.....	30
4.3. Determinación de la expresión de miARNs seleccionados en sangre.....	31
4.4. Construcción de curva ROC.....	35
4.5. Determinación de asociaciones entre la expresión de miARNs y la severidad de las manifestaciones clínicas.....	36
4.6. Determinación del tamaño muestral necesario.....	38
5. Discusión y Conclusión.....	40
6. Referencias bibliográficas.....	44

1. Introducción

1.1 Enfermedades Poco Frecuentes

Las enfermedades poco frecuentes (EPOF) son aquellas que poseen una baja prevalencia, es decir un bajo número de personas viviendo con una enfermedad en un momento dado. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen más de 6.000 condiciones clínicas de EPOF. En Argentina, según lo establece la Ley 26.689 (artículo 2º) se consideran EPOF aquellas cuya prevalencia poblacional es igual o inferior a una en dos mil personas referida a la situación epidemiológica nacional.

El 80% de las EPOF posee un origen genético identificado, con implicación de uno o varios genes. Otras, son causadas por infecciones, alergias, o se deben a causas degenerativas, proliferativas o teratógenas (productos químicos, radiación, etc.), y para otras, aún se desconoce la etiología. Si bien pueden presentarse a cualquier edad, el 75% de los casos se presenta en edad pediátrica.

Los conocimientos sobre algunas de estas enfermedades son aún muy recientes y están poco extendidos en la red sanitaria. Este hecho conlleva a una serie de inconvenientes tales como la dificultad en la obtención de un diagnóstico rápido y certero y la falta o inexistencia de tratamientos adecuados o específicos (*Programa Nacional de Enfermedades Poco Frecuentes*, 2020).

1.2. Síndrome de Rett

El síndrome de Rett (RTT) es una severa enfermedad neurológica que afecta el desarrollo y la función del cerebro, principalmente en mujeres. Posee una prevalencia aproximada de 1 cada 10.000 personas y en el 90-95% de los pacientes diagnosticados con RTT clásico, la enfermedad es causada por mutaciones en el gen *MECP2*. Este gen está ligado al cromosoma X en la posición q28 y codifica la proteína de unión al ADN metilado, MeCP2. Las mutaciones que generan este síndrome son *de novo*, mayoritariamente con origen en las células germinales paternas (Banerjee et al., 2019; Vashi & Justice, 2019). Las mutaciones en *MECP2* en el único gen X de los varones generalmente conducen a encefalopatías congénitas severas y fallecen antes de los dos años (Schüle et al., 2008).

El síndrome de Rett se caracteriza por presentar un desarrollo neurológico y físico aparente típico en las niñas que lo presentan hasta aproximadamente los 6-18 meses de vida. Los primeros síntomas del RTT comienzan a manifestarse progresivamente y, a medida que avanza, la enfermedad se desarrolla en 4 etapas: estancamiento temprano (6-18 meses), regresión del desarrollo (1-4 años), período pseudostacionario (2 años-vida potencial) y deterioro motor tardío (10 años-vida). Durante la etapa de estancamiento comienza a detenerse el desarrollo esperado según la edad de las niñas y luego en la etapa de regresión comienzan a perderse habilidades adquiridas previamente como el contacto visual, la destreza manual y acciones de juego. Durante el período pseudoestacionario se estanca la progresión de los síntomas y finalmente el deterioro motor tardío implica una pérdida por completo de la movilidad autónoma (Fu et al., 2020; Kyle et al., 2018; Leonard et al., 2017).

Los síntomas característicos del RTT incluyen pérdida del habla y habilidades motoras adquiridas, movimientos estereotipados de las manos, irregularidades en la respiración y convulsiones. Los pacientes con RTT también pueden sufrir episodios esporádicos de problemas gastrointestinales, hipoplasia, osteoporosis de inicio temprano, bruxismo y episodios de gritos (Fu et al., 2020; Kyle et al., 2018; Leonard et al., 2017).

Si bien han sido identificados centenares de mutaciones en *MECP2*, sólo 8 mutaciones puntuales, y delecciones en el extremo C-terminal y en los exones 3 y 4, explican la mayoría de los casos (**Figura 1**) (Gold et al., 2018; Ip et al., 2018). MeCP2 es una proteína expresada en niveles altos en el cerebro y es un modulador epigenético. Está involucrada en la arquitectura de la cromatina y la expresión génica a través de la unión al ADN metilado y la interacción con proteínas co-reguladoras de la transcripción en células neuronales. En numerosos estudios *in vivo* se ha destacado la importancia de MeCP2 en el desarrollo neuronal, la ramificación dendrítica y la morfología cerebral que sustentan la relación genotipo-fenotipo entre esta proteína y el síndrome de Rett (Gold et al., 2018). Como se mencionó previamente, la mayoría de las mutaciones en *MECP2* que provocan el síndrome de Rett son *de novo* en las células germinales paternas. Por este motivo, la desregulación epigenética asociada a estas mutaciones aparece desde el cigoto y afecta a todos los tejidos que se desarrollarán posteriormente (Good et al., 2021).

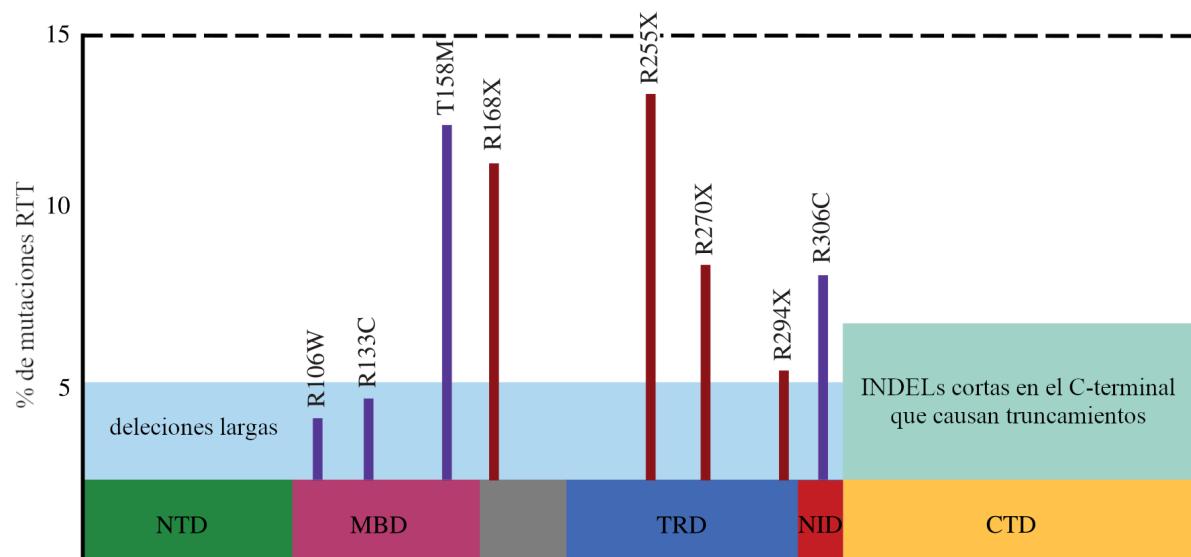


Figura 1 | Mutaciones más frecuentes de MeCP2 en pacientes con síndrome de Rett. Esquema de MeCP2 con dominios funcionales. El eje y representa el porcentaje de pacientes con RTT con la mutación indicada. En violeta se indican las mutaciones de cambio de sentido y en rojo, las mutaciones sin sentido. Adaptado de Kyle et al., 2018.

Actualmente, el diagnóstico del síndrome de Rett continúa siendo clínico y se basa principalmente en la historia de regresión del desarrollo con las incertezas asociadas a los recuerdos de los padres o cuidadores; por lo que frecuentemente es tardío (Banerjee et al., 2019; Vashi & Justice, 2019). Sumado a esto, el síndrome de Rett presenta síntomas compatibles con otros síndromes o patologías como el síndrome de Angelman, trastorno del espectro autista u otras enfermedades que afectan el desarrollo cognitivo que a su vez están asociadas con mutaciones en el gen *MECP2* (Carney et al., 2003; Watson et al., 2001), lo que dificulta y retrasa aún más el diagnóstico. Es por este motivo que la presencia de mutaciones en *MECP2* respalda, pero no confirma, el diagnóstico de RTT ni la severidad de la enfermedad, debido a las limitadas correlaciones genotipo-fenotipo. Por lo tanto, la identificación de biomarcadores de diagnóstico, progresión y gravedad de la enfermedad adquiere relevancia.

Si bien aún no existe un tratamiento definitivo para el síndrome de Rett, algunas medicaciones como el *Trofinetide* se encuentran en investigación (Percy et al., 2024). Sin embargo, mientras tanto, muchas pacientes realizan terapias motrices y/o de estimulación de distintos aspectos como fisioterapia, musicoterapia, fonoaudiología, etc (Vashi & Justice, 2019b). Realizar

estas estimulaciones desde temprana edad aminora los síntomas y enlentece el desarrollo de algunos de ellos. Una detección temprana del síndrome podría favorecer un mejor desarrollo de quienes lo poseen.

1.3 Marcas epigenéticas

Desde la biología molecular, los cambios epigenéticos pueden ser entendidos como un grupo de eventos moleculares, independientes de la secuencia de ADN, que modulan la expresión génica a lo largo del tiempo. Estos cambios involucran metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas (acetilación, metilación, etc) y ARNs no codificantes (por ejemplo, microARNs) (Jiang et al., 2008; Schouten et al., 2013).

La metilación del ADN es una modificación química en la cual la citosina (C) es convertida en 5-metilcitosina (5mC). Las consecuencias a nivel transcripcional de la metilación dependen de la región del gen que se encuentre afectada por esta marca, y de los factores que la misma recluta. A nivel general, la metilación de promotores se asocia con una disminución de la transcripción. La metilación del ADN es dependiente de la presencia de dadores de grupos metilo (provistos en la dieta por nutrientes como el ácido fólico, la metionina y la colina) y de metiltransferasas que, o bien mantienen la metilación (DNMT1) luego de la replicación, o bien generan metilaciones *de novo* (DNMT3a y DNMT3b). La represión de la transcripción por metilación del ADN es sostenida también por otros factores que se unen a los grupos metilo, como la proteína MeCP2.

Otro de los mecanismos epigenéticos que suele incluirse en los estudios de este campo son los ARNs no codificantes, con mayor énfasis en los microARNs (miARNs). Aunque la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de histonas pueden producir un cambio de estado duradero en la expresión génica, tienen una limitada actividad espacial debido a estar constreñidos en el núcleo celular. Esta restricción espacial es particularmente importante en el sistema nervioso donde las complejas arquitecturas celulares son esenciales para la estructuración de circuitos neurales y su funcionalidad. Las regulaciones postranscripcional y/o traduccional permiten modificar la expresión a un nivel espacial (McNeill & Van Vactor, 2012). Por esta razón, los ARNs

no codificantes y, en particular, los pequeños ARNs tomaron un rol preponderante en el estudio de la regulación de la expresión génica en el sistema nervioso.

1.4. miARNs

Los ARNs pequeños eucariotas tienen un tamaño de entre 20 y 30 nucleótidos de largo y están asociados con la familia de proteínas Argonauta (AGO). Dentro de la familia AGO existen dos clases: la subfamilia AGO y la subfamilia PIWI. El genoma humano codifica, al menos, 3 clases de ARNs pequeños según su mecanismo de biogénesis y el tipo de proteína AGO a la cual están asociados: los miARNs, los ARNs pequeños endógenos (endo-siARNs) y los ARNs que interactúan con proteínas PIWI (piARNs) (V. N. Kim et al., 2009).

Los miARNs constituyen una clase de ARNs pequeños no codificantes de 22 nucleótidos de largo aproximadamente, cuya función canónica es la modificación postranscripcional de la actividad de mARNs. Los miARNs funcionan como guías a través del apareamiento de bases con sus mARNs blanco, mientras que las proteínas AGO ejercen la función de efectoras por reclutamiento de factores que inducen la represión de la traducción, la deadenilación y la degradación del mARN (Huntzinger & Izaurralde, 2011). Los sitios de unión a miARNs en el mARN suelen estar en la región 3' no codificante (3' UTR) (Bartel, 2009). El dominio nucleotídico que se encuentra hacia la región 5' del miARN y que se extiende desde el nucleótido 2 al 7 es crucial para el reconocimiento del blanco y ha sido denominado región “semilla” del miARN. Otros nucleótidos que también contribuyen al apareamiento con los mARN blanco son el 8 y, con menor importancia, la región de los nucleótidos 13 a 16 (Ha & Kim, 2014).

Los genes de miARNs están localizados en variados contextos genómicos. En humanos, la mayoría de los miARNs canónicos son codificados por intrones de transcriptos codificantes o no codificantes, pero algunos son también codificados por regiones exónicas. A menudo, varios *loci* de miARNs están ubicados con cierta proximidad constituyendo una unidad transcripcional policistrónica (Lee et al., 2002), en cuyo caso se dice que pertenecen al mismo clúster genómico. Los miARNs que se encuentran dentro de un mismo clúster son generalmente cotranscriptos, pero cada miARN individual puede ser regulado postranscripcionalmente de forma independiente (Ha & Kim, 2014).

La regulación por miARNs es uno de los mecanismos más abundantes de regulación postranscripcional (Bredy et al., 2011) y, si bien en la mayoría de los casos, regulan negativamente la traducción, se describieron otros tipos de regulación, como la activación traduccional (Filipowicz et al., 2008). Por último, se ha establecido también una función no canónica para los miARNs que implica la regulación transcripcional de genes a través de la formación de heterocromatina (D. H. Kim et al., 2008; V. N. Kim et al., 2009), lo cual los asocia aún más con la maquinaria epigenética.

Los miARNs juegan un papel importante en virtualmente todos los procesos biológicos estudiados, desde el desarrollo hasta la muerte celular y el control metabólico. Además, más del 60% de los mARNs de mamíferos están controlados por miARNs, añadiendo un nuevo nivel de regulación al ya complejo mecanismo de expresión génica por regulación de la transcripción (Bartel, 2009; Friedman et al., 2009; Schouten et al., 2013).

Entre las especies animales, el número de genes que codifican miARNs ha aumentado significativamente con el incremento de la complejidad organísmica, es decir, con el número de tipos celulares diferenciados. Varias líneas de investigación sugieren que los miARNs regulan de manera precisa la plasticidad sináptica observada en desórdenes del desarrollo del cerebro o los basados en el estrés ambiental (Olde Loohuis et al., 2012; G. Schratt, 2009; G. M. Schratt et al., 2006). Ha sido demostrado que varios miARNs regulan la expresión de proteínas involucradas en el citoesqueleto de actina (Schratt et al., 2006), en el transporte de mARN (Fiore et al., 2009) y en la morfogénesis de espinas dendríticas. La neuroplasticidad es un componente importante en la modulación de los circuitos neuronales durante el desarrollo para lograr correctas funciones cognitivas (Martin et al., 2000).

1.5. Biogénesis de microARNs

La transcripción de miARNs es llevada a cabo por la ARN polimerasa II (Pol-II) y es controlada por los factores de transcripción asociados a Pol-II y por reguladores epigenéticos (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Además, se ha demostrado que algunos miARNs virales pueden ser transcriptos por la Pol-III (Pfeffer et al., 2005).

Luego de la transcripción, el miARN primario (pri-miARN) sufre una serie de pasos para su maduración (Lee et al., 2002). El pri-miARN es una molécula de ARN larga (típicamente de más de 1 kb) y contiene una estructura de bucle con tallo (“*stem-loop*”), en la cual está incluída la secuencia del miARN maduro. Un típico pri-miARN consiste de un tallo de 33 a 35 pb, un bucle terminal y segmentos de ARN simple cadena hacia los extremos 3’ y 5’ (**Figura 2**). El primer paso de maduración es llevado a cabo por la ARNsa tipo III nuclear llamada DROSHA, que recorta el *stem-loop* y libera un ARN pequeño precursor de aproximadamente 65 nucleótidos (pre-miARN) con forma de horquilla (“*hairpin*”) (Lee et al., 2003). Junto con DROSHA, el cofactor DGCR8, forman el complejo Microprocesador (Gregory et al., 2004) (**Figura 2**). Mientras el clivaje por DROSHA define el extremo terminal del miARN y, por lo tanto, determina su especificidad, es importante que el Microprocesador reconozca y clive al pri-miARN en el sitio adecuado. DROSHA cliva a la horquilla del pri-miARN aproximadamente a 11 pb de la unión basal de los dos segmentos de ARN simple cadena con el ARN doble cadena, y aproximadamente a 22 pb de la unión apical que enlaza el bucle terminal (Han et al., 2006). La unión basal está dada por DGCR8 y sirve de referencia para determinar el sitio de clivado (Chiang et al., 2010; Han et al., 2006). Las 11 pb de distancia entre el corte y la base del tallo corresponden a una vuelta de doble hélice de ARN sobre la cual se acomoda DGCR8, sirviendo como un “ancla” molecular a DROSHA, la cual realiza el corte (Carthew & Sontheimer, 2009). Aún así, la unión apical también es importante para un procesamiento preciso (Ma et al., 2013). Luego del procesamiento por DROSHA, el pre-miARN es exportado al citoplasma, donde se completa su maduración. La proteína exportina 5 (XPO5) forma un complejo de transporte junto con la proteína nuclear RAN que une GTP, y con el pre-miARN (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004) (**Figura 2**). Después de la translocación a través del poro nuclear, el GTP es hidrolizado lo cual resulta en el desensamblado del complejo de transporte y la liberación del pre-miARN en el citosol.

Al exportarse el pre-miARN hacia el citoplasma, el mismo es, por segunda vez, clivado por una endonucleasa de tipo III, denominada DICER. El clivaje se realiza cerca del bucle terminal produciendo como resultado un dúplex de ARN pequeño (Bernstein et al., 2001; Grishok et al., 2001) (**Figura 2**). El dominio N-terminal de DICER facilita el reconocimiento del pre-miARN interactuando con su bucle terminal e incrementa el procesamiento de ciertos pre-miARNs (Gu

et al., 2012). DICER se une preferentemente al pre-miARN con un extremo 3' protruyente de 2 nucleótidos, que fue originalmente generado por el clivaje de DROSHA.

El último paso de la biogénesis corresponde a la carga del ARN doble cadena pequeño en alguna proteína AGO para formar el complejo efector, llamado “complejo de silenciamiento inducido por ARN” (RISC, por sus siglas en inglés) (Hammond et al., 2001). El armado de este complejo requiere dos pasos: la carga del dúplex de ARN y su consiguiente desenrollamiento (Kawamata & Tomari, 2010) (**Figura 2**). En algunas especies se produce una carga diferencial del dúplex de ARN en los distintos tipos de proteínas AGO. En humanos, no existe un estricto proceso de clasificación de los dúplex en cada uno de los 4 tipos de AGO, y todos ellos pueden incorporar dúplex de miARNs, con cierta preferencia hacia los dúplex de ARNs pequeños con incompatibilidades de secuencia (“*mismatch*”) en las posiciones de nucleótidos 8 a 11 (Meister et al., 2004). De las dos cadenas de ARN pequeño que forman el dúplex de miARN, sólo una, la denominada “cadena guía”, se cargará en la proteína AGO correspondiente (**Figura 2**). La selección de la cadena guía durante la carga de AGO está principalmente establecida por las características termodinámicas de los extremos del dúplex. La cadena con un extremo 5' relativamente inestable es la que se selecciona como cadena guía. Un determinante adicional de esta selección es la presencia de una U en la posición 1 de la secuencia (Hu et al., 2009). Generalmente, la otra cadena liberada (también llamada “cadena pasajera”) se degrada rápidamente, resultando en un fuerte aumento del porcentaje de presencia de la cadena guía respecto de la pasajera en el pool final de miARNs maduros. Una vez cargada en AGO, la secuencia semilla del miARN guía se estructura en forma de “hélice A”, lo cual facilita el eficiente escaneo de los mARNs potencialmente blanco de esa secuencia. Por otro lado, algunos tipos de AGO tienen actividad de endonucleasa y pueden clivar a la cadena pasajera y también al mARN blanco cuando el dúplex posee complementariedad en los nucleótidos centrales (Matranga et al., 2005). Además, la carga del dúplex en el complejo RISC es un proceso dependiente de ATP, mientras que la liberación de la cadena pasajera es independiente de ATP (Ha & Kim, 2014). Una vez cargado en AGO y seleccionada la cadena guía, el miARN maduro ejerce su función a través del reconocimiento de mARNs blanco en el contexto del complejo RISC (**Figura 2**).

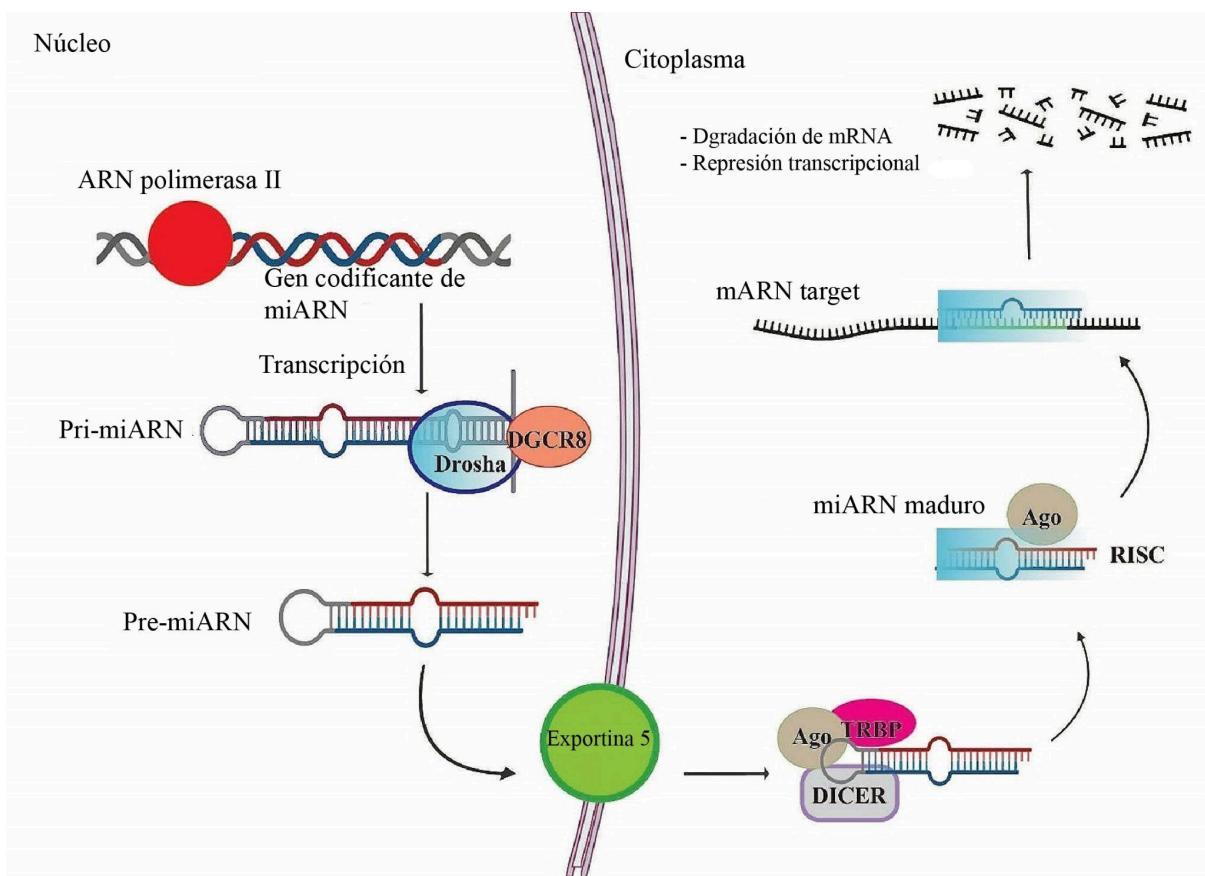


Figura 2 | Esquema de los pasos de la biosíntesis de miARNs. Adaptado de Hazari et al., 2024.

1.6. miARNs y MeCP2

Recientemente, se ha demostrado que la proteína MeCP2 regula la expresión de una gran variedad de miARNs (Horvath et al., 2022; Mellios et al., 2018). Además, se ha sugerido que MeCP2 no sólo ejerce un papel sobre la expresión de los miARN sino también sobre su procesamiento, regulando las proteínas DROSHA y DGCR8 (Lyst & Bird, 2015). En relación con estos datos, un análisis global de la expresión de miARNs, realizado en el cerebro de un modelo de ratones de RTT que tienen anulada la expresión de MeCP2, mostró un perfil alterado de miARNs (Sheinerman & Umansky, 2013). Estas evidencias acerca del papel que desempeña MeCP2 en el procesamiento y expresión de los miARNs y otros ARNs no codificantes sugieren que estas moléculas podrían constituir factores mediadores en las consecuencias epigenéticas derivadas de la

pérdida de función de esta proteína, un importante modificador de la cromatina, particularmente en el contexto del síndrome de Rett.

2. Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivo general

Evaluar la expresión de miARNs circulantes extraídos de sangre total de personas afectadas por RTT a fin de explorar su potencial como biomarcadores tempranos de la enfermedad y de la severidad de las manifestaciones clínicas. La meta es mejorar el diagnóstico y contribuir a la comprensión de los mecanismos involucrados en las diferentes manifestaciones fenotípicas de la enfermedad.

2.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar miARNs que presenten expresión diferencial en distintas regiones del cerebro según se reporta en bases de datos obtenidas de modelos de ratones RTT.
2. Evaluar la expresión diferencial de los miARNs seleccionados en sangre total de pacientes con síndrome de Rett y donantes voluntarias sanas, y evaluar su potencial valor diagnóstico y pronóstico correlacionando con la severidad de las manifestaciones clínicas.
3. Explorar el papel de los miARNs diferencialmente expresados en la patogénesis de Rett.

2.3. Hipótesis

La pérdida de función de la proteína MeCP2 en las niñas y adolescentes afectados por el síndrome de Rett modifica el perfil de expresión de los miARNs en diversos tejidos y esto se refleja en los niveles de estos miARNs detectados en sangre. La severidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad está asociada con los cambios en la expresión de los miARNs desregulados en los pacientes RTT respecto a las voluntarias sanas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Participantes y toma de muestras

Se recolectaron muestras de 3 ml de sangre total de niñas de entre 3 y 18 años en tubos Tempus (*Tempus Blood RNA Tube, ThermoFisher Scientific*) y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Los grupos de participantes fueron contactados a través de la Fundación sinRett y se organizaron según:

- Grupo RTT: niñas y adolescentes con diagnóstico clínico de síndrome de Rett y análisis genético compatible.
- Grupo Control: Niñas y adolescentes pareadas por edad, sin manifestaciones clínicas RTT. Para la conformación del grupo Control se definió un criterio de exclusión de aquellas niñas que presentaran trastornos neurológicos graves que no incluyen el síndrome de Rett, por ejemplo, lesión cerebral perinatal o posnatal, una variedad de trastornos neurodegenerativos y trastornos neurológicos adquiridos como los que pueden resultar de un trauma o una infección.

Las muestras fueron recolectadas por una extraccionista matriculada y se obtuvo un tamaño muestral de 26 para el grupo casos y 13 para el grupo control. La gravedad de las manifestaciones de la enfermedad fue evaluada por un *score* de severidad clínica (CSS, por sus siglas en inglés) de los síntomas de RTT realizada por un médico especialista (Ammanuel et al., 2015). Este *score* está conformado por 7 ítems correspondientes a los síntomas del síndrome con una escala discreta de severidad de 0 a 3 (**Tabla 1**).

Este protocolo cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC); código: 8033.

Tabla 1 | Escala de severidad clínica (CSS) completada por los médicos de cada paciente.

Severidad	0	1	2	3
Convulsiones	Ausentes	Se controlan fácilmente con medicamentos	Controladas con medicamentos, pero con incrementos ocasionales	Convulsiones recalcitrantes múltiples medicamentos
Modo de andar (paso/marcha)	Normal	Ligeramente apráxico	Requiere apoyo para caminar	Requiere apoyo para pararse; se moviliza en silla de ruedas
Escoliosis	Ausente	Menos de 20 grados	Entre 20 y 30 grados	Más de 30 grados, requiere cirugía
Irregularidades respiratorias	Ausentes	Mínimos episodios de apnea	Episodios de apnea e hiperventilación durante más de la mitad del tiempo de vigilia	Episodios de apnea e hiperventilación durante más de la mitad del tiempo de vigilia y cianosis
Uso de las manos	Normal	Aferra con un propósito	Toca por necesidad	Sin uso de las manos
Sueño	Normal	Se despierta, pero se vuelve a dormir	Sueño nocturno fragmentado con somnolencia diurna	Incapaz de dormir toda la noche
Lenguaje/habla/ discurso	Normal	Oraciones/frases	Palabras aisladas	No verbal

3.2. Selección de miARNs candidatos

Se realizó una búsqueda bibliográfica de trabajos publicados en los cuales se analizaron los cambios en el perfil global de expresión de miARNs en cerebro de ratones con manipulación genética de *Mecp2* (KO o sobreexpresión) (Cheng et al., 2014; Mellios et al., 2018; Szulwach et al., 2010; Wu et al., 2010).

Luego de verificar la expresión de los miARNs en humanos según miRBase (<https://www.mirbase.org/>), se realizó una selección de candidatos basada en 3 criterios: 1) número de lecturas mayor a 1.000 RPM (*reads per million*); 2) presencia en al menos tres conjuntos de datos y con el mismo sentido de cambio (sobre- o sub-expresados); 3) cambio en su expresión de al menos 1,5 veces respecto al control. Se seleccionaron 4 miARNs del conjunto de los

sobreexpresados y 4 de los subexpresados que cumplieran con los criterios previamente mencionados.

Con el objetivo de verificar que los miARNs candidato se encontraran asociados a vías relacionadas a las desreguladas en el síndrome de Rett, se realizó una predicción de sus mARNs blanco. Para la predicción se utilizó la base de datos miRWalk 2.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), que combina la predicción de cuatro bases de datos: TarPmiR, TargetScan, miRDB y miRTarBase. Se restringió la búsqueda a los miARNs que interactúan con las regiones 3' UTR de los potenciales mARNs blanco y con un *score* superior a 0,95. Los genes potencialmente blanco de los miARNs seleccionados a partir de las bases de datos de la bibliografía, se utilizaron para realizar un análisis de enriquecimiento de vías celulares (Reactome) y ontología génica (Procesos Biológicos, Funciones Moleculares y Componentes Celulares) mediante el software DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Se analizaron aquellos procesos que en el conjunto de genes involucrados se encontraran significativamente regulados por los miARNs seleccionados previamente. Los datos obtenidos permiten iluminar potenciales vías afectadas por la enfermedad.

3.3. Extracción de miARNs de sangre total

De cada tubo Tempus conteniendo 9 ml totales (6 ml de solución estabilizadora de ARN y 3 ml de sangre) se tomaron 3 ml del contenido, equivalente a 1 ml de sangre. Para la extracción se utilizó RNAZol® BD (*Molecular Research Center*) según las instrucciones del fabricante para la extracción de ARNs *Large* (mayores a 200 nucleótidos) y *Small* (menores a 200 nucleótidos) a partir de muestras líquidas en fracciones separadas. A continuación, se detalla brevemente el protocolo utilizado.

Se homogeneizaron 3 ml del contenido de un Tempus (que contienen 1 ml de sangre) con 2 ml de RNAZol® BD y 27 μ l de ácido acético glacial agitando vigorosamente y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de esta incubación se pasó 1,1 ml de la muestra a 4 tubos eppendorf, se agregaron 50 μ l de BCP, se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó en una centrífuga HERMLE (Z233 MK-2) a 12.000 g a

4 °C durante 15 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica y se tomaron 700 μ l de fase acuosa. A esta fracción se le agregaron 245 μ l de isopropanol 100%, se mezcló por inversión 20 veces y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. En ese paso se produce la precipitación de los ARNs *Large*. Se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 15 minutos y se conservaron 900 μ l de sobrenadante en un nuevo tubo para la posterior purificación de la fracción de *Small* ARNs. Al pellet, se le realizaron dos lavados sucesivos con 400 μ l de etanol 75%, y luego se resuspendió en 20 μ l de agua ultrapura (*INBIO Highway*). Para la precipitación de la fracción de miARNs, al sobrenadante conservado de la precipitación de la fracción *Large* se le agregó un volumen de 432,9 μ l de isopropanol 100%, se mezcló por inversión unas 20 veces y se incubó en heladera durante 30 min para su precipitación. Luego, se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 30 min. Con el pellet resultado de esta centrifugación se realizaron dos lavados sucesivos con 400 μ l de isopropanol 70% y finalmente se resuspendió la fracción de miARN en 15 μ l de agua ultrapura.

La concentración y pureza del ARN se determinaron en 1 μ l de la suspensión utilizando un espectrofotómetro NanoDrop Lite Plus (*ThermoFisher Scientific*) midiendo la absorbancia a 280 nm y la relación de absorbancias a 260/280 y 260/230, respectivamente. Paralelamente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1,5% a 120 V y 400 A para las fracciones *Large* y *Small* para determinar la integridad del ARN extraído. El resto de la muestra fue almacenada a -80 °C hasta su utilización.

3.4. Determinación de la expresión de miARNs seleccionados en sangre

3.4.1. Retrotranscripción (RT) de miARNs

Para retrotranscribir los miARNs se utilizó la fracción de *Small* ARN. Se utilizaron 250 ng de ARN por reacción y se llevó a volumen de 8 μ l con agua ultrapura. Luego se agregó a cada tubo 2 μ l de una mezcla de ADNs *a* RQ1 y Buffer de ADNs *a* RQ1 (*Promega*) en proporciones 1:1. Las muestras fueron calentadas a 65 °C durante 30 min en un termociclador *MyCyclerTM* (*Biorad*). Luego se enfriaron durante 1 min en hielo y se les añadió 1 μ l de STOP Solution ADNs *a* RQ1 (*Promega*) a cada tubo. Se volvieron a calentar a 37 °C durante 10 min y volvieron a ponerse en hielo.

Se agregó a cada tubo 3 μ l de una mezcla de: dNTPs 10 mM, un mix de oligonucleótidos específicos de miARN (*stem-loop oligo*, SLO) 1 μ M de cada uno de los 8 miARNs y el *primer Reverse* (R) de U6, y agua ultrapura, en proporciones 1:1:1. Las muestras fueron calentadas a 65 °C por 5 min. Luego se enfriaron inmediatamente en hielo durante 1 min y se les agregaron 7 μ l de una mezcla de: enzima transcriptasa reversa M-MLV (*Promega*), buffer de reacción 5X (*Promega*), y agua, en proporciones 0,5:4:2,5. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo: 16 °C por 30 min, 60 ciclos de 20 °C por 30 s, 42 °C por 30 s y 50 °C por 1 s, y por último se detuvo la reacción a 85 °C por 5 min. A cada serie de muestras retrotranscriptas, se le agregó también un tubo correspondiente a un blanco de retrotranscripción (con ARN de una de las muestras y sin enzima retrotranscriptasa).

La utilización de SLOs para la RT de miARNs fue previamente descripta (Chen et al., 2005) y utilizada extensamente en nuestro laboratorio (Berardino et al., 2017, 2019). La mezcla de SLOs contiene los oligonucleótidos específicos para los miARNs seleccionados previamente y un *primer* específico para la retrotranscripción del ARN nuclear pequeño U6, utilizado como gen de referencia en la reacción de qPCR (*Materiales y Métodos 3.4.2*). Las secuencias de SLOs específicos para cada miARN se diseñaron manualmente (**Tabla 2**). Los SLOs son oligonucleótidos de 50 bases que forman un bucle por apareamiento intramolecular, dejando un extremo 3' protruyente de 6 bases como simple cadena. Estas últimas 6 bases hacia el 3' del SLO se diseñan de forma tal que aparen con el miARN específico, que se usa como molde para la retrotranscripción, en la cual se alarga el SLO en base a la secuencia de ese miARN. Luego, para la qPCR, se usa un *primer Forward* (F) que presenta parte de la secuencia del miARN, más otras bases para dar estabilidad, y un *primer Reverse* (R) que es universal para todos los miARNs medidos y que aparea en la región del bucle del SLO.

Tabla 2 | Secuencia de *stem-loop oligos* (SLOs) utilizados para la retrotranscripción de miARNs específicos y U6 en muestras de sangre.

Gen	Secuencia del SLO
hsa-miR-221-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC GAAACC
hsa-miR-222-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC ACCCAG
hsa-miR-125b-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC TCACAA
hsa-miR-342-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC ACGGGT
hsa-miR-22-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC ACAGTT
hsa-mir-125a-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC TCAAG
hsa-let-7i-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC ACAGC
hsa-let-7e-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC AACTAT
U6	AACGCTTCACGAATTGCGT
Oligonucleótido dT	TTTTTTTTTTTTTTTT

3.4.2. PCR en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR se hicieron por separado para cada par de *primers*. De forma general cada una llevó 1,25 µl de buffer de reacción 5X (*INBIO Highway*), 0,25 µl de mezcla de dNTPs 10 mM cada uno, 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de mezcla de *primers Forward* (F) y *Reverse* (R) 5 µM cada uno, 0,1 µl de enzima Taq polimerasa (*INBIO Highway*), 0,0125 µl de SYBR Green (*ThermoFisher Scientific*). La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 12,5 µl con agua ultrapura. La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo QuantStudio 3 (*Applied Biosystems*) y consistió de los siguientes pasos: desnaturización inicial a 95 °C por 10 min, desnaturización a 95 °C por 15 s, hibridización a 63 °C por 20 s, síntesis a 72 °C por 25 s (estos últimos 3 pasos se repitieron por 40 ciclos), y curva de fusión (temperatura descendiente desde 95 °C hasta 60 °C de a 1,6 °C y luego un aumento de la temperatura de a 0,15 °C hasta 95 °C y medición de la fluorescencia en cada punto).

Tanto los *primers* utilizados para la medición de miARNs como para la medición del ARN pequeño nuclear U6, se detallan en la **Tabla 3**. Todos los pares de *primers* fueron puestos a punto en cuanto a la dilución de cADN. Se utilizaron diluciones de 1/5, 1/10 y 1/20 para las mediciones

de los diferentes miARNs. Cada muestra fue analizada por duplicado para cada miARN medido. Se utilizó U6 como gen de referencia para relativizar la expresión. No fue posible poner a punto el mir-125b-5p, por lo cual no fue medido en las muestras. El protocolo completo está basado en trabajos previos del laboratorio (Berardino et al., 2017, 2019).

Tabla 3 | Secuencias de *primers* F y R diseñados y utilizados para qPCRs de miARNs específicos y U6 en muestras de sangre.

Gen	Secuencia de <i>primers</i>
hsa-miR-221-3p F	GGCGGAGCTACATTGTCTGC
hsa-miR-222-3p F	GGCGGGCTACATCTGGCT
hsa-miR-125b-5p F	GGCGGTCCCTGAGACCCTAA
hsa-miR-342-3p F	GGCGGTCTCACACAGAAATC
hsa-miR-22-3p F	GGCGGAAGCTGCCAGTTGAA
hsa-mir-125a-5p F	GGCGGTCCCTGAGACCCTTA
hsa-let-7i-5p F	GGCGGTGAGGTAGTAGTTTG
hsa-let-7e-5p F	GGCGGTGAGGTAGGAGGTTG
U6 - F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 - R	AACGCTTCACGAATTGCGT
R universal	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT

3.5. Identificación de miARNs diferencialmente expresados

Una vez realizadas las reacciones de qPCR se exportaron los datos de fluorescencia de todas las muestras a la página LinReg (<https://www.gear-genomics.com/rdml-tools/linregpcr.html>), donde se estima mediante una regresión lineal el número de moléculas de molde de cADN correspondiente a cada miARN en cada una de las muestras.

Luego se realizó para la expresión de cada miARN un modelo lineal ajustado a una distribución Gamma. Una vez verificado el cumplimiento de los supuestos se analizó la significancia de la diferencia de expresión entre los grupos.

Se realizó un análisis de correlación entre los distintos miARNs para evaluar la información aportada por cada uno de ellos a la variabilidad de expresión entre grupos. Para ello se utilizó el paquete cor de la librería corrplot de R y se calcularon los coeficientes de correlación. Luego se realizó un clustering jerárquico con los miARNs para evaluar si el conjunto de expresión de mARNs podía separar a las muestras en los grupos Control y RTT en función de la expresión.

3.6. Construcción de curva ROC

Se construyó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para evaluar la capacidad diagnóstica de la expresión del miR-22-3p. Se utilizó la función roc() de la biblioteca pROC de R para generar y analizar la curva ROC. Se evaluó el área bajo la curva (AUC) para cuantificar la capacidad predictiva del miR-22-3p, y se determinaron el punto de corte óptimo, así como los valores de sensibilidad y especificidad correspondientes.

3.7. Determinación de asociaciones entre la expresión de miARNs y la severidad de las manifestaciones clínicas

Se analizó la presencia de asociaciones entre la expresión de miARNs en sangre en el grupo RTT con la severidad de las manifestaciones de la enfermedad. Para ello, se realizó una correlación entre la expresión de cada uno de los miARNs en relación con el *score* CSS resultante para cada paciente utilizando un modelo lineal.

Además se realizaron correlaciones de la expresión de los miARNs con los distintos síntomas que componen al CSS. Para ello se aplicó un modelo ordinal ya que cada variable posee categorías ordenadas (valores discretos de 0 a 3). Se utilizó la función polr() del paquete MASS de R. En ambos casos se calcularon los coeficientes de correlación y su significancia.

3.8. Predicción del tamaño muestral

Con el objetivo de establecer el tamaño muestral ideal para futuras mediciones de miARNs del proyecto que enmarca esta Tesis de Licenciatura, se realizó una simulación en RStudio. La misma consistió en generar los modelos hipotéticos para tamaños muestrales (N) de 5 a 100 con saltos de 5 unidades para un modelo balanceado con 1.000 iteraciones por cada N. A partir de los 1.000 valores de p-valor por N se calculó la proporción de ellos que resultaron significativos. La simulación se realizó con los parámetros de distribución Gamma obtenidos de las mediciones experimentales de expresión de los miARNs.

4. Resultados

4.1. Selección de miARNs

A partir de búsqueda bibliográfica se seleccionaron 7 bases de datos de secuenciación de miARNs en modelos murinos con modificación en la expresión de *Mecp2*. Con el conjunto de bases se realizó un filtrado de miARNs según los criterios de *Materiales y Métodos 3.2*. Para la selección de miARNs se realizaron diagramas de Venn de la intersección de 3 bases de datos distintas y con miARNs que respetaran el mismo sentido de cambio (**Figura 3A, 3B, 3C**). Posteriormente se seleccionaron de las listas obtenidas, aquellos que tuvieran un cambio de al menos 1,5 veces. Finalmente se seleccionaron 8 miARNs candidatos para la medición de su expresión en sangre y con potencial de ser asociados al síndrome de Rett: 4 de ellos mostraron una regulación negativa en Rett, y 4, una regulación positiva (**Figura 3D**). Se muestra la secuencia de cada uno de ellos en la **Tabla 4**.

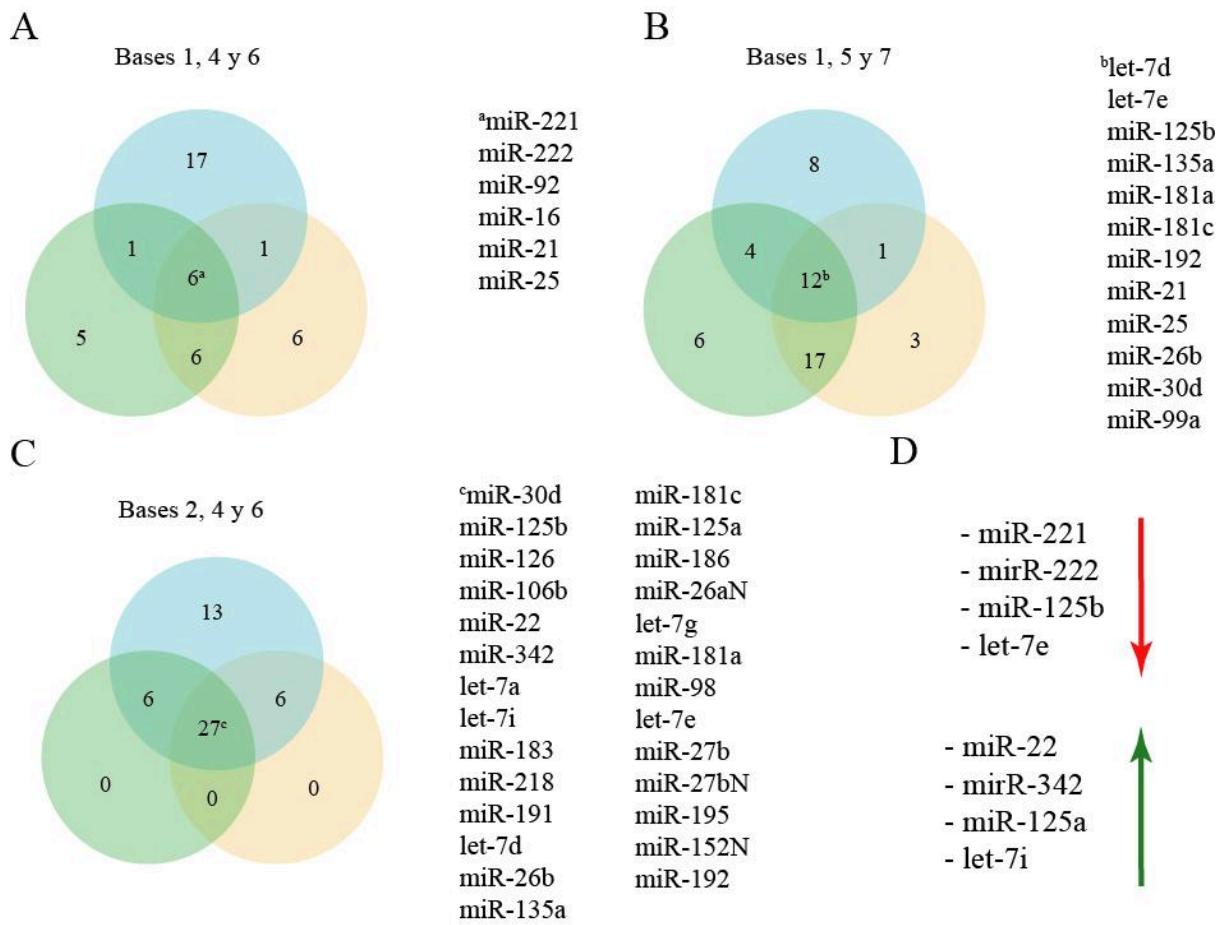


Figura 3 | Diagramas de Venn de presencia de miARNs en las distintas bases de datos utilizadas. **A**, miARNs subexpresados presentes en las bases 1, 4 y 6. **B**, miARNs subexpresados presentes en las bases 1, 5 y 7. **C**, miARNs sobreexpresados presentes en las bases 2, 4 y 6. **D**, Listado de miARNs seleccionados, indicando su sentido de cambio en las bases de datos analizadas.

Tabla 4 | Secuencias de los miARNs seleccionados del análisis bibliográfico como candidatos para la medición de su expresión en sangre. Resaltada en rojo se muestra la región semilla de cada miARN.

miARN	Secuencia en <i>Homo sapiens</i>	Secuencia en <i>Mus musculus</i>
hsa/mmu-miR-221-3p	A <ins>GUAC</ins> AUUGUCUGCUGGGUUUC	A <ins>GUAC</ins> AUUGUCUGCUGGGUUUC
hsa/mmu-miR-222-3p	A <ins>GUAC</ins> AUCUGGCUACUGGU	A <ins>GUAC</ins> AUCUGGCUACUGGU
hsa/mmu-miR-125b-5p	U <ins>CCCUGA</ins> GACCCUAACUUGUGA	U <ins>CCCUGA</ins> GACCCUAACUUGUGA
hsa/mmu-miR-342-3p	U <ins>CUCACA</ins> CAGAAAUCGCACCGU	U <ins>CUCACA</ins> CAGAAAUCGCACCGU
hsa/mmu-miR-22-3p	AAG <ins>CUGC</ins> CAGUUGAAGAACUGU	AAG <ins>CUGC</ins> CAGUUGAAGAACUGU
hsa/mmu-mir-125a-5p	U <ins>CCCUGA</ins> GACCCUUUAACCUGUGA	U <ins>CCCUGA</ins> GACCCUUUAACCUGUGA
hsa/mmu-let-7i-5p	U <ins>GAGGU</ins> A GUAGUUUGUGCUGUU	U <ins>GAGGU</ins> A GUAGUUUGUGCUGUU
hsa/mmu-let-7e-5p	U <ins>GAGGU</ins> A GGAGGUUGUAUAGUU	U <ins>GAGGU</ins> AGGAGGUUGUAUAGUU

Todas las regiones semilla de los miARNs seleccionados se conservan entre humano y ratón. Además, las secuencias completas de cada miARN, con la excepción de las últimas 2 bases del mmu-miR-222-3p, también se conservan. Por otro lado, los miR-221-3p y miR-222-3p pertenecen al mismo clúster por lo que es esperable que su regulación sea similar. Los miR-221-3p, miR-222-3p, miR-125b-5p, miR-22-3p, mir-125a-5p, let-7i-5p y let-7e-5p se encuentran ampliamente conservados en la mayoría de los vertebrados. El miR-342-3p se conserva en la mayoría de los mamíferos pero no en mamíferos placentarios. Por esta razón, el set de los 8 miARNs seleccionados en base a resultados reportados en modelos murinos fueron utilizados para su identificación en sangre humana.

Luego de seleccionar los miARNs candidatos para su posterior medición por RT-qPCR, se realizó la predicción de sus mARNs blanco mediante miRWalk 2.0, tomando los resultados predictivos de la interacción entre cuatro algoritmos (TarPmiR, TargetScan, miRDB y miRTarBase). Utilizando la lista de 158 mARNs blanco predichos, se realizó un análisis de

enriquecimiento de vías celulares de Reactome (**Tabla 5**) y de términos de ontología génica: Procesos Biológicos (**Tabla 6**), Funciones Moleculares (**Tabla 7**) y Componentes Celulares (**Tabla 8**), mediante el software DAVID . Se analizaron aquellos términos que, en el conjunto de genes involucrados, se encontraran significativamente regulados por el set de los 8 miARNs seleccionados. Los datos obtenidos permiten iluminar potenciales vías afectadas por la enfermedad, pero, sobre todo, validan el uso de este set de miARNs para su estudio como potenciales biomarcadores.

Tabla 5 | Vías celulares (Reactome) enriquecidas en base a la lista de mARNs potencialmente regulados por el set de 8 miARNs seleccionados.

ID	Nombre	p-valor ajust. (BH)	Nº de genes en la lista	Nº de genes en la categoría
109606	Vía intrínseca de apoptosis	< 0,0001	6	62
8939211	Señalización mediada por el receptor de estrógeno	0,0001	10	228
9018519	Expresión génica dependiente de estrógeno	0,0001	8	149
9006931	Señalización por receptores nucleares	0,0002	11	304
74160	Expresión génica	0,003	34	1891
9009391	Señalización de estrógeno extranuclear	0,0052	5	82
199418	Regulación negativa de la red PI3K/AKT	0,014	5	113
73857	Transcripción de ARN Polimerasa II	0,015	27	1651
109581	Apoptosis	0,025	6	189
2559583	Senescencia celular	0,033	6	206
211000	Silenciamiento génico por ARN	0,033	5	150
5257801	Muerte celular programada	0,044	6	228

Tabla 6 | Términos de Ontología Génica (Procesos Biológicos) enriquecidos en base a la lista de mARNs potencialmente regulados por el set de 8 miARNs seleccionados.

ID	Nombre	p-valor ajust. (BH)	Nº de genes en la lista	Nº de genes en la categoría
8284	Regulación positiva de la proliferación celular	< 0,0001	17	572
17148	Regulación negativa de la traducción	< 0,0001	7	95
35196	Procesamiento de miARNs	< 0,0001	5	24
45892	Regulación negativa de la transcripción	< 0,0001	18	649
71392	Respuesta celular al estradiol	< 0,0001	5	43
10506	Regulación de la autofagia	0,0005	6	82
6338	Remodelación de la cromatina	0,0009	9	235
6974	Respuesta celular al daño al ADN	0,001	10	305
7399	Desarrollo del sistema nervioso	0,001	11	375
82	Transición G1-S del ciclo celular mitótico	0,0015	5	78
381	Regulación del splicing alternativo	0,0017	5	79
6325	Organización de la cromatina	0,045	5	222

Tabla 7 | Términos de Ontología Génica (Funciones Moleculares) enriquecidos en base a la lista de mARNs potencialmente regulados por el set de 8 miARNs seleccionados.

ID	Nombre	p-valor ajust. (BH)	Nº de genes en la lista	Nº de genes en la categoría
4713	Actividad de proteína tirosin kinasa	< 0,0001	12	144
5158	Unión al receptor de insulina	< 0,0001	5	25
5161	Unión al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas	< 0,0001	5	21
35198	Unión a miARNs	< 0,0001	6	48
3677	Unión al ADN	0,0009	22	988
3730	Unión a al 3'-UTR del mARN	0,0033	9	263
140297	Unión del factor de transcripción de unión al ADN	0,0042	7	172

42803	Actividad de proteína de homodimerización	0,011	15	727
976	Unión a la región regulatoria <i>cis</i> de la transcripción	0,017	7	239
3729	Unión al mARN	0,017	7	235
3682	Unión a cromatina	0,02	10	453

Tabla 8 | Términos de Ontología Génica (Componentes Celulares) enriquecidos en base a la lista de mARNs potencialmente regulados por el set de 8 miARNs seleccionados.

ID	Nombre	p-valor ajust. (BH)	Nº de genes en la lista	Nº de genes en la categoría
5844	Polisoma	< 0,0001	6	41
90575	Complejo regulador de la ARN Polimerasa II	< 0,0001	10	168
792	Heterocromatina	0,0008	5	51
932	P-body	0,0012	7	124
10494	Gránulos de estrés citoplasmáticos	0,008	5	98
5811	Gotas lipídicas	0,017	5	123
16363	Matriz nuclear	0,017	5	130
30672	Membrana de las vesículas sinápticas	0,02	5	140
139	Membrana del aparato de Golgi	0,04	13	756

Al realizar el enriquecimiento de vías celulares y de términos de ontología génica en su conjunto se observó que algunas de las principales vías enriquecidas fueron la proliferación celular y apoptosis, el desarrollo neuronal, vías relacionadas a la regulación de la transcripción y la remodelación de la cromatina. Estos resultados refuerzan la selección de los miARNs candidatos ya que representan algunas de las vías alteradas en el síndrome de Rett, en particular las relacionadas con el desarrollo neuronal y la regulación epigenética.

4.2. Extracción de ARN e integridad

Luego de realizar la extracción de las fracciones *Large* (ARNs de más de 200 nucleótidos de longitud) y *Small* (ARNs de menos de 200 nucleótidos de longitud) de ARN según se detalla en *Materiales y Métodos 3.3* se realizó un gel de agarosa para determinar la integridad y separación exitosa de las fracciones (**Figura 4**) para 6 muestras: 3 del grupo RTT y 3 del grupo Control. En las fracciones *Large* se observan las dos bandas correspondientes a los dos ARN ribosomales de mayor tamaño. Además, la intensidad de la banda de mayor peso es mayor a la banda de menor peso. Ambas observaciones permiten asegurar una correcta integridad del ARN luego de la extracción. A su vez se observa la separación entre ambas fracciones, con una leve contaminación de ARNs *Large* en algunas fracciones *Small* y la obtención de una banda de ARNs pequeños correspondiente a la fracción *Small*.

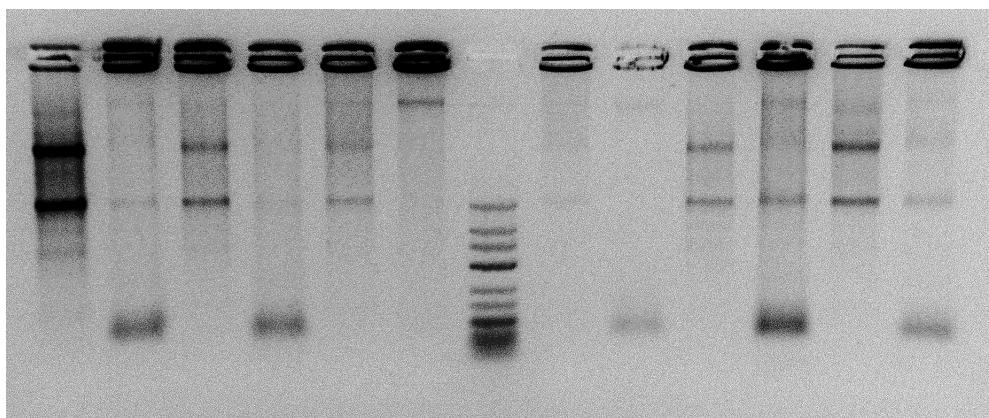


Figura 4 | Gel de agarosa de ARN para 6 muestras. Las calles corresponden a las fracciones *Large* y *Small* para cada muestra respectivamente de izquierda a derecha. La calle central corresponde al marcador de peso molecular.

Se midió la concentración de ARN con el equipo NanoDrop Lite Plus (*Thermo Scientific*) y se utilizó el coeficiente de absorbancia 260/280 como medida de pureza del mismo (**Tabla 9**).

Tabla 9 | Masa de ARN y coeficientes 260/280 promedios de todas las muestras para las fracciones *Large* y *Small*.

	<i>Large</i>	<i>Small</i>
Masa promedio (ng)	2008	4575
Coeficiente 260/280	1,8	1,76

4.3. Determinación de la expresión de miARNs seleccionados en sangre

Una vez verificada la integridad del ARN y la presencia de ARNs pequeños en dicha fracción se procedió a retrotranscribir la misma según *Materiales y Métodos 3.4.1*. Posteriormente se realizaron las qPCRs para los 8 miARN y U6. Se obtuvieron valores de expresión para 6 de los 8 miARNs seleccionados (Tabla 4) ya que el miARN mir-222-3p no pudo ser detectado en las muestras. Los valores de expresión de los miARNs fueron relativizados a los de U6 para cada una de las muestras (Figura 5).

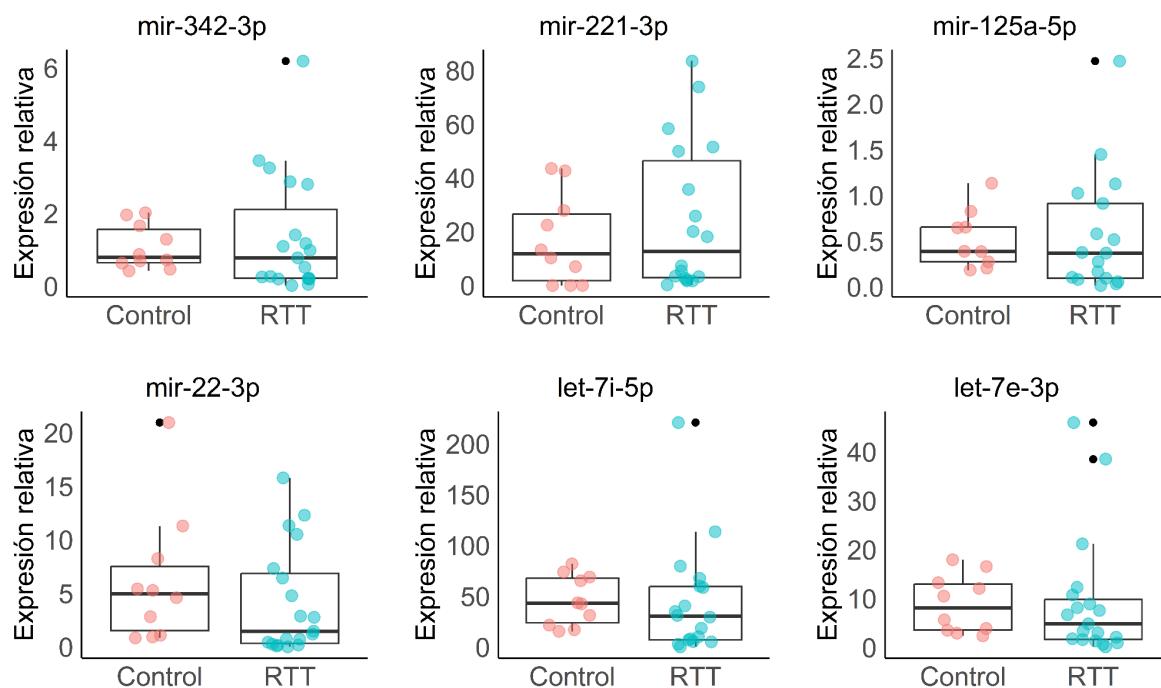


Figura 5 | Boxplot de la expresión de los miARNs mir-342-3p (A), mir-221-3p (B), mir-125a (C), mir-22-3p (D), let-7i-5p (E) y let-7e-5p (F) relativizada a la expresión de U6. Se grafica la media, los cuartiles Q1 y Q3 y el rango de dispersión de los datos. Los *outliers* se grafican coloreados en negro.

Los valores de expresión relativizadas a U6 se ajustaron a un modelo lineal con distribución Gamma y se analizó si existían diferencias de expresión para cada miARN entre ambos grupos. Ninguno de los miARNs evaluados presentó diferencias significativas. En la **Figura 6** se muestra la pendiente calculada por las predicciones del modelo para cada uno de los miARN. Esta pendiente informa la tasa de cambio del grupo RTT respecto al grupo Control.

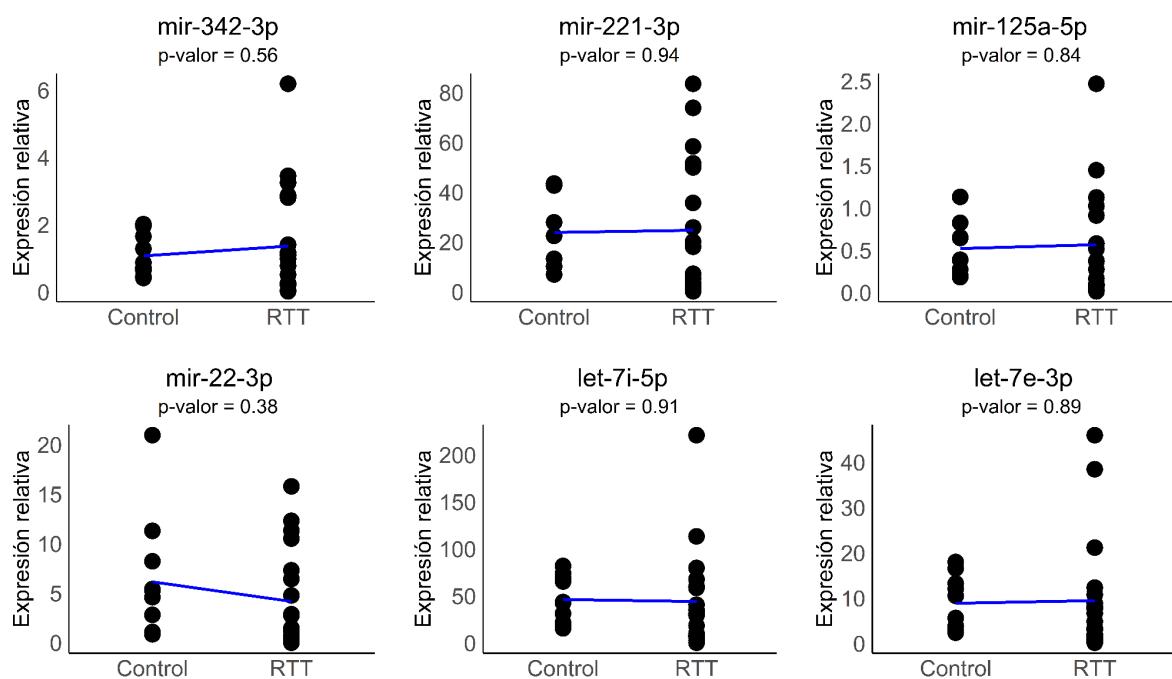


Figura 6 | Gráfico de las observaciones de expresión para cada grupo. La recta azul indica la pendiente estimada por el modelo.

Se realizó una correlación entre todos los miARNs para determinar la información aportada por cada uno de ellos (**Figura 7**). Se observó que el miARN let-7e, el mir-125a y el mir-221-3p tienen un alto coeficiente de correlación con el resto, es decir que no aportan información diferencial en la variación de los datos, por lo cual fueron excluidos del análisis a continuación.

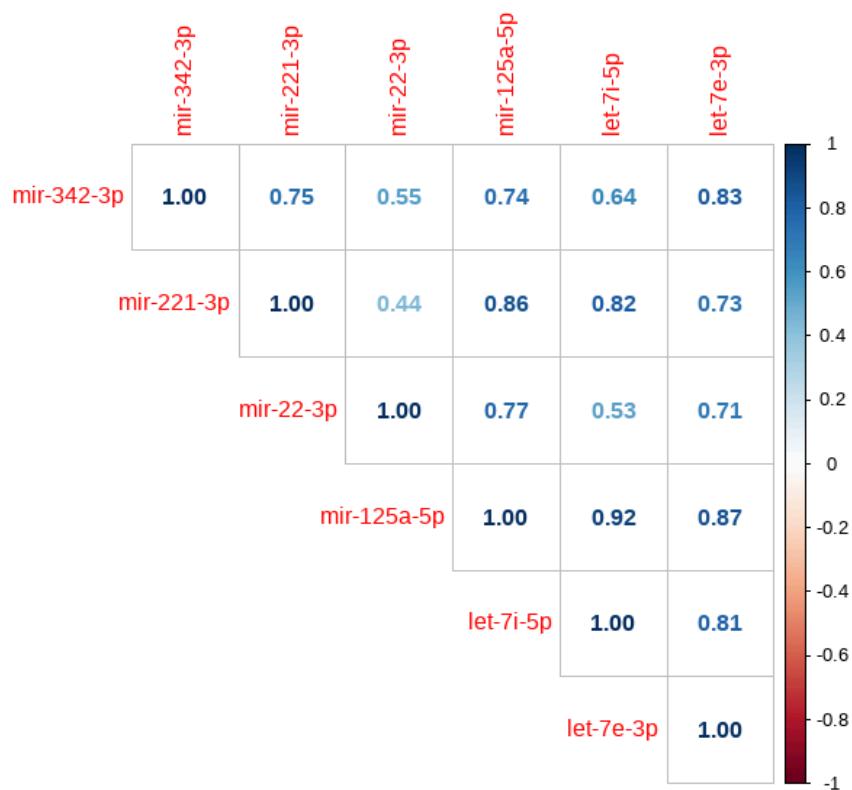


Figura 7 | Gráfico de correlaciones entre los distintos miARNs. Se muestran los coeficientes de correlación entre cada uno de ellos.

Con el objetivo de estudiar si un perfil de expresión de miARNs permite separar a ambos grupos, se realizó un *clustering* jerárquico (**Figura 8**) y se obtuvo un agrupamiento en dos clústers: uno de ellos integrado por 4 muestras Control y 12 RTT y otro integrado por 6 Control y 7 RTT. Es decir que el Clúster 1 agrupa al 63% de las muestras RTT y el Clúster 2 agrupa al 60% de las muestras Control.

Clustering Jerárquico

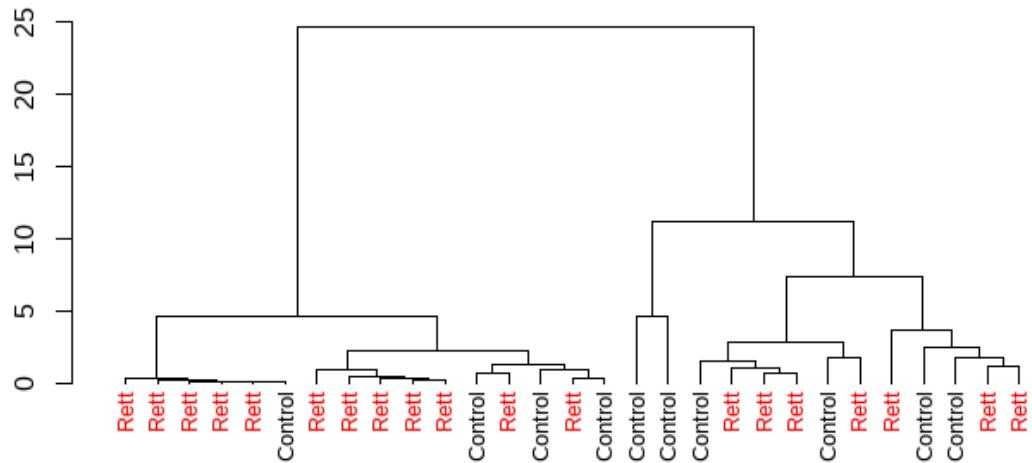


Figura 8 | Dendograma realizado por el método de *clustering* jerárquico. Se colorean en rojo las muestras correspondientes al grupo RTT y en negro al grupo Control. El eje y representa unidades arbitrarias de distancia.

4.4. Construcción de curva ROC

Si bien la diferencia en la expresión de cada miARN no fue significativa entre los grupos Control y RTT, los cambios de mayor magnitud entre grupos se observan en el mir-22-3p (p-valor = 0,38) (**Figura 6**). Por ello, se realizó un análisis de curva ROC para este miARN con el objetivo de evaluar su poder predictivo entre grupos (**Figura 9**). Se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,65, correspondiente a la capacidad predictiva de la expresión del mir-22-3p. Se obtuvo un punto de corte de 0,8, con una especificidad de 1 y una sensibilidad de 0,42. Esto significa que el 100% de los verdaderamente negativos, es decir los individuos del grupo Control, serán predichos como negativos y que sólo el 42% de los verdaderos positivos (individuos del grupo RTT) serán predichos como positivos. Lo deseable para un marcador sensible y específico es que el área bajo la curva sea mayor a 0,8, por lo que este miARN no sería un buen marcador.

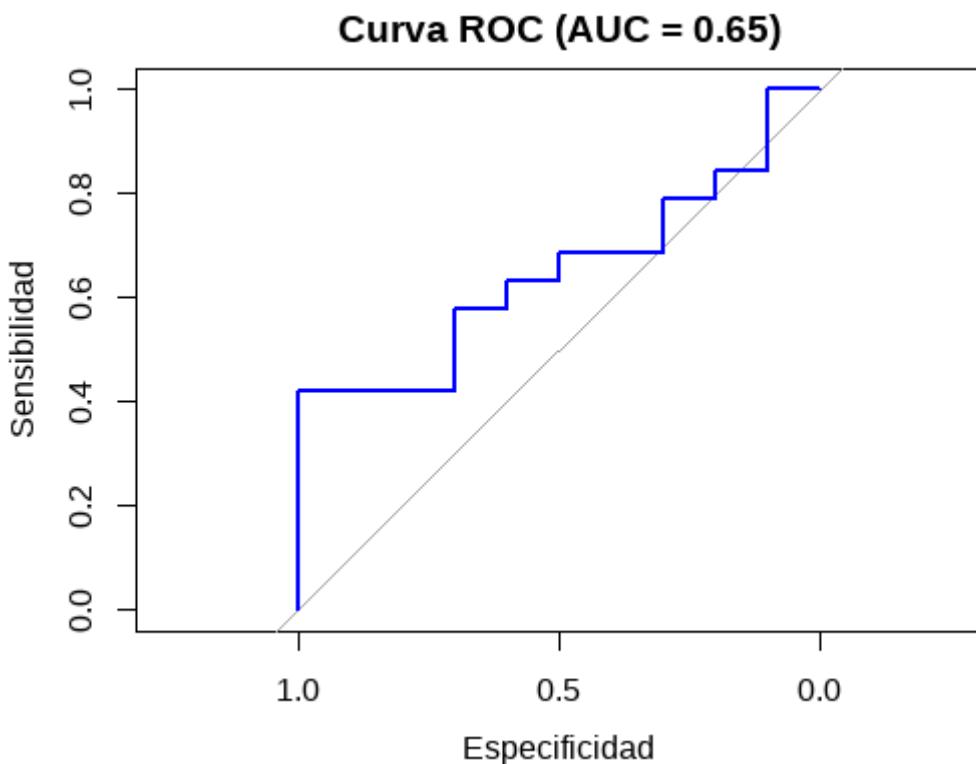


Figura 9 | Curva ROC realizada con miR-22-3p. Se grafica la sensibilidad en función de la especificidad del conjunto de miARNs. Área bajo la curva (AUC) = 0.65.

4.5. Determinación de asociaciones entre la expresión de miARNs y la severidad de las manifestaciones clínicas

Dado que no se encontraron miARNs diferencialmente expresados en las muestras de sangre del grupo RTT respecto a las del grupo Control, se decidió evaluar la posible correlación entre la expresión de los miRNAs y la severidad clínica de las pacientes RTT. Para esto se realizaron correlaciones entre la expresión relativa de los miARNs y el *score* de severidad clínica promedio reportada por los médicos de cada paciente (CSS). En la **Figura 10** se grafica la dispersión de puntos entre ambas variables junto con la línea de tendencia ajustada a los mismos. Se observa un patrón similar de distribución de los datos en todos los gráficos. Ninguna de las correlaciones resultó ser significativa.

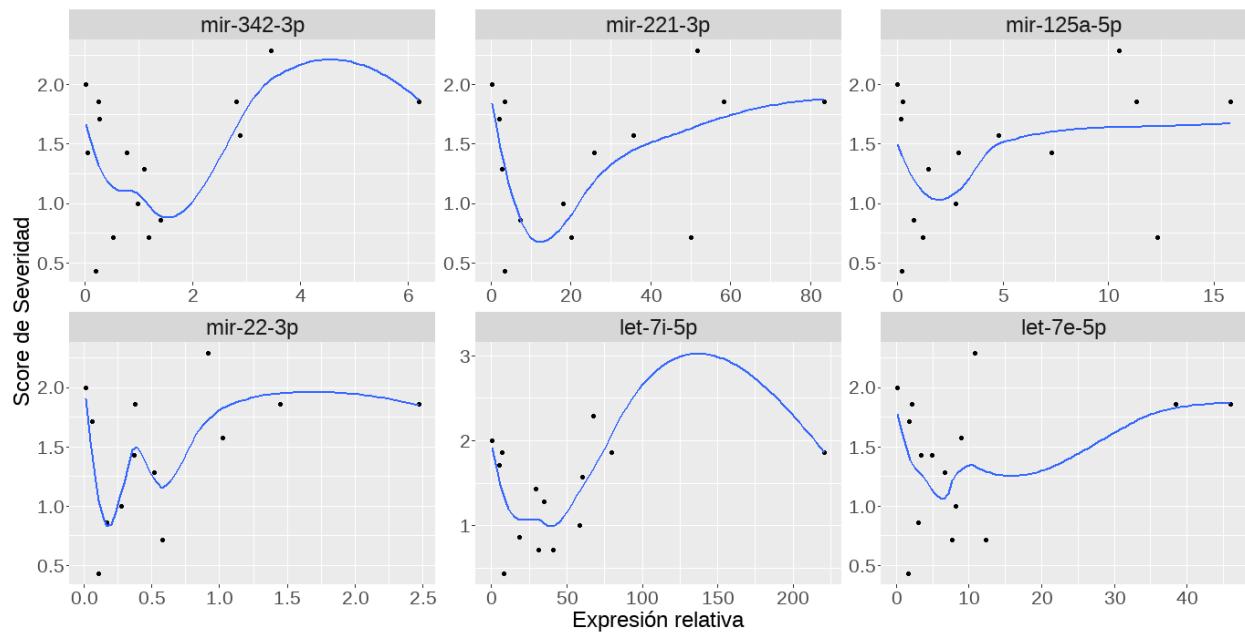


Figura 10 | Gráfico de correlaciones entre cada miARN y el *score* de severidad de las pacientes del grupo RTT. Se grafican las observaciones y la línea de tendencia.

Posteriormente se realizaron correlaciones entre la expresión de los miARNs y cada uno de los ítems de severidad que conforman el *score*: convulsiones, marcha, escoliosis, irregularidades respiratorias, uso de manos, sueño y lenguaje. Para ello se utilizó un modelo de regresión logística ordinal ya que los ítems mencionados previamente toman valores discretos de 0 a 3. En la **Tabla 10** se muestran los valores de OR (*Odds Ratio*) obtenidos para cada correlación y su intervalo de confianza. Estos valores representan la probabilidad de que un aumento en la severidad esté asociado a un aumento en la expresión del miARN. La significancia del OR requiere que el intervalo no incluya al 1 ya que esto significaría que la probabilidad de que haya una asociación o no es la misma.

Tabla 10 | Valores de OR e intervalos de confianza para las correlaciones entre los síntomas que conforman el *score* de severidad (CSS) y la expresión de los miARNs (y el promedio). Se marcan en asteriscos rojos las correlaciones significativas.

miARN	Convulsiones	Marcha	Escoliosis	Irregularidades respiratorias	Uso de manos	Sueño	Lenguaje
mir-342-3p	1,398 (0,781 - 2,768)	1,714 (0,89 - 4,342)	1,828 * (1,018 - 3,699)	1,198 (0,562 - 2,455)	1,059 (0,623 - 1,869)	1,211 (0,675 - 2,255)	0,914 (0,466 - 1,867)
mir-221-3p	1,017 (0,978 - 1,061)	1,017 (0,975 - 1,064)	1,024 (0,986 - 1,069)	0,999 (0,947 - 1,045)	1,024 (0,984 - 1,072)	1,003 (0,963 - 1,044)	1,007 (0,963 - 1,059)
mir-22-3p	1,091 (0,899 - 1,353)	1,1 (0,892 - 1,384)	1,127 (0,93 - 1,377)	0,979 (0,74 - 1,216)	1,074 (0,903 - 1,301)	1,013 (0,835 - 1,229)	1,077 (0,87 - 1,418)
mir-125a-5p	2,259 (0,507 - 13,105)	4,038 (0,681 - 64,351)	1,882 (0,474 - 9,346)	0,806 (0,069 - 4,523)	2,941 (0,557 - 25,266)	1,626 (0,349 - 8,759)	1,932 (0,331 - 25,794)
let-7e-3p	1,021 (0,952 - 1,1)	1,069 (0,984 - 1,232)	1,042 (0,973 - 1,119)	0,95 (0,739 - 1,059)	1,018 (0,95 - 1,1)	1,027 (0,955 - 1,112)	1,086 (0,968 - 1,439)
let-7i-5p	1,008 (0,991 - 1,029)	1,012 (0,992 - 1,045)	1,005 (0,989 - 1,023)	0,995 (0,957 - 1,016)	1,012 (0,992 - 1,043)	1,003 (0,984 - 1,023)	1,009 (0,987 - 1,049)
Promedio	1,02 (0,964 - 1,09)	1,04 (0,970 - 1,13)	1,03 (0,974 - 1,10)	0,988 (0,885 - 1,06)	1,03 (0,963 - 1,11)	1,01 (0,953 - 1,08)	1,02 (0,952 - 1,14)

En general, no se observaron correlaciones significativas entre los ítems individuales del CSS y la expresión de los miARNs por separado ni su promedio de expresión. La excepción fue una correlación significativa entre la expresión del mir-342-3p y el ítem que evalúa la escoliosis. Este resultado muestra que un aumento en la expresión de este miARN está asociado a un aumento en la probabilidad de presentar un *score* mayor para la escoliosis.

4.6. Determinación del tamaño muestral necesario

Considerando los resultados previamente mencionados y el tamaño muestral reducido con el que se contó para la realización de las mediciones, se analizó si un aumento en el tamaño muestral permitiría ver diferencias entre los grupos analizados. Se realizó una simulación en RStudio para calcular el tamaño muestral (N) que sería necesario para observar diferencias significativas de expresión entre los grupos Control y RTT en caso de haberlas. En la **Figura 11** se grafica la proporción de p-valores significativos (p-valores < 0,05) obtenida para los distintos valores de N de 5 a 100. Los miARNs mir-342-3p y mir-125a-5p presentaron mayores proporciones de p-valores significativos para un N = 100 que el resto de los miARNs. Sin embargo, una proporción entre 0,2 y 0,25 implica una baja probabilidad de encontrar un efecto entre grupos.

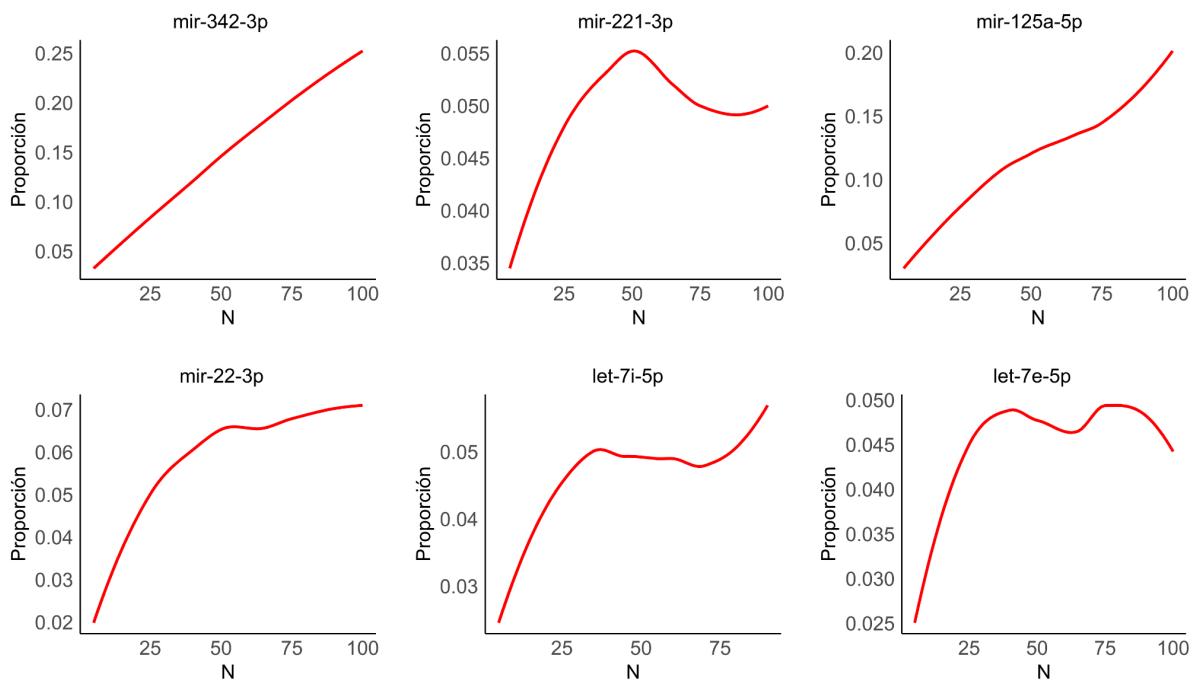


Figura 11 | Simulación del tamaño muestral necesario. Se grafica la proporción de p-valores significativos en función del tamaño muestral para 1.000 iteraciones por N.

5. Discusión y Conclusión

A lo largo de este trabajo se estudiaron distintos aspectos sobre la expresión diferencial de miARNs en niñas diagnosticadas con síndrome de Rett. Como se describió en la *Introducción*, este síndrome es actualmente una patología de difícil diagnóstico, tanto desde el punto de vista clínico, por el solapamiento de síntomas con otras patologías, como desde lo económico (Neul et al., 2010). Los análisis genéticos que confirman su diagnóstico son altamente costosos y por ende de difícil acceso particular. Es por esto que el acceso a los análisis genéticos suele ser a través de las obras sociales, que para asegurar su cobertura requieren de múltiples requisitos de sintomatología clínica probados. Esta dificultad se ve a su vez, asociada al malestar emocional y económico generados por una “odisea diagnóstica” en busca de un diagnóstico certero, que en la mayoría de los casos se extiende varios años.

El estudio de expresión diferencial de miARNs representa un campo emergente en la investigación biomédica para múltiples enfermedades. Investigaciones recientes han demostrado que los miARNs circulantes pueden ofrecer una oportunidad no invasiva para el diagnóstico temprano de diversas patologías (Lawrie et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Sin embargo existen grandes desafíos en la extrapolación de resultados de algunos tejidos, como el cerebral, a muestras periféricas como la sangre.

Uno de los aspectos cruciales en la búsqueda de biomarcadores para la detección temprana de enfermedades es la reproducibilidad de los resultados ya que los cambios en las concentraciones de biomarcadores generalmente no son altos en estas etapas. Se ha estudiado que la variabilidad de las pruebas de miARNs en matrices, es decir, tomando en cuenta la expresión de varias de estas moléculas a la vez, es significativamente mayor que la de los miARNs individuales, lo que puede dificultar la confirmación de los datos obtenidos por diferentes técnicas. Además, los niveles de miARNs detectables en fluidos corporales por matrices es menor que la detectada por RT-qPCR individual, lo que también puede afectar la selección de biomarcadores potenciales. Esto resalta la importancia de la validación de los posibles biomarcadores seleccionados por análisis de matrices mediante RT-qPCR (Sheinerman & Umansky, 2013).

Con el objetivo de hallar posibles biomarcadores para la detección rápida y precisa del síndrome de Rett se evaluó la expresión de los miARNs mir-342-3p, mir-221-3p, mir-125a-5p,

mir-22-3p, let-7i-5p y let-7e-5p. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Control y RTT (**Figura 6**), esto podría relacionarse a la selección de miARNs efectuada. Las bases de datos utilizadas para la selección de miARNs candidatos se correspondían con análisis de expresión realizados tanto a partir de tejido cerebral de ratones como de cultivo celular de neuronas. Los cambios observados en estos trabajos podrían no reproducirse en un tejido periférico como lo es la sangre (Sheinerman & Umansky, 2013). Sin embargo, hasta la fecha no se registran trabajos publicados con análisis de miARNs en sangre de pacientes con síndrome de Rett, por lo cual resulta indispensable continuar el análisis de la expresión de diferentes miARNs. Esta propuesta constituye uno de los objetivos del proyecto en el que se enmarca esta Tesis de Licenciatura y proyecta su realización a través de una secuenciación masiva de miARNs (miRNA-seq) que permita analizar un cambio global en el perfil de expresión. Un posible análisis a futuro sería evaluar la expresión de los diferentes miARNs mencionados en este trabajo provenientes de la purificación de vesículas extracelulares en el plasma de pacientes. Este enfoque permitiría obtener vesículas derivadas de neuronas y de esta manera conocer tanto el entorno celular neuronal como la comunicación con otros tejidos. Este estudio podría constituir una herramienta fundamental para la comprensión de los mecanismos del síndrome de Rett y sus síntomas asociados.

El *clustering* jerárquico permitió separar parcialmente a los grupos RTT y Control (**Figura 8**) luego de excluir del análisis aquellos miARNs con una alta correlación con el resto (**Figura 7**). Esto indicaría que si bien la variabilidad entre grupos no fue explicada por la expresión de miARNs (**Figura 6**) algunos de ellos, como el mir-125a, el let-7e-5p y el mir-221-3p explican la misma variabilidad entre los grupos. Esta observación resulta relevante considerando que, si bien en el presente trabajo sólo se evaluaron 8 miARNs, MeCP2 es una proteína relacionada con la regulación de la transcripción de ADN metilado a nivel global, con lo cual se esperaría que una mutación como las mencionadas previamente genere una desregulación de todo el perfil de expresión de miARNs.

Se buscó estudiar si existe una correlación entre la severidad clínica de las manifestaciones del síndrome con la expresión de alguno de los miARNs o con la expresión del conjunto de ellos. Este análisis resulta interesante ya que los distintos miARNs se encuentran asociados a distintas vías moleculares y celulares cuya desregulación podría vincularse a algunos síntomas pero no a otros.

Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre la severidad clínica y la expresión medida.

A lo largo de este trabajo se utilizaron los datos de expresión de miARNs relativizados a U6 medidos por RT-qPCR. Se observó una amplia variabilidad de los datos, particularmente en el grupo RTT. Esto podría deberse al número reducido de muestras por tratamiento: 9 para el grupo Control y 19 para el grupo RTT. Por un lado, la dificultad en obtener muestras del grupo Control radica en el rango de edad establecido para el estudio, ya que al ser niñas en su mayoría, menores de edad, resulta difícil una participación voluntaria de extracción de sangre. Por otro lado, al tratarse de una EPOF, existe un número reducido de casos en el país. Sumado a esto, se estima que el síndrome de Rett se encuentra subdiagnosticado en Argentina ya que el número de casos registrados es menor al esperado según la incidencia calculada (Taruscio et al., 2014). Otro de los factores que influye en la obtención de un mayor número de muestras es el acceso al contacto con las pacientes. Este trabajo se llevó a cabo con la colaboración de la Fundación SinRett que proporcionó un listado de familias dispuestas a participar del estudio luego de haber sido informadas sobre los requerimientos y el desarrollo del mismo. Si bien la Fundación nuclea múltiples familias del país con pacientes que poseen este síndrome, aún hay familias que no se encuentran en contacto con la misma y por ende no es posible su contacto con el grupo de investigación.

Las simulaciones realizadas acerca del tamaño muestral necesario indicarían que aún aumentando el N hasta 100 no se conseguirían ver diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los miARNs ya que se obtuvieron proporciones de p-valores significativos muy pequeñas (**Figura 11**). Por un lado, estos resultados refuerzan los obtenidos previamente acerca de las diferencias de expresión entre grupos; por otro lado predicen que aumentar el N no modificaría sustancialmente los resultados obtenidos. Sin embargo, esta simulación fue realizada para un modelo balanceado con un N creciente y utilizando los parámetros de distribución Gamma de los modelos obtenidos para cada miARN. De realizarse nuevamente una medición de miARNs de manera balanceada y con un N mayor, los parámetros podrían verse afectados, modificando, por ejemplo, la dispersión de los datos.

El objetivo 3 de esta Tesis (*Objetivos e Hipótesis 2.2*) no se realizó ya que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los miARNs entre los grupos Control y RTT. Sin

embargo se obtuvieron predicciones de mARNs blanco para el conjunto de miARNs asociados a términos de ontología génica (Procesos Biológicos, Funciones Moleculares y Componentes Celulares) (**Tablas 5, 6, 7 y 8**) que constituyen un prometedor resultado preliminar para futuros experimentos.

En conclusión, si bien este estudio no reveló diferencias significativas en la expresión de miARNs en pacientes con el síndrome de Rett, la exploración de nuevos enfoques como la purificación de vesículas extracelulares y la secuenciación masiva miARNs (miRNA-seq) podría ofrecer nuevas perspectivas sobre los mecanismos subyacentes de esta enfermedad y sus síntomas asociados. Además, en nuestro conocimiento, esta Tesis constituye uno de los primeros reportes sobre la medición de miARNs como potenciales biomarcadores tempranos de RTT, por lo que abre una línea de investigación con amplia perspectiva.

La colaboración con la Fundación SinRett fue fundamental para este estudio, aunque los desafíos en la obtención de muestras y el acceso limitado al contacto con pacientes subrayan la necesidad de una mayor extensión de la población de estudio para avanzar en la investigación.

Mientras se continúa explorando la complejidad de los miARNs como biomarcadores en el síndrome de Rett, estos esfuerzos representan un paso crucial hacia diagnósticos más rápidos y precisos, con el potencial de mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes y sus familias.

6. Referencias bibliográficas

Ammanuel, S., Chan, W. C., Adler, D. A., Lakshamanan, B. M., Gupta, S. S., Ewen, J. B., Johnston, M. V., Marcus, C. L., Naidu, S., & Kadam, S. D. (2015). Heightened Delta Power during Slow-Wave-Sleep in Patients with Rett Syndrome Associated with Poor Sleep Efficiency. *PLoS One*, 10(10), e0138113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138113>

Banerjee, A., Miller, M. T., Li, K., Sur, M., & Kaufmann, W. E. (2019). Towards a better diagnosis and treatment of Rett syndrome: A model synaptic disorder. *Brain*, 142(2), 239-248. <https://doi.org/10.1093/brain/awy323>

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

Berardino, B. G., Chertoff, M., Gianatiempo, O., Alberca, C. D., Priegue, R., Fiszbein, A., Long, P., Corfas, G., & Cánepa, E. T. (2019). Exposure to enriched environment rescues anxiety-like behavior and miRNA deregulated expression induced by perinatal malnutrition while altering oligodendrocyte morphology. *Neuroscience*, 408, 115-134. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.027>

Berardino, B. G., Fesser, E. A., & Cánepa, E. T. (2017). Perinatal protein malnutrition alters expression of miRNA biogenesis genes Xpo5 and Ago2 in mice brain. *Neuroscience Letters*, 647, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.03.012>

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366. <https://doi.org/10.1038/35053110>

Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(2), 185-191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>

Bredy, T. W., Lin, Q., Wei, W., Baker-Andresen, D., & Mattick, J. S. (2011). MicroRNA regulation of neural plasticity and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(1), 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.04.004>

Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(12), 1957-1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>

Carney, R. M., Wolpert, C. M., Ravan, S. A., Shahbazian, M., Ashley-Koch, A., Cuccaro, M. L., Vance, J. M., & Pericak-Vance, M. A. (2003). Identification of MeCP2 mutations in a series of females with

autistic disorder. *Pediatric Neurology*, 28(3), 205-211.
[https://doi.org/10.1016/s0887-8994\(02\)00624-0](https://doi.org/10.1016/s0887-8994(02)00624-0)

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>

Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>

Cheng, T.-L., Wang, Z., Liao, Q., Zhu, Y., Zhou, W.-H., Xu, W., & Qiu, Z. (2014). MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex. *Developmental Cell*, 28(5), 547-560. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.032>

Chiang, H. R., Schoenfeld, L. W., Ruby, J. G., Auyeung, V. C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W. K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J. E., Blelloch, R., Schrot, G. P., Nusbaum, C., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs: Experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & Development*, 24(10), 992-1009. <https://doi.org/10.1101/gad.1884710>

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics*, 9(2), 102-114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>

Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S. W., Kim, T.-K., Greenberg, M. E., & Schratt, G. (2009). Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *The EMBO Journal*, 28(6), 697-710. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.10>

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>

Fu, C., Armstrong, D., Marsh, E., Lieberman, D., Motil, K., Witt, R., Standridge, S., Nues, P., Lane, J., Dinkel, T., Coenraads, M., von Hehn, J., Jones, M., Hale, K., Suter, B., Glaze, D., Neul, J., Percy, A., & Benke, T. (2020). Consensus guidelines on managing Rett syndrome across the lifespan. *BMJ Paediatrics Open*, 4(1), e000717. <https://doi.org/10.1136/bmjpo-2020-000717>

Gold, W. A., Krishnaraj, R., Ellaway, C., & Christodoulou, J. (2018). Rett Syndrome: A Genetic Update and Clinical Review Focusing on Comorbidities. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(2), 167-176. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00346>

Good, K. V., Vincent, J. B., & Ausi  , J. (2021). MeCP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics. *Frontiers in Genetics*, 12, 620859. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.620859>

Gregory, R. I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235-240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>

Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23-34. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00431-7)

Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P. N., & Kay, M. A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell*, 151(4), 900-911. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.042>

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>

Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1146-1150. <https://doi.org/10.1126/science.1064023>

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., & Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), 887-901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>

Hazari, V., Samali, S. A., Izadpanahi, P., Mollaei, H., Sadri, F., & Rezaei, Z. (2024). MicroRNA-98: The multifaceted regulator in human cancer progression and therapy. *Cancer Cell International*, 24(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03386-2>

Horvath, P. M., Piazza, M. K., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2022). MeCP2 loss-of-function dysregulates microRNAs regionally and disrupts excitatory/inhibitory synaptic transmission balance. *Hippocampus*, 32(8), 610-623. <https://doi.org/10.1002/hipo.23455>

Hu, H. Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y. H., Chen, W., & Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics*, 10, 413. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-413>

Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99-110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>

Ip, J. P. K., Mellios, N., & Sur, M. (2018). Rett syndrome: Insights into genetic, molecular and circuit mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(6), 368-382. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0006-3>

Jiang, Y., Langley, B., Lubin, F. D., Renthal, W., Wood, M. A., Yasui, D. H., Kumar, A., Nestler, E. J., Akbarian, S., & Beckel-Mitchener, A. C. (2008). Epigenetics in the nervous system. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(46), 11753-11759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3797-08.2008>

Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 368-376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>

Kim, D. H., Saetrom, P., Snøve, O., & Rossi, J. J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), 16230-16235. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808830105>

Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2), 126-139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>

Kyle, S. M., Vashi, N., & Justice, M. J. (2018). Rett syndrome: A neurological disorder with metabolic components. *Open Biology*, 8(2), 170216. <https://doi.org/10.1098/rsob.170216>

Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Banham, A. H., Pezzella, F., Boultwood, J., Wainscoat, J. S., Hatton, C. S. R., & Harris, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 141(5), 672-675. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x>

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17), 4663-4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>

Leonard, H., Cobb, S., & Downs, J. (2017). Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome.

Nature Reviews. Neurology, 13(1), 37-51. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.186>

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), 95-98. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>

Lyst, M. J., & Bird, A. (2015). Rett syndrome: A complex disorder with simple roots. *Nature Reviews. Genetics*, 16(5), 261-275. <https://doi.org/10.1038/nrg3897>

Ma, H., Wu, Y., Choi, J.-G., & Wu, H. (2013). Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20687-20692. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311639110>

Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. (2000). Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 649-711. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.649>

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4), 607-620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044>

McNeill, E., & Van Vactor, D. (2012). MicroRNAs shape the neuronal landscape. *Neuron*, 75(3), 363-379. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.07.005>

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell*, 15(2), 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.07.007>

Mellios, N., Feldman, D. A., Sheridan, S. D., Ip, J. P. K., Kwok, S., Amoah, S. K., Rosen, B., Rodriguez, B. A., Crawford, B., Swaminathan, R., Chou, S., Li, Y., Ziats, M., Ernst, C., Jaenisch, R., Haggarty, S. J., & Sur, M. (2018). MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling. *Molecular Psychiatry*, 23(4), 1051-1065. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.86>

Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513-10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>

Neul, J. L., Kaufmann, W. E., Glaze, D. G., Christodoulou, J., Clarke, A. J., Bahi-Buisson, N., Leonard, H., Bailey, M. E. S., Schanen, N. C., Zappella, M., Renieri, A., Huppke, P., Percy, A. K., & RettSearch

Consortium. (2010). Rett syndrome: Revised diagnostic criteria and nomenclature. *Annals of Neurology*, 68(6), 944-950. <https://doi.org/10.1002/ana.22124>

Olde Loohuis, N. F. M., Kos, A., Martens, G. J. M., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., & Aschrafi, A. (2012). MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(1), 89-102. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0788-1>

Programa Nacional de Enfermedades Poco Frecuentes. (2020, diciembre 11). Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/salud/pocofrecuentes/definicion>

Schouten, M., Aschrafi, A., Bielefeld, P., Doxakis, E., & Fitzsimons, C. P. (2013). microRNAs and the regulation of neuronal plasticity under stress conditions. *Neuroscience*, 241, 188-205. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.065>

Schratt, G. (2009). microRNAs at the synapse. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(12), 842-849. <https://doi.org/10.1038/nrn2763>

Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M., & Greenberg, M. E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439(7074), 283-289. <https://doi.org/10.1038/nature04367>

Schüle, B., Armstrong, D. D., Vogel, H., Oviedo, A., & Francke, U. (2008). Severe congenital encephalopathy caused by MECP2 null mutations in males: Central hypoxia and reduced neuronal dendritic structure. *Clinical Genetics*, 74(2), 116-126. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01005.x>

Sheinerman, K. S., & Umansky, S. R. (2013). Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 150. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00150>

Szulwach, K. E., Li, X., Smrt, R. D., Li, Y., Luo, Y., Lin, L., Santistevan, N. J., Li, W., Zhao, X., & Jin, P. (2010). Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 189(1), 127-141. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908151>

Taruscio, D., Arriola, L., Baldi, F., Barisic, I., Bermejo-Sánchez, E., Bianchi, F., Calzolari, E., Carbone, P., Curran, R., Garne, E., Gatt, M., Latos-Bieleńska, A., Khoshnood, B., Irgens, L., Mantovani, A., Martínez-Frías, M. L., Neville, A., Rißmann, A., Ruggeri, S., ... Dolk, H. (2014). European recommendations for primary prevention of congenital anomalies: A joined effort of EUROCAT and EUROPLAN projects to facilitate inclusion of this topic in the National Rare Disease Plans. *Public Health Genomics*, 17(2), 115-123. <https://doi.org/10.1159/000360602>

Vashi, N., & Justice, M. J. (2019a). Treating Rett syndrome: From mouse models to human therapies.

Mammalian Genome, 30(5), 90-110. <https://doi.org/10.1007/s00335-019-09793-5>

Vashi, N., & Justice, M. J. (2019b). Treating Rett syndrome: From mouse models to human therapies. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 30(5-6), 90-110. <https://doi.org/10.1007/s00335-019-09793-5>

Watson, P., Black, G., Ramsden, S., Barrow, M., Super, M., Kerr, B., & Clayton-Smith, J. (2001). Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *Journal of Medical Genetics*, 38(4), 224-228. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.4.224>

Wu, H., Tao, J., Chen, P. J., Shahab, A., Ge, W., Hart, R. P., Ruan, X., Ruan, Y., & Sun, Y. E. (2010). Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18161-18166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005595107>