



**XVIII Premi PRBB al millor treball de recerca en
Ciències de la Salut i de la Vida**

2023

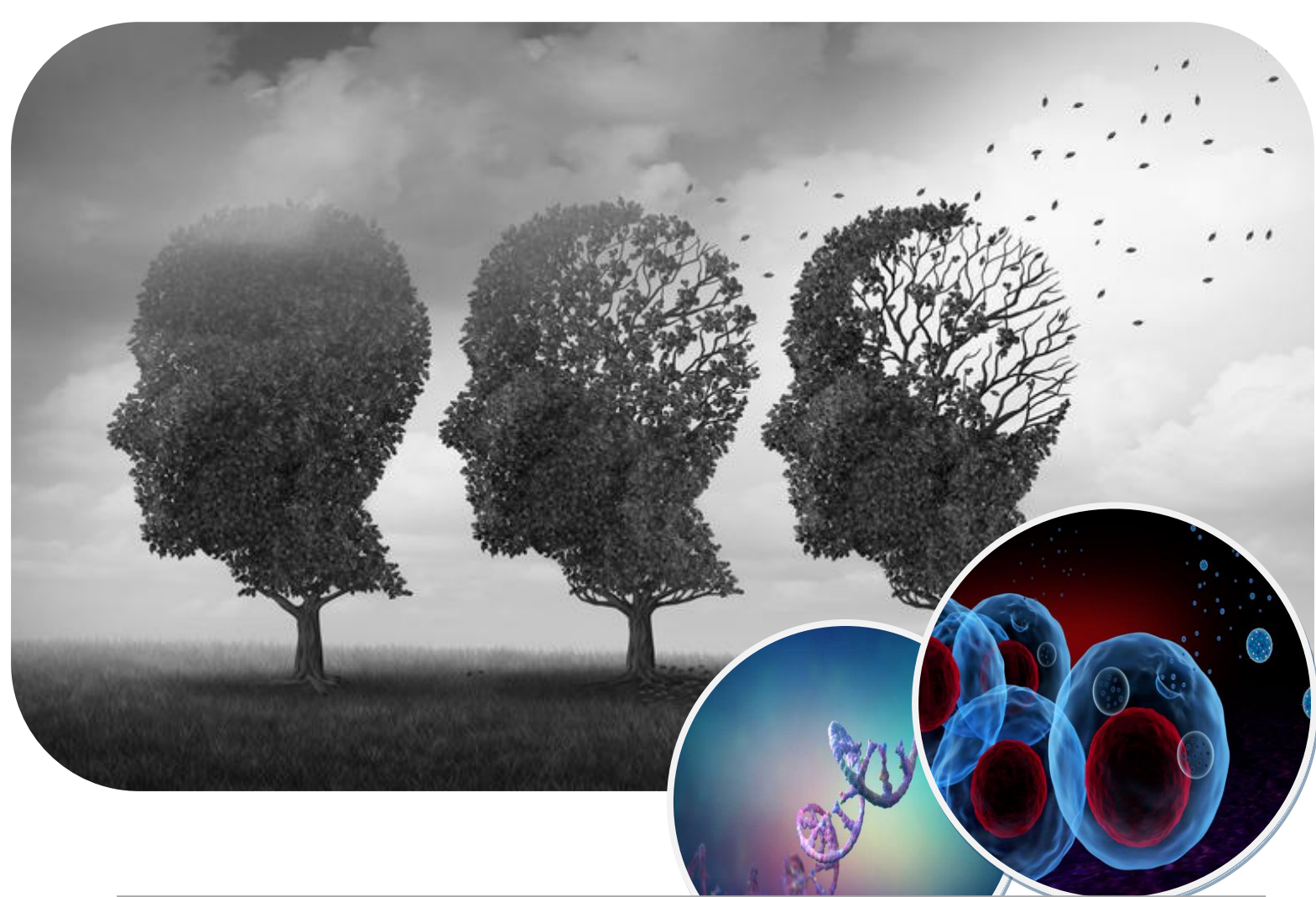
Treball guanyador del 5è premi

**La relació entre les proteïnes long-non-coding i
l'Alzheimer**

Carla Escoda Florensa

Tutores: Maria Balasch Carbonell, Marta Artells, Cristina Lorca

Institut Josep Lladonosa (Lleida)



LA RELACIÓ ENTRE LES PROTEÏNES *LONG-NON-CODING* I L'ALZHEIMER

NOM: Carla Escoda Florensa

TUTORES:

- Maria Balasch Carbonell
- Marta Artells
- Cristina Lorca

CURS: 2n BATX A

CENTRE: INS Josep Lladonosa,

Carrer de Jeroni Pujades, 16,

25005 Lleida

TELÈFON CENTRE: 873 49 00 25

CORREU:

info@insjoseplladonosa.cat

POBLACIÓ I DATA: Lleida,

19/12/2022

ABSTRACT

The aim of this study is to find the relation between some of the long-non-coding proteins derived from the brain and the Alzheimer's disease which had a significant difference between a healthy brain and one which had Alzheimer in the preclinical state. It could be essential for the diagnosis of this illness since the extracellular vesicles could be biomarkers of it and they can be extracted from the blood. Consequently, with only a blood analysis information from the brain could be obtained.

To do it some samples of *post mortem* brains that didn't have the disease, which are called control samples, had been extracted as well as samples of *post mortem* brains which did have Alzheimer in the preclinical state of the disease. Out of this samples, there were extracted the extracellular vesicles and, later, the proteic part of it was divided into smaller units called peptides (like a part of a protein). After that, they were characterised using mass spectrometry. Finally, using an informatic programme, the data collected the proteins which were derived from the non-coding regions of the extracellular vesicles of the brain. The analysis of the ones that had a significant difference between the control and the preclinical state of the Alzheimer's disease could be done in order to find the relation of this proteins with this neurodegenerative disease.

The results of the experiment turned out to be that, among all the proteins which were studied, there were some of them which were more expressed in the preclinical state of the Alzheimer's disease and their function was related to the development of the illness. In contrast, some were more expressed in the control group and had a function which was related with the prevention of the Alzheimer's disease. Notwithstanding, there were some proteins which it is known that they have a relation with this disease although it is not known how whereas some of the proteins did not even had a relation with Alzheimer.

Moreover, there were proteins that, despite having more in the brain than in the brain was affected by the disease, its function was related to the development of

the Alzheimer's disease. Because of that this project is the beginning of a new research for which, in the same project, two hypotheses are already proposed.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha sigut una feina bastant complexa i que ha requerit molta dedicació i esforç. És per això que estic molt agraïda per tot el suport que he rebut.

Primerament, volia donar les gràcies a les meves tutores del treball, la Maria Balasch, que va ser-hi als inicis d'aquest treball i on començava tot ja a prendre forma i a la Marta Artells, que tot i incorporar-se més tard sempre em va mostrar interès pel treball i la feina feta. Gràcies a totes dues, he sapigut defensar un tipus de treball que mai abans havia tractat. També agrair al Xavier Gallart-Palau per iniciar-me en aquest món tan complex de la proteòmica i proporcionar-me tots els recursos necessaris per poder dur a terme aquest treball.

Però sobretot volia agrair la implicació i l'ajuda que m'ha proporcionat la Cristina Lorca. Ella ha sigut la que m'ha ajudat a entendre-ho tot millor, qui em soluciona tots els meus dubtes i inquietuds que tenia conforme anava avançant el procés i la que m'ha ajudat a la part que, personalment, era la que més em preocupava: l'anàlisi de les dades. Gràcies a ella vaig ser capaç de tirar endavant una feina que era tot un repte per a mi ja que partia des d'un coneixement de l'àmbit gairebé nul.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	1
MOTIVACIÓ	1
HIPÒTESI	2
OBJECTIUS	3
MARC TEÒRIC	4
ALZHEIMER	4
CAUSES	4
ETAPES DE L'ALZHEIMER	5
L'ALZHEIMER, LES MALALTIES VASCULARS I LES VESÍCULES EXTRACEL·LULARS 10	
VESÍCULES EXTRACEL·LULARS	11
ANTECEDENTS	11
SUBTIPUS	13
RELACIÓ AMB ELS PROBLEMES DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL	14
ARN NO CODIFICANT	16
DESCOBRIMENT	16
TIPUS	17
lncRNA	18
FUNCIÓNS DELS <i>NON-CODING</i> RNA EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL	19
MARC EXPERIMENTAL	21
METODOLOGIA	21
MATERIALS	21
MÈTODES	22
ANÀLISI I DISCUSSIÓ DE DADES	29
lnc-ANKRD22-2:1.....	30
lnc-C12orf73-1:1	31
lnc-C5orf60-3:7	31

Lnc-GNG4-8:1.....	31
Lnc-HRAS-4:1.....	32
Lnc-HSP90AA1-5:3.....	32
Lnc-NOS2-12:1	33
Lnc-PHB2-1:2 / Lnc-PHB2-1:3.....	33
Lnc-TAOK3-9:1.....	34
Lnc-TIMM17B-2:1.....	34
NCAM1	35
Lnc-CISH-2:1	35
Lnc-HNF1B-2:4	36
Lnc-EIF2AK3-4:77	37
SEGON ANÀLISI DE LES DADES.....	37
VALORACIÓ (NOVA LÍNIA DE RECERCA).....	37
CONCLUSIONS.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	42
WEBGRAFIA	45
IMATGES	47

INTRODUCCIÓ

En aquest estudi s'han analitzat micropèptids de vesícules extracel·lulars procedents de regions no codificants de gens en teixit de cervell humà *post mortem* amb diferents estadis de la malaltia d'Alzheimer, més concretament en el control (cervell sa) i l'estat preclínic (amb la malaltia però sense presentar símptomes).

L'Alzheimer és una malaltia neurodegenerativa que es caracteritza per diverses alteracions al cervell com la deposició de la proteïna beta-amiloide que originen les anomenades plaques senils o plaques amiloides (lesió més primerenca en la malaltia de l'Alzheimer).

Per poder obtenir informació del cervell normalment es fa una biòpsia i, per això, hem d'extreure una part del cervell. Tot i això, s'ha observat que les vesícules extracel·lulars, que són reconegudes com uns mediadors de la comunicació intercel·lular, contenen informació del lloc del seu origen i també ens indiquen a quina cèl·lula es dirigeixen. Aquestes vesícules també tenen la capacitat de travessar la barrera hematoencefàlica i arribar a la sang. Gràcies a això podem obtenir informació del cervell sense haver d'extreure'n una part.

A més, aquestes vesícules contenen molts elements a l'interior, com per exemple els lncRNA. Aquests són una seqüència de RNA que, en teoria, no codifiquen proteïnes. Tot i això, s'ha observat que realment sí que codifiquen, no a proteïnes com a tal sinó a micropèptids (proteïnes molt petites). Aquests lncRNA estan molt regulats, fins i tot més que les proteïnes (les quals tenen una importància molt gran en l'expressió gènica), i això significa que contenen molta informació.

MOTIVACIÓ

Portava un temps pensant en què podria escollir per poder realitzar un bon treball de recerca i, per tant, un tema que em despertés la curiositat i tingués ganes

d'investigar-ne. Va ser quan a l'assignatura de biologia ens van ensenyar el tema de bioquímica i, dins d'aquest més específicament les proteïnes, quan em vaig adonar de la vital importància que tenien en el nostre organisme. Per tant, vaig considerar que seria interessant saber-ne més sobre elles.

Va ser un temps després que ens van proposar presentar-nos a un projecte el qual proposava uns temes pel Treball de Recerca el qual s'anomenava Projecte Itinera. Vaig decidir donar una ullada a tots els temes que proposaven i, sorprenentment, n'hi havia un que em va cridar molt l'atenció ja que tractava sobre la proteòmica clínica i els seus efectes en algunes malalties. Quan vaig llegir-ho tenia clar que aquell era el tema que volia tractar i, per sort, vaig ser escollida per poder participar en el projecte. Un cop dins, em vaig posar en contacte amb els meus dos tutors, la Maria Balasch i en Xavier Gallart, vam acabar de determinar de quina malaltia investigaria i, finalment, vam escollir l'Alzheimer.

HIPÒTESI

Degut a que les proteïnes prenen rols molt importants en el nostre organisme com és la de crear estructures o bé regular l'expressió dels gens, no pot ser que també tinguin un paper important en la progressió de malalties com és l'Alzheimer? I poden ser les proteïnes procedents de regions, suposadament, no codificants unes d'elles?

Després de plantejar aquests dubtes la hipòtesis formulada en la qual girarà aquest treball és: **les proteïnes *long-non-coding* guarden una relació amb la progressió la malaltia de l'Alzheimer.**

OBJECTIUS

Els objectius de l'autor al realitzar aquest estudi han set:

- Trobar la relació entre les vesícules extracel·lulars i el cervell.
- Saber interpretar les dades obtingudes i realitzar-ne una investigació a partir d'altres articles científics.
- Saber determinar la relació que tenen les proteïnes amb l'Alzheimer.
- Determinar les diferències en la quantificació relativa de micropèptids en vesícules extracel·lulars procedents de regions no codificants de gens en teixit de cervell humà *post mortem* amb l'estadi preclínic de la malaltia de l'Alzheimer i un control.

MARC TEÒRIC

ALZHEIMER

L'Alzheimer, que és la causa principal de la demència, és un síndrome clínic que afecta a l'activitat cognitiva d'aproximadament 50 milions de persones arreu del món.

Com bé diuen Mateu, A. P., Salmerón, M. J. S., & Escoz, F. J. L. en "Demencia tipo Alzheimer: Repercusión sobre el paciente y su familia en la primera etapa. VOLUMEN III": demència significa "dement" o "privat de ment", és una malaltia cerebral manifestant-se de forma crònica i progressiva, presentant alteracions d'un gran nombre de funcions cognitives, que són les que ens faciliten la realització de diverses activitats, com la percepció, l'atenció, memòria, comprensió, pensament, praxis, orientació, càlcul, llenguatge, i capacitat d'aprenentatge.

CAUSES

En la majoria dels casos, la malaltia de l'Alzheimer és conseqüència d'una combinació de factors genètics, ambientals i de l'estil de vida que afecten el cervell al llarg del temps. Tot i així, la malaltia d'Alzheimer no sol passar per canvis genètics específics que pràcticament garanteixen que una persona patirà la malaltia. Aquests casos rars solen donar lloc a l'aparició de la malaltia a la mitjana edat.

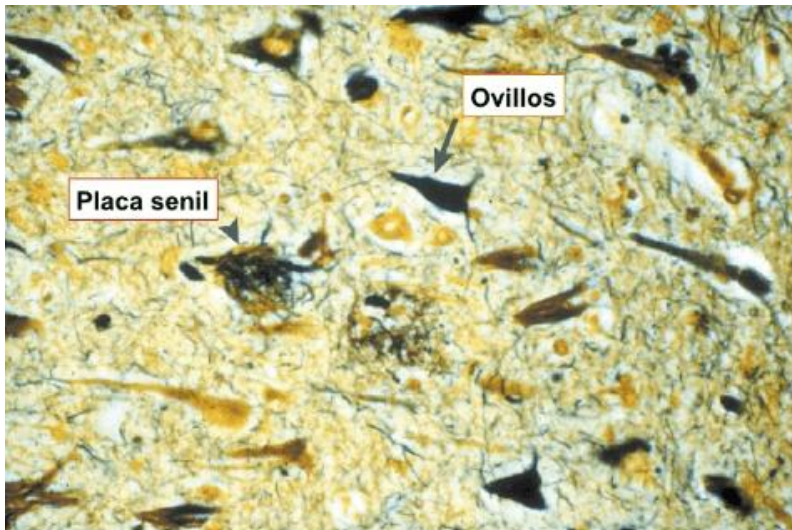
Els investigadors que intenten entendre la causa de la malaltia d'Alzheimer se centren en el paper de dues proteïnes: les plaques de beta amiloide i els cabdells de TAU.

D'una banda, la beta amiloide és un fragment d'una proteïna més gran que, quan aquests fragments s'agrupen, semblen tenir un efecte tòxic a les neurones i interrompen la comunicació entre cèl·lules. Aquests grups formen dipòsits més

grans anomenats plaques amiloides o plaques senils, que també inclouen altres deixalles cel·lulars. Aquestes plaques es consideren un dels distintius diagnòstics neuropatològics de la malaltia d'Alzheimer.

D'altra banda, les proteïnes TAU juguen un paper al sistema intern de suport i transport d'una neurona per transportar nutrients i altres materials essencials. En la malaltia d'Alzheimer, les proteïnes TAU canvien de forma i s'organitzen en estructures anomenades cabdells neurofibril·lars els quals interrompen el sistema de transport i són tòxics per a les neurones.

Aquests dos aspectes, juntament amb la pèrdua de neurones corticals (que són responsables de la planificació, el control i l'execució dels moviments voluntaris) i sinapsis, són les causes més característiques d'aquesta malaltia.



Il·lustració 1. Plaques senils i cabdells de proteïna TAU <https://alzheimermcp.site123.me/alzheimer/placas-y-ovillos>

ETAPES DE L'ALZHEIMER

Els canvis al cervell relacionats amb l'Alzheimer comencen anys abans que apareguin els signes de la malaltia, és a dir, el cervell pot estar patint canvis a nivell bioquímic però, tot i així no mostrar simptomatologia. Aquest període de temps, que pot durar anys, es coneix com a Alzheimer preclínic.

La progressió típica de la malaltia d'Alzheimer pot comprendre de tres a set etapes i ens aporten una idea general de com canvien les habilitats un cop apareixen els símptomes que només s'ha d'utilitzar com a una guia general ja que pot ser difícil ubicar una persona amb Alzheimer en una etapa específica, degut a que les etapes es poden superposar.



Il·lustració 2. Tres etapes del Alzheimer

<https://www.alzheimeruniversal.eu/2015/03/20/hablando-claro-hablando-del-alzheimer/alzheimer-como-afecta-el-cerebro/>

PRIMERA ETAPA: MALALTIA D'ALZHEIMER LLEU (separació en 3 etapes)

En aquesta etapa la persona afectada per la malaltia pot tenir un estil de vida independent ja que activitats quotidianes com poden ser conduir, treballar i participar a activitats socials és possible que les puguin realitzar. Això no treu que les persones del cicle proper comencin a notar certes dificultats. A més a més, si el subjecte que té Alzheimer en aquesta etapa es sotmet a una entrevista mèdica detallada, es poden detectar problemes de concentració o memòria a part d'altres dificultats com:

- Problemes per trobar la paraula o el nom correctes
- Dificultat per recordar noms quan es presenten persones noves
- Dificultat per fer tasques en entorns socials o laborals.
- Oblidar-se d'una cosa que acaba de llegir
- Perdre o traspaperar un objecte valuós

- Tenir més problemes per planificar o organitzar

Com bé diu Donoso, A. (2003) en *“La enfermedad de Alzheimer”* a la Revista chilena de neuro-psiquiatria, a la primera etapa de la malaltia destaquen les falles de la memòria i els conflictes. La falla més evident és la pèrdua de memòria episòdica recent. Tot i que hem de saber que si només hi haguessin falles de memòria hauríem de parlar d'una síndrome amnèsica i no pas d'una demència. A més a més, en l'etapa lleu de l'Alzheimer també tenim falles d'atenció i concentració, memòria remota, memòria semàntica així com trastorns del discurs, per exemple, la imprecisió o perseverança en el contingut, les faltes de coherència o les dificultats en la comprensió de discursos de certa complexitat.

SEGONA ETAPA: MALALTIA D'ALZHEIMER MODERADA (separació en 3 etapes)

La segona etapa de l'Alzheimer generalment és la més llarga i pot durar anys. També és possible que noti que la persona amb Alzheimer confon paraules, es frustra o s'enfada, o actua de forma inesperada. El dany a les cèl·lules nervioses del cervell pot dificultar l'expressió de pensaments i la realització d'activitats quotidianes. És per això mateix que la persona amb aquesta malaltia requerirà un nivell major d'atenció.

Alguns dels símptomes, que pot incloure aquesta etapa poden ser:

- Oblidar esdeveniments o informació de la història personal.
- Sentir-se malhumorat o retret, especialment en situacions socialment o mentalment exigents.
- No poder recordar l'adreça o el número de telèfon propis, o l'escola o la universitat on es va graduar.
- Confusió sobre la ubicació i data actuals.
- Necessitar ajuda per triar la roba adequada per a la temporada o l'ocasió.
- Problema per controlar la necessitat d'anar al bany.

- Canvis als patrons de son, com dormir durant el dia i estar inquiet durant la nit.
- Augment del risc de desorientar-se i perdre's.
- Canvis en la personalitat i el comportament, com el recel i el deliri, o comportament repetitiu com recargolar les mans o tallar papers.

En l'etapa moderada s'hi afegeixen afàsies, apràxies i elements de la síndrome de Gerstmann. Com bé diuen González, R., Hornauer-Hughes, A. (2014) en "*Afasia: una perspectiva clínica.*" a la revista del Hospital Clínic de la Universitat de Xile: "L'afàsia és un trastorn del llenguatge adquirit a conseqüència d'un dany cerebral, que en general compromet totes les modalitats: expressió i comprensió del llenguatge oral, escriptura i comprensió de lectura. Cadascuna d'aquestes es pot afectar qualitativament i quantitativament de manera diferent, conformant grups sindromàtics que poden coexistir amb deficiències en el processament cognitiu."

Per parlar d'afàsia ens guiem pels defectes de l'expressió, una anomia evident i especialment parafàsies (fonètiques o semàntiques), que és un tipus d'afàsia que es caracteritza per la produir síl·labes no intencionades, paraules o fins i tot frases durant la parla o bé per la substitució de paraules que són les que es volien dir per altres; la comprensió. No obstant, aquesta també pot fallar des de la primera etapa per defectes d'atenció o memòria.

Pel que fa a la progressió dels trastorns del llenguatge, dins d'un període de temps de diversos anys, sol anar d'afàsia acústico-amnèsica a afàsia de Wernicke (de vegades sensorial transcortical) i a afàsia global; és excepcional trobar una afàsia de Broca.

Rojas, L. Q., & Soloviova, Y. V. (2005) ens explica en "*Afasia acústico-mnèsica: estudio de caso. Revista española de neuropsicología, 7(1), 17-34*" que en el quadre clínic de l'afàsia acústic-amnèsica, que és caracteritzada per la conservació relativa de l'oïda fonemàtica, és a dir dels sons. No obstant, tot i que el pacient té la impressió que la seva comprensió i escriptura estan intactes, aquest no aconsegueix mantenir a la memòria frases llargues, reproduir paraules requerides o anomenar objectes.

L'afàsia de Wernicke ha estat anomenada en múltiples ocasions com a afàsia sensorial, afàsia receptiva, afàsia central i molts altres. És un trastorn del llenguatge que es produeix per l'afectació de l'anomenada àrea de Wernicke, que es localitza a la circumvolució temporal posterior superior i mitjana, que es troba adjacent amb l'escorça auditiva primària, la qual pot estar afectada o no en aquesta afàsia (Ardila, 2005).

El terme d'afàsia global es fa servir quan estan greument afectades tant les funcions expressives com les receptives del llenguatge. Al principi del quadre el pacient sol presentar una abolició total de les emissions lingüístiques. Passats uns dies o setmanes, apareixen alguns elements automatitzats i de vegades produccions estereotipades (Vendrell, J. M; 2001).

TERCERA ETAPA: MALALTIA D'ALZHEIMER GREU (separació en 3 etapes)

En la tercera i última etapa de la malaltia és quan les persones perden la capacitat de respondre al seu entorn, de tirar endavant una conversa i, eventualment, de controlar els moviments. A més a més, la comunicació es torna difícil tot i poder dir paraules o frases.

Fins i tot, a mesura que la memòria i les habilitats cognitives empitjoren, és possible que es produeixin canvis significatius en la personalitat i que les persones necessitin molta ajuda amb les tasques diàries.

Alguns dels símptomes que poden presentar són:

- Necessitar assistència tot el temps amb les activitats diàries i la cura personal.
- Perdre la noció d'experiències recents i els fets que les envolten.
- Experimentar canvis en les capacitats físiques, inclosa la capacitat de parlar, seure i, eventualment, empassar.
- Tenir més dificultat per comunicar-se.

- Tornar-se vulnerables a infeccions, especialment pneumònia.

L'ALZHEIMER, LES MALALTIES VASCULARS I LES VESÍCULES EXTRACEL·LULARS

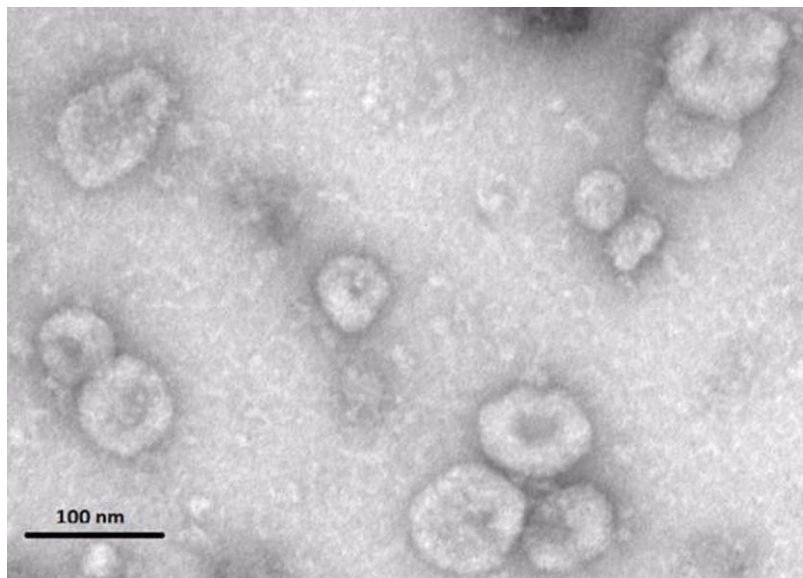
Les malalties vasculars, com bé com diu Gallart-Palau, X., et al. (2019), es detecten en un 80% dels cervells de persones que han mort patint la malaltia de l'Alzheimer i fan que augmenti el risc de contreure la malaltia i disminueix el fet de poder-la diagnosticar amb més rapidesa.

A l'estudi de Xavier Gallart-Palau mencionat anteriorment es va posar a prova la hipòtesis que afirmava que la reducció del flux sanguini afectava a la progressió de la demència. L'experiment realitzat constava d'utilitzar micro bobines embolicades al voltant de les artèries per disminuir el flux sanguini al cervell (BCAS) de ratolins, valorar la composició molecular de les vesícules extracel·lulars del cervell i les de cervells de subjectes que van morir amb Alzheimer i altres demències.

En aquest estudi també es va observar que la composició molecular de les vesícules extracel·lulars (partícules embolcallades per una membrana lipídica que es formen en el medi extracel·lular, contenen diverses càrregues en el seu interior i són reconegudes per la seva funció en la comunicació intercel·lular) derivades del cervell varia juntament amb el deteriorament de la unitat neurovascular. Això pot estar associat amb el desenvolupament de diverses demències en els éssers humans. No obstant, hi ha una dicotomia bastant important pel que fa a les funcions de les vesícules en l'àmbit neuropatològic ja que aquestes poden actuar per proporcionar una major facilitat a les cèl·lules per protegir-se i adaptar-se (neuroprotecció, angiogenesis...), i també fer de mediadors de neurotoxicitat i proteinopatia. És per això que l'origen de les vesícules extracel·lulars és molt important en la neuropatologia.

VESÍCULES EXTRACEL·LULARS

Com bé diu Van Niel, G., et al. En *Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles*, les vesícules extracel·lulars (EVs) es van descobrir fa solament 80 anys i en les últimes dècades s'ha començat a investigar-ne més sobre elles. Podríem definir-les com a unes partícules embolcallades per una membrana lipídica que es formen en el medi extracel·lular, com bé indica el seu nom, i són reconegudes tant com a uns importants mediadors per la comunicació intercel·lular (entre cèl·lules), ja que poden passar càrregues de una cèl·lula a una altra i lliurar-les per a que facin una funció. Això fa que aquestes vesícules actuïn com a uns biomarcadors, és a dir, serveixen per poder detectar malalties.



Il·lustració 3. Vesícules extracel·lulars <https://www.infosalus.com/asistencia/noticia-expertos-contemplan-importancia-vesiculas-extracelulares-investigar-trastornos-endocrinos-20220425172830.html>

ANTECEDENTS

Com bé ens expliquen Couch, Y., Buzàs, E., Di Vizio, D., Gho, Y., Harrison, P., F. Hill, A., Lötvall, J., Raposo, G., D. Stahl, P., Théry, C., W. Witwer, K., R. F. Carter, D.,

(2021) va ser als voltants del 1980 quan es va començar aprofundir més en tot el món de la recerca de les vesícules extracel·lulars.

Va haver dos articles fonamentals i complementaris publicats pels laboratoris Johnstone i Stahl que van defensar a prova d'aigua l'alliberament de vesícules intraluminals de la cèl·lula i les van definir com a exosomes (Harding et al., 1983; Pan & Johnstone, 1983). Ambdós laboratoris estaven utilitzant la maduració de reticulòcits com a model; el grup de Stahl per investigar el trànsit de membranes i el laboratori de Johnstone per estudiar la bioquímica de la membrana plasmàtica. El seu treball va mostrar que durant la maduració dels reticulòcits, el receptor de transferrina (és una proteïna principalment produïda pel fetge, la qual té com a funció transportar el ferro cap a la medul·la, melsa, fetge i músculs, mantenint el bon funcionament de l'organisme), es perdia mitjançant l'alliberament de vesícules. Cliff Harding, llavors integrant del laboratori de Stahl, va capturar algunes imatges sorprenents que demostraven que aquestes vesícules s'alliberaven de la llum dels cossos multivesiculars (MVB) en fusionar-se amb la membrana plasmàtica.

Aquests primers estudis van establir les bases per a l'explosió d'interès que va seguir durant els 35 anys següents. En termes del període entre aquests articles seminals i el començament de l'expansió massiva en la investigació de les vesícules extracel·lulars, la forma semblava tenir més importància que la funció d'aquestes. Van predominar els articles sobre micropartícules, microvesícules i exosomes derivats de plaquetes, amb alguns avenços inicials importants en la comprensió de la naturalesa fonamental de les vesícules extracel·lulars.

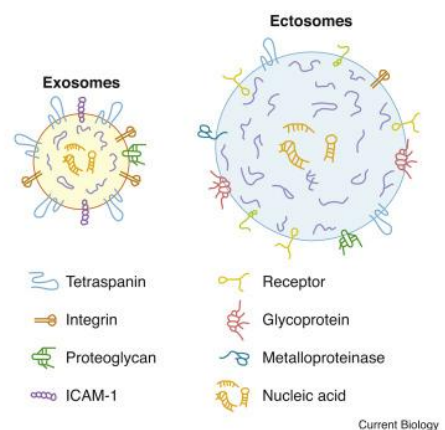
Durant les dècades de 1980 i 1990, diversos articles van informar sobre la quantificació dels EV, cosa que demostra l'alteració del nombre d'EV a la malaltia. El fenomen va començar al voltant de 1993 amb un article sobre micropartícules elevades a la isquèmia cerebral transitòria i altres infarts (Lee et al., 1993), però va continuar sent explorat en malalties com l'angina (Singh et al., 1995) i la malaltia de Crohn (Powell et al., 1996). També van començar a sorgir articles que descrivien les característiques físiques i bioquímiques de les vesícules extracel·lulars.

Fora del camp de la biologia plaquetària, es va descobrir que les EV de les cèl·lules immunitàries són capaces de presentar antígens (Raposo et al., 1996). Aquest últim document, en particular, va ser decisiu ja que va captar la imaginació de molts i va ajudar a catalitzar un interès més gran en el camp de les vesícules extracel·lulars. Va mostrar que aquestes tenien el potencial de ser aprofitades com a vacunes antitumorals; de fet, aquest estudi va portar al laboratori d'Amigorena a investigar si les cèl·lules dendrítiques secreten vesícules extracel·lulars que, quan es carreguen amb pèptids tumorals, poden erradicar tumors (Zitvogel et al., 1998) i va conduir a assaigs clínics durant la propera dècada (Escudier et al., 2005).

És important destacar que va demostrar que les vesícules extracel·lulars podrien exercir rols funcionals en els processos biològics. En conjunt, aquestes idees que les vesícules extracel·lulars podrien tenir funcions fisiològiques, que es podrien fer servir com a biomarcadors i que podrien tenir aplicacions terapèutiques, van portar a l'explosió de l'interès per aquestes a principis del segle XXI.

SUBTIPUS

Les vesícules extracel·lulars permeten classificar-se segons la mida, densitat, les molècules que les constitueixen... però hi ha vesícules que es superposen en termes de mida i composició, com per exemple els ectosomes i exosomes, els quals es diferencien segons el seu lloc de formació.



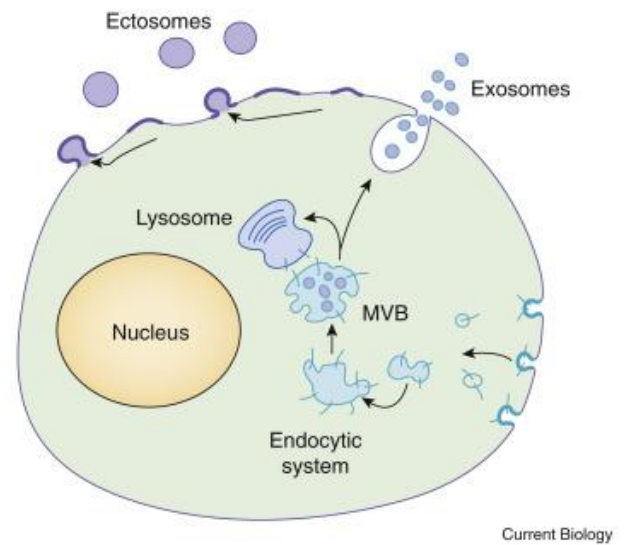
Aquests són els dos subtipus més importants de les vesícules extracel·lulars. Tot i que n'hi ha d'altres com per exemple els oncosomes o altres microvesícules formades a la membrana plasmàtica o a l'exterior cel·lular.

Il·lustració 4: Estructura i composició dels exosomes i ectosomes.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982218300927#fig2>

FORMACIÓ D'ECTOSOMES I EXOSOMES

Els ectosomes (incloent els octosomes i microvesícules) estan formats mitjançant una germinació exterior, com a una protuberància, de la membrana plasmàtica que després es desprenderà i formarà una vesícula, que serà el que anomenem ectosoma.

En canvi, el que passa en el cas dels exosomes és que si el MVB (cos multivesicular) es fusiona amb la membrana plasmàtica, les ILV (vesícules intraluminars) s'alliberen com a exosomes.

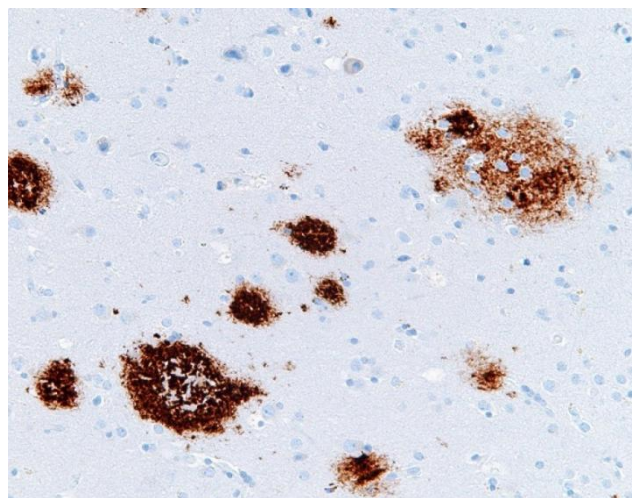


Il·lustració 5. Esquema de formació d'ectosomes i exosomes.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982218300927>

RELACIÓ AMB ELS PROBLEMES DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

Els cervells *post mortem* que estaven afectats per Alzheimer normalment presentaven altres patologies neurològiques combinades amb altres trastorns, a part de tenir també altres aspectes que són senyals de la presència de la malaltia com les plaques senils,

per exemple, que s'associen amb la degeneració de les estructures



<https://psicologiyamente.com/neurociencias/placas-seniles>

neuronal. És a dir, les variacions moleculars subtils poden ajudar a que la malaltia de l'Alzheimer pugui continuar expandint-se. Per aquest mateix motiu hem d'estudiar les comunicacions intercel·lulars, funció estretament associada amb les vesícules extracel·lulars. Per tant, poden tenir la funció de fer de biomarcadors d'aquesta malaltia.

A més a més, s'ha vist que hi ha una coincidència entre l'autofàgia¹ alterada en l'etapa preclínica de l'Alzheimer amb altres patologies neurològiques en les vesícules extracel·lulars del cervell durant tota la progressió d'aquesta malaltia.

L'alteració de l'autofàgia es veu provocada perquè els lisosomes i fagòfors², que hi ha una formació bastant activa d'aquests durant l'estat preclínic de l'Alzheimer, no contribueixen de manera òptima a un flux autofàgic adequat i progressiu al llarg de la neuropatologia de l'Alzheimer. Per tant, moltes vesícules degradatives entren en el camí de les vesícules extracel·lulars que contenen orgànuls danyats.

Per tant, aquesta alteració de l'autofàgia provoca un escampament de la malaltia de l'Alzheimer mitjançant les vesícules extracel·lulars.

¹ Autofàgia: procés catabòlic en el qual el citoplasma, incloent-hi l'excés d'orgànuls o aquells deteriorats, són emmagatzemats en vesícules de doble membrana i alliberats dins el lisosoma o vacúol per a la seva descomposició i eventual reciclatge de les macromolècules resultants.

² Fagòfor: estructura es forma per l'allargament i la fusió d'un sac de membrana plana que envolta els components citoplasmàtics.

ARN NO CODIFICANT

Un ARN no codificant (ncRNA) és una molècula d'ARN funcional, que no es tradueix en una proteïna. Tot i així, aquest tipus d'RNA poden interaccionar amb altres àcids nucleics o altres molècules i així funcionar com a molècules reguladores de vital importància en el desenvolupament normal així com en diversos trastorns, com els del sistema nerviós central.

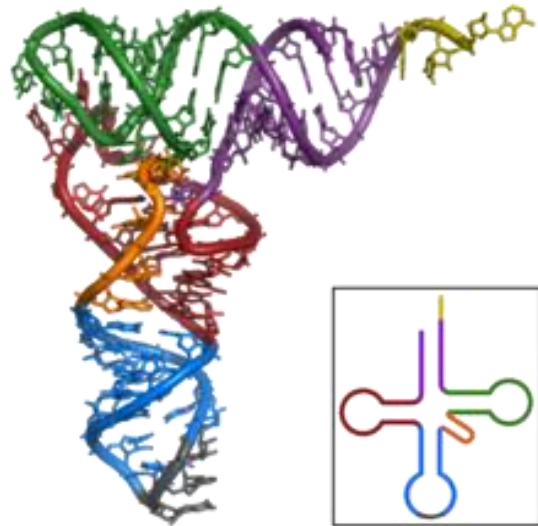
DESCOBRIMENT

Com bé diuen David de Gonzalo Calvo i Vicenta Llorente Cortes: “L'exploració del transcriptoma, el conjunt d'ARN presents en una cèl·lula, constitueix una de les possibles estratègies que cal seguir en el desenvolupament de nous biomarcadors amb aplicació clínica. Fins ara, l'estudi de transcrits procedents de gens codificants de proteïnes que donen lloc a l'ARN missatger (mARN) ha estat el camp explorat principal. Més recentment, l'aplicació de potents eines de seqüenciació del genoma i de l'ARN ha revelat l'existència d'una immensa majoria de transcrits entre el 97% i el 99% del total de transcriptoma, que no presenten la informació genètica codificant de proteïnes (ncARN) . El descobriment d'aquesta nova classe d'ARN, i les diferents funcions, ha tingut profundes implicacions per a la biologia molecular i la investigació mèdica. En efecte, els ncARN tenen un paper crucial en la regulació de l'expressió gènica i són elements clau en processos fisiològics i patològics, incloent-hi les malalties cardiovasculars (Beermann i cols., *Physiol Rev*, 2016).”

Va ser als voltants de 1960 quan Francis Crick va predir un component de l'ARN funcional que controlava la traducció. Segons Crick, l'ARN encaixa millor amb el transcrit d'ARNm que un polipèptid pur.

Un ARN de transferència d'alanina (ARNtAla), trobat al llevat de pastisseria, va ser el primer ARN no codificant a ser caracteritzat; la seva estructura va ser publicada en 1965 (Holley RW, Apgar J, Everett GA, Et Al. «Structure Of A Ribonucleic Acid».

Science, 147, Març 1965, Pàg. 1462–5). Per poder produir una mostra purificada d'ARNt d'alanina, Robert W. Holley et al. va utilitzar 140 kg de llevat de pastisseria comercial per obtenir només 1 g d'ARNtAla pur per a l'anàlisi. L'ARNt de 80 nucleòtids va ser seqüenciat sent primer digerit amb Ribonucleasa pancreàtica (produint fragments acabats en Citosina o Uridina) i després amb ribonucleasa takadiastasa T1 (produint fragments acabats en Guanosina). La cromatografia i identificació dels extrems 5' i 3' va ajudar després a ordenar els fragments per establir la seqüència d'ARN. De les tres estructures proposades originalment



per a aquest ARNt, l'estructura en forma de trèvol va ser proposada independentment a les següents publicacions. L'estructura secundària en forma de trèvol va ser concretada seguint anàlisis cristal·logràfiques de raigs X duts a terme per dos grups independents de recerca en 1974.

Il·lustració 7. Estructura ARN no codificant.
https://es.wikipedia.org/wiki/ARN_no_codificante

TIPUS

Els ncRNAs els podem classificar en curts (<200 nucleòtids), llargs (>200 nucleòtids) i circulars (de forma circular, com bé indica el seu nom). Els curts també els podem dividir en: microRNAs, de petita interferència (siRNAs), associats a Piwi, un tipus de proteïna (piRNAs), nuclear petit (snRNAs), nucleolar petit (snoRNAs), entre altres. I els llargs es poden dividir en: antisentit (asRNAs), associat al promotor (PALRs), PROMPTS...

No obstant, el tipus en el qual ens centrarem més en aquest estudi són els lncRNA, és a dir, els llargs.

Taula 1: Tretze classes funcionals d'ARNnc

NOM	FUNCIÓ PRINCIPAL	LLARGADA
miRNAs	Repressió translacional	19-25
siRNAs	Escissió de l'ARNm	19-29
piRNAs	Mantenir el silenciament del transposó	25-31
rasiRNAs	Silenciment directe de retrotransposons i seqüències repetitives	24-29
rasi/piRNAs	Formació d'heterocromatina i silenciament transcripcional	24-31
lsiRNAs (long siRNAs)	Desestabilització de l'ARNm mitjançant el descapsulat i la degradació de 5'-a-3'	30-40
tasiRNAs	Escissió endògena de l'ARNm	20-25
nat-siRNAs	Escissió de transcripcions expressades de forma constitutiva	20-25
Heterocromàtic siRNAs	Metilació directa d'ADN i histones	24
scnRNAs (small-scan RNAs)	Metilació d'histones i eliminació d'ADN i reordenació del genoma	27-30
gRNAs (guide RNAs)	Dirigir la inserció o supressió de residus d'uridina a l'ARNm (edició d'ARN)	35-78
ASRNAs	Repressió transcripcional i translacional	Incert
IRNAs (long RNAs)	Modificació de la cromatina i regulació transcripcional i post-transcripcional	>200

lncRNA

Degut a que les proteïnes són essencials per expressar els gens, s'ha dut a terme una recerca molt profunda dels RNAm (RNA missatgers). Tot i així, la recerca ha arribat

als RNA no codificants i han sigut els que ens han ajudat a entendre diversos processos patològics i biològics.

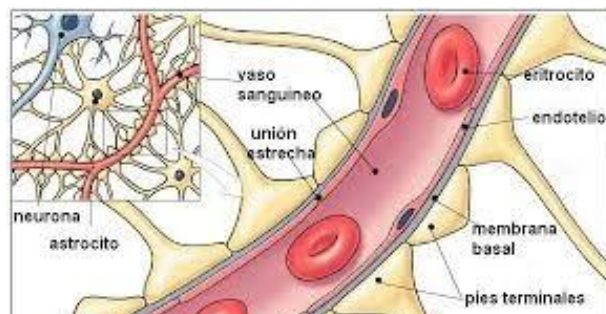
Tot i que molts miRNA (micro RNA) s'allotgen dins de gens que codifiquen proteïnes ben caracteritzats, un subconjunt d'ells es troben en ARN anotats com a llargs no codificants (lncRNA), donada la manca de marcs de lectura oberts (ORF) que és una seqüència d'ARN compresa entre un codó d'inici (AUG) de la traducció i un codó de terminació i fa possible la codificació de proteïnes. Tanmateix, els avenços recents en genòmica, perfils de ribosomes i proteòmica han revelat que nombrosos lncRNAs alberguen ORFs curts (sORF) que codifiquen petits pèptids que tenen activitats biològiques importants.

Aquests lncRNA han pres molta importància ja que tenen rols bastant dinàmics i complexos en l'eix de transducció de senyals de neurodegeneració. Per tant, s'ha observat que tenen efectes reguladors en el inici del desenvolupament de les malalties neurodegeneratives relacionades amb l'edat.

Els lncRNA són els que han pres major importància pel fet de ser unes molècules indispensables en nombrosos processos biològics com, per exemple la diferenciació, proliferació i l'apoptosi (mort cel·lular). A més a més d'altres patològics com la neurodegeneració, el desequilibri metabòlic i el càncer.

FUNCIONS DELS *NON-CODING* RNA EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

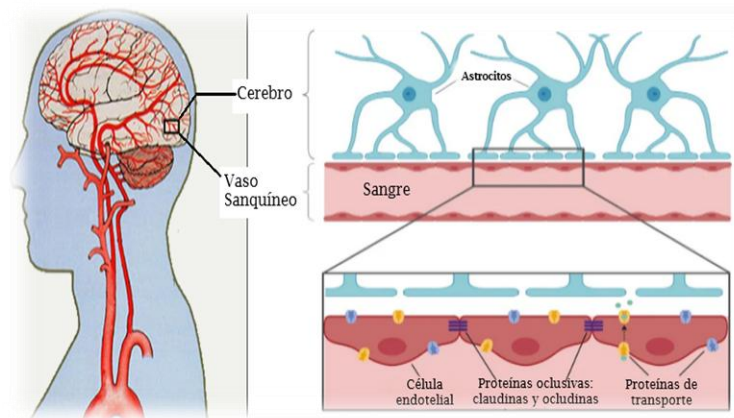
La barrera hematoencefàlica (BHE) està formada per una xarxa de vasos sanguinis, teixits i cèl·lules endotelials que recobreixen els capil·lars del cervell. La seva funció, que pren



Il·lustració 8: Parts de la barrera hematoencefàlica
<https://www.xataka.com/medicina-y-salud/tratamientos-sin-fronteras-atravesamos-de-forma-no-invasiva-la-barrera-hematoencefalica-por-primera-vez>

una importància vital, és controlar l'entrada i la sortida de diverses substàncies biològiques entre el cervell i la sang per mantenir l'activitat metabòlica en un funcionament òptim, a més a més de mantenir la funcionalitat del cervell.

En molts trastorns del sistema nerviós central, com per exemple l'Alzheimer, aquesta barrera es veu danyada. La difusió d'aquesta pot fer que hi hagi un intercanvi de soluts o molècules neurotòxiques. A més a més els ncRNA, com els miRNA, lncRNA i circRNA (RNA circular), també duen a terme una funció reguladora en la majoria de processos cel·lulars i en la BHE. Per tant, els ncRNA que han estat anomenats abans poden fer-se servir com a biomarcadors de diagnòstic i pronòstic de danys en la BHE.



Il·lustració 9: Esquema barrera hematoencefàlica

<https://multimatika.com/XXI21/C/BarreraHematoEncefalica.html>

MARC EXPERIMENTAL

Per fer l'anàlisi, primer cal adquirir una mostra del cervell *post mortem* de 3 persones sense Alzheimer i de 3 persones que van morir a l'estat de preclínic de l'Alzheimer. Després seran extretes les vesícules extracel·lulars derivades del cervell i després d'aquestes vesícules se n'extrauran la part proteica (les proteïnes).

Primer s'hauran de desnaturalitzar les proteïnes per poder-les analitzar, és a dir, "desenrotllar-les" per després fragmentar-les a trossos més petits (pèptids) els quals, mitjançant la tècnica de cromatografia líquida amb espectrometria de masses (LC-MS/MS), seran identificats. Amb el programa Peaks s'obtindran els pèptids que siguin exclusivament derivats de les vesícules extracel·lulars que van ser extretes anteriorment.

Finalment, amb les dades obtingudes ja es pot realitzar l'anàlisi. Per a les conclusions, cal buscar informació sobre les proteïnes *long-non-coding* que presenten diferències significatives entre els controls i els AD3 (estadi preclínic).

METODOLOGIA

MATERIALS

Per poder disseccionar els teixits:

- Agulles dissecció
- Sondes dissecció
- Bisturís estèrils d'un sol ús
- Pinces dissecció
- Bisturís
- Fulles de bisturí
- Tisores dissecció
- Cubetes dissecció

Reactius

1. 1X PBS (concentracions especificades en els següents punts)
 - NaCl: 137 mM
 - KCl: 2.7 mM
 - Na₂HPO₄: 10 mM
 - KH₂PO₄: 1.8 mM
2. Acetat d'amoni (AA) 100 mM complementat amb pastilles de còctels inhibidors de la proteasa
3. Acetona refrigerada (- 20 ° C)
4. Urea 16 M
5. Tampó de bicarbonat d'amoni (ABB) 100 mM
6. Aigua HPLC
7. Ditiotreitòl (DTT)
8. Iodoacetamida (IAA)
9. Àcid fòrmic (FA)
10. Acetonitril
11. Hidròxid d'amoni al 0,02%

MÈTODES

Adquisició de mostres de cervell

Els teixits cerebrals *post mortem* s'obtenen de donants amb la malaltia de l'Alzheimer detectada en l'autòpsia juntament amb altres demències o controls coincidents per edat.

Els teixits cerebrals es congelen en nitrogen líquid en el moment de l'autòpsia i s'emmagatzemen a - 150 °C fins al moment del seu ús. Els teixits d'aquests cervells es disseccionen en trossos petits i s'eliminen grans vasos sanguinis. Després es renten tres vegades amb 1X PBS³ durant 30 min.

³ 1X PBS: Solució salina tamponada amb fosfat (PBS) és una solució isotònica que s'utilitza en moltes aplicacions de recerca biològica

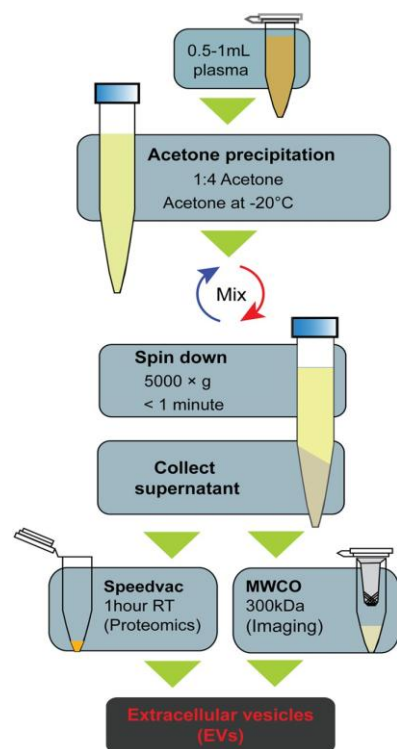
Per poder dur a terme aquest procediment abans s'ha d'obtenir el consentiment informat de tots els subjectes o del seu representant legal.

Obtenció de vesícules extracel·lulars (VEs) de cervell mitjançant PROSPR

L'obtenció de les vesícules extracel·lulars en aquest experiment es va dur a terme mitjançant la tècnica del PROSPR (*Protein Organic Solvent Precipitation*). Aquest és un mètode que pot separar de manera eficient a vesícules extracel·lulars de mostres biològiques humanes.

Això es realitza mitjançant l'enriquiment de diverses vesícules extracel·lulars procedents del plasma de la sang humana el qual farà que tinguin diversos avantatges en els mètodes d'ultracentrifugació, una càmera al buit i refrigerada que conté un rotor, el qual és manejat per un motor elèctric capaç de girar a alta velocitat. Per tant, és més fàcil la seva separació.

Els teixits cerebrals de cada subjecte s'homogeneïtzen amb tampó d'homogeneïtzació sense detergent (acetat d'amoni (AA) 100 mM complementat amb pastilles de còctels inhibidors de la proteasa) conservant les fraccions EV i utilitzant la batedora de bala homogeneïtzadora de teixits. A continuació, es van rentar les perles metàl·liques de la batedora (de 0,9 a 2,0 mm de diàmetre) per triplicat amb 1X PBS (buffer de



Il·lustració 10: Diagrama esquemàtic que representa els passos del mètode implicats en l'aïllament dels EV del plasma sanguini humà mitjançant PROtein Organic Solvent PREcipitation (PROSPR). <https://www.nature.com/articles/srep14664>

fosfats) durant 30 min abans de barrejar-les amb teixits cerebrals a una proporció 1:1 (p/p).

Tots els procediments detallats per a l'obtenció de fraccions cerebrals EV es realitzen a 4 °C. L'homogeneïtzació del cervell es duu a terme en quatre cicles amb 300 µL de tampó d'homogeneïtzació i 5 min d'homogeneïtzació per cicle.

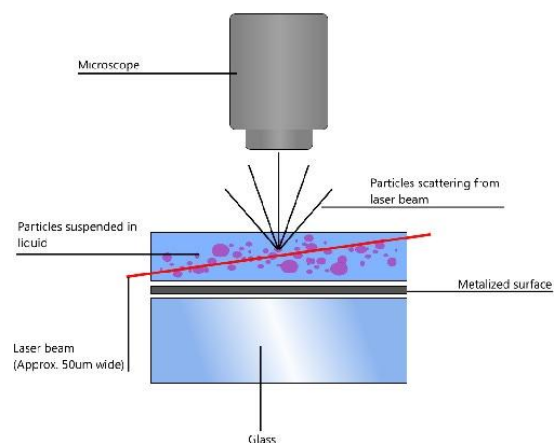
Els dos primers cicles es fan a intensitat mitjana, mentre que els dos últims cicles es realitzen a intensitat màxima. Al final de cada cicle, el que hem homogeneïtzat es centrifuga a 15000 × g durant 10 min i es van combinar els sobrenedants (parts que es mantenen a sobre de l'aigua després de la centrifugació) obtinguts.

Les vesícules extracel·lulars s'enriqueixen a partir dels homogeneïtats sense detergent mitjançant PROSPR tal com s'ha descrit anteriorment. En resum, els homogeneïtats cerebrals processats com s'ha indicat anteriorment per minimitzar els contaminants dels teixits en els preparats EV cerebrals es barregen amb quatre volums d'acetona refrigerada (– 20 ° C), es vortexen i centrifuguen a 5000 × g durant menys d'un minut. Els sobrenedants que contenen fraccions EV hidrofòbiques es concentren fins a gairebé la sequedat al concentrador al buit.

Caracterització de les vesícules extracel·lulars mitjançant *Nanoparticle Track Analysis (NTA)* i *Transmission Electron Microscopy (TEM)*.

D'una banda hi ha l'anàlisi de seguiment de nanopartícules o bé *Nanoparticle Track Analysis (NTA)* que utilitza les propietats de la dispersió de la llum i el moviment brownià⁴ per tal d'obtenir la distribució de la mida de les nanopartícules, en el cas

d'aquest estudi vesícules extracel·lulars,



Il·lustració 11. Esquema de la configuració òptica utilitzada en NTA.

<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3936>

⁴ Moviment brownià: moviment aleatori que s'observa a les partícules que es troben en un medi fluid, com a resultat de xocs contra les molècules d'aquest fluid

de les mostres que es troben en suspensió líquida.

Les partícules en suspensió líquida es carreguen en una cambra de mostra, que s'il·lumina per un raig làser de forma especial. Les partícules són les que en el recorregut del feix dispersen la llum làser que es recull fàcilment per l'objectiu del microscopi 20x i es veu amb una càmera digital. Aquesta càmera captura un vídeo de les partícules que es mouen sota el moviment brownià. El NTA analitza moltes partícules individualment i simultàniament (partícula per partícula), a més a més calcula els seus diàmetres hidrodinàmics utilitzant l'equació de Stokes Einstein. Els instruments *NanoSight* proporcionen mesures de mida de nanopartícules d'alta resolució, mentre que un mode de fluorescència proporciona resultats específics per a partícules etiquetades adequadament. Amb el seguiment en temps real, es proporcionen canvis subtils en les característiques de les poblacions de partícules amb totes aquestes anàlisis confirmades per validació visual. Els paràmetres d'anàlisi de l'instrument *Nanosight* es van establir de la següent manera:

- Temps de captura: 60 s
- Nivell de càmera: 4
- Obturador lliscant: 50
- Guany lliscant: 100
- FPS⁵: 32,5
- Velocitat de la bomba de xeringa: 100
- Volum total per mostra: 1 ml
- Viscositat: 0,906–0,910 p
- Temperatura: ~ 24 °c

No es van establir àrees restringides durant les anàlisis; així, tot el contingut de vesícules de la mostra es va sotmetre a caracterització.

D'altra banda, els microscopis electrònics de transmissió (TEM) els qual són uns microscopis que utilitzen un feix de partícules d'electrons per visualitzar mostres i

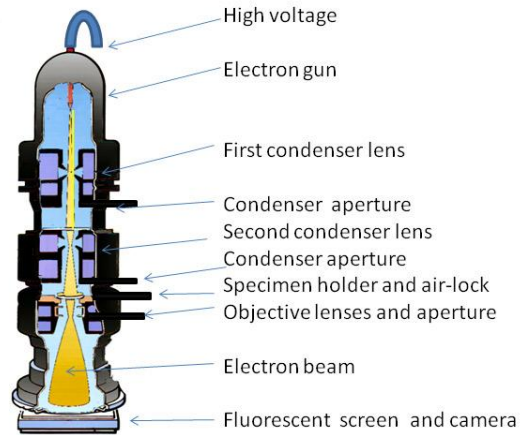
⁵ FPS (fotograma per segon): unitat de mesura que indica la freqüència a la qual un reproductor o un enregistrator d'imatges genera els diferents fotogrames, rep aquest nom perquè determina el nombre d'imatges que apareixen en un sol segon.

generar una imatge molt ampliada, fins a 2 milions de vegades utilitzen un feix d'electrons d'alta tensió per crear una imatge. Un canó d'electrons a la part superior d'un TEM emet electrons que viatgen a través del tub de buit del microscopi. En lloc

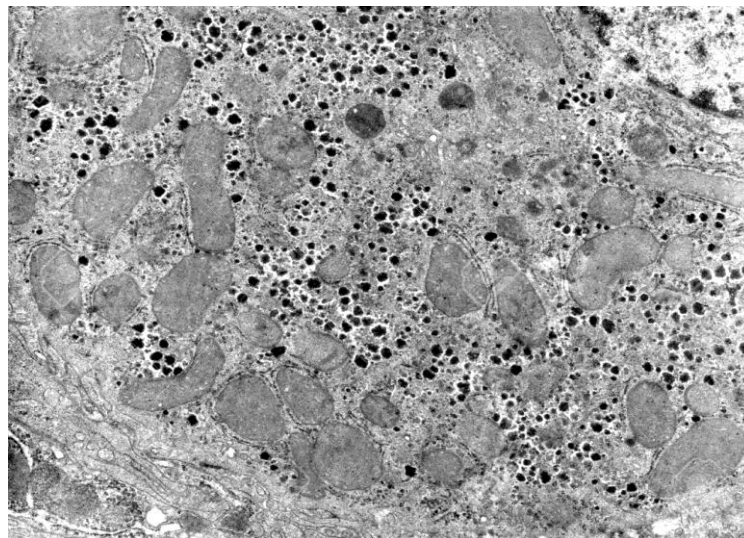
de tenir una lent de vidre que enfoca la llum (com en el cas dels microscopis de llum), el TEM utilitza una lent electromagnètica que enfoca els electrons en un feix molt fi. Aleshores, aquest feix travessa l'exemplar, que és molt prim, i els electrons es dispersen o xoquen amb una pantalla fluorescent a

la part inferior del microscopi. A la pantalla apareix una imatge de l'exemplar amb les seves parts variades

mostrades en diferents tons segons la seva densitat. Aquesta imatge es pot estudiar directament dins del TEM o fotografiar-la.



Il·lustració 12: Esquema simplificat d'un microscopi electrònic de transmissió. Dibuix de Graham Colm, cortesia de Wikimedia Commons. <https://www.ccberr.ucsb.edu/ucsb-natural-history-collections-botanical-plant-anatomy/transmission->



Il·lustració 13: Micrografia de microscopi electrònic de transmissió (TEM) https://es.123rf.com/photo_97131105_micrograf%C3%ADa-de-microscopio-electr%C3%B3nico-de-transmisi%C3%B3n-tem-que-muestra-varios-org%C3%A1nulos-mitocondrias-lisomas-.html

Processament de les VE per a l'obtenció de la fracció proteica

Les vesícules extracel·lulars (EV) aïllades amb PROSPR es dissolen en urea 16 M, tampó de bicarbonat d'amoni (ABB) 100 mM, després es van diluir dues vegades amb aigua HPLC⁶. Les proteïnes constituents de l'EV es digereixen tal com es va descriure anteriorment amb el mètode PROSPR. Les EV lisades, és a dir, trencades, es redueixen amb 20 mM de ditiotreitòl (DTT) a 30°C durant 3 h, després es produeix una alquilació⁷ amb iodoacetamida (IAA) de 55 mM durant 1 h a temperatura ambient i en un ambient fosc. Les mostres es dilueixen a < 1 M d'urea amb 50 mM d'ABB. La digestió nocturna de la tripsina es realitza a 37°C mitjançant una relació enzim-proteïna (p/p) d'1:20 amb tripsina modificada de grau de seqüenciació i la digestió proteolítica s'apaga mitjançant l'addició d'àcid fòrmic (FA) al 0,5%. Els pèptids digerits amb tríptics de les fraccions EV es dessalen amb un cartutx C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA). L'elució dels pèptids EV cerebrals es realitzen mitjançant 1ml de 75% acetonitril, 0,1% FA. A continuació, els eluats s'assequen al concentrador al buit i es reconstitueixen en 200 µL d'hidròxid d'amoni al 0,02% per al fraccionament posterior per HPLC⁸.

Anàlisi del proteoma mitjançant espectrometria de masses

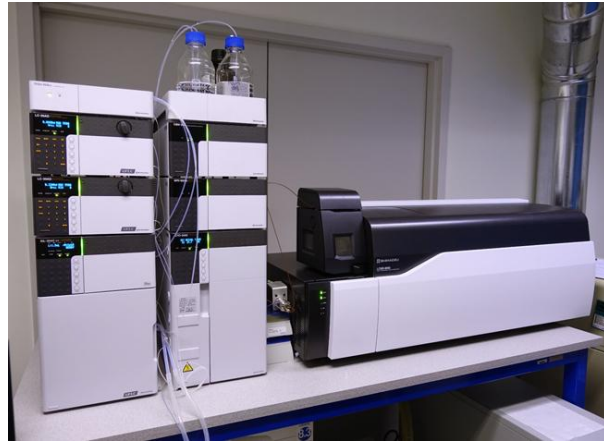
Per fer l'anàlisi, primer cal adquirir una mostra del cervell *post mortem* de 3 persones sense Alzheimer i de 3 persones que van morir a l'estat preclínic de la malaltia. Després seran extretes les vesícules extracel·lulars derivades del cervell i després d'aquestes vesícules se n'extrauran la part proteica (les proteïnes).

⁶ Aigua HPLC: aigua amb més puresa en relació a l'aigua desionitzada (Tipus IV), destil·lada (Tipus III), bidestil·lada (Tipus II) i tridestil·lada (Tipus I grau reactiu).

⁷ Alquilació: transferència d'un grup alquil des d'una molècula a una altra.

⁸ HPLC o Cromatografia líquida: tècnica cromatogràfica utilitzada per identificar, quantificar, separar i purificar els diferents compostos presents en una mescla.

Les proteïnes tenen una estructura tridimensional semblant a la d'un cabdell de llana. Per poder-les analitzar cal desnaturalitzar, és a dir, “desenrotllar-les” per després fragmentar-les a trossos més petits (pèptids). Aquests pèptids,



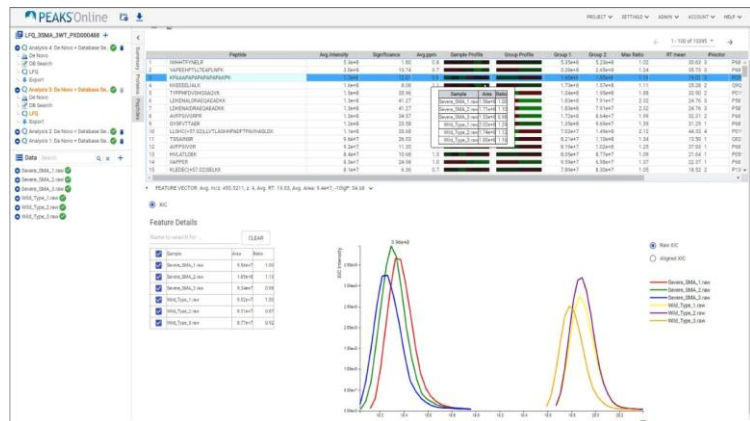
mitjançant la tècnica de cromatografia líquida amb espectrometria de masses (LC-MS/MS), seran identificats.

Il·lustració 14: Màquina LC-MS/MS:

<https://www.mccrone.com/mm/lc-msms-chemical-analysis/>

Bioinformàtica i anàlisi de dades

Al programa *Peaks*, que possibilitarà l'anàlisi, s'introduirà una base de dades específica per a proteïnes que procedeixen de lncRNAs. Un cop realitzat aquest primer filtrat, també es farà un segon filtrat dels pèptids



Il·lustració 15: Programa Peaks <https://www.bioinfor.com/peaks-online/>

que coincideixen amb parts de proteïnes humanes que no procedeixen de lncRNAs per assegurar que els pèptids que s'obtinguin siguin exclusivament derivats de les vesícules extracel·lulars que van ser extretes anteriorment. Finalment, el darrer filtratge es va fer per a PTMs (*post transcriptional modifications*). Aquest procés serà realitzats un total de 3 cops per obtenir uns resultats més fiables. Amb les dades obtingudes ja es pot realitzar l'anàlisi, representant-la en una gràfica. Per a les conclusions, cal buscar informació sobre les lnc-proteïnes que presenten diferències significatives entre els controls i els AD3 (estadi preclínic).

ANÀLISI I DISCUSSIÓ DE DADES

Es van recollir les dades en una taula (*Taula 2*) i, a partir de la informació que conté, es va fer una recerca d'articles científics ens els quals s'expliqués quina era la funció de la proteïna o del gen en qüestió i es va establir la relació que tenia amb la malaltia de l'Alzheimer.

Tabla 2: Proteïnes Inc obtingudes amb diferència significativa en l'etapa del Control i l'AD3

Inc protein	Predicted (LS) mean diff,		Significance	Adjusted P Value
Inc-ANKRD22- 1:2	4,625	1.623 to 7.627	****	<0.0001
Inc-C12orf73- 1:1	5,139	2.136 to 8.141	****	<0.0001
Inc-C5orf60-3:7	4,444	1.442 to 7.447	****	<0.0001
Inc-GNG4-8:1	-4,236	-7.239 to - 1.234	****	<0.0001
Inc-HRAS-4:1	3,056	0.05311 to 6.058	*	0,0372
Inc-HSP90AA1- 5:3	5,903	2.900 to 8.905	****	<0.0001
Inc-NOS2-12:1	3,236	0.2337 to 6.239	*	0,0131
Inc-PHB2-1:2	4,222	1.220 to 7.225	****	<0.0001
Inc-PHB2-1:3	6,333	3.331 to 9.336	****	<0.0001
Inc-TAOK3-9:1	-4,792	-7.794 to - 1.789	****	<0.0001
Inc-TIMM17B- 2:1	3,389	0.3864 to 6.391	**	0,0052

NCAM1	-3,764	-6.766 to - 0.7614	***	0,0005
Inc-CISH-2:1	4,444	1.442 to 7.447	****	<0.0001
Inc-HNF1B-2:4	4,333	1.331 to 7.336	****	<0.0001
Inc-EIF2AK3- 4:77	-3,75	-6.752 to - 0.7476	***	0,0005

- **P-Value:** paràmetre estadístic per saber la probabilitat que efectivament la diferència entre les dues condicions és significativa (encara que sembla que hauria de ser al revés, com més petit el P-value millor).
- **Significance:** quantes més estrelles tingui (fins a 4) la diferència és més significativa.
- **Predicted (LS) mean diff:** es refereix a la variabilitat de les mesures per a cada condició (si hi ha molta variació entre les diferents mostres).

La taula anterior mostra els Inc que han mostrat un diferència estadísticament significatives entre els controls i l'AD3 (estadi preclínic de l'Alzheimer).

En aquest anàlisi observarem el signe dels valors pel paràmetre *Predicted (LS) mean diff*. Els valors positius volen dir que està n'hi ha més quantitat, és a dir està més expressada, en el control que en l'AD3 mentre que els valors negatius signifiquen que hi ha una expressió més alta en l'AD3.

Inc-ANKRD22-2:1

Pel que fa a la primera proteïna, Inc-ANKRD22-1:2, aquesta codifica al gen ANKRD22. Aquest s'ha vist en el estudi de Han, J., Feng, G. H., Liu, H. W., Yi, J. P., Wu, J. B., & Yao, X. X. (2022) que pot estar estretament associat a l'expressió de la IL-6 (Interleucina-6). La IL-6 es antagonista de las calloles T reguladores que formen una part important del sistema immunitari adaptatiu, el qual permet mantenir l'homeòstasi o equilibri intern davant d'agressions externes, ja siguin de naturalesa

biològica (agents patògens) o fisicoquímiques (com contaminants o radiacions) i internes (per exemple, cèl·lules canceroses). És per això mateix que podria ser un factor que ajudés a l'expansió de la malaltia de l'Alzheimer.

lnc-C12orf73-1:1

En un estudi realitzat per Hernán Guillermo Hernández (2015), es mostra que el grau de metilació⁹ del gen C12orf73, codificat per la proteïna lnc-C12orf73-1:1, disminueix en el transcurs de la malaltia d'Alzheimer. La metilació de l'ADN és un mecanisme epigenètic que controla l'expressió gènica. A la malaltia d'Alzheimer (EA) s'ha trobat hipometilació global (pèrdua de metilació global) de l'ADN en neurones del còrtex cerebral humà. Veiem que aquesta proteïna està més expressada en el control que en el l'AD3, per tant, si aquestes van disminuint el seu grau de metilació pot ajudar a la proliferació de la malaltia.

lnc-C5orf60-3:7

Com bé es diu en "*Homo sapiens gene C5orf60, encoding chromosome 5 open reading frame 60*" de NCBI, hi ha un article que es refereix específicament a al gen C5orf60 a PubMed on es comunica que, fins on sabem, encara no s'ha informat de cap fenotip, en altres paraules, encara no se sap la funció *in vivo* d'aquest gen.

lnc-GNG4-8:1

Downes GB, Gautam N. van dir que GNG4 és un modulador i transductor de diversos sistemes de senyalització transmembrana. La variació genètica comuna a aquest gen va ser associada amb el deteriorament cognitiu. Segons el conjunt de dades de teixit cerebral humà que mostren Luke W. Bonham, BS, Daniel S. Evans (et. Al.), aquest

⁹ Metilació: La metilació de l'ADN és un marcador epigenètic (que canvia la forma com s'expressen els gens) que identifica la cadena motlle durant la replicació de l'ADN i l'origen parental de regions improntades, regula els transposons, l'empremta genòmica i l'expressió gènica.

gen mostrà una major expressió a l'hipocamp¹⁰ en relació amb altres regions del cervell; l'expressió de GNG4 disminueix amb l'avenç de l'edat. Conclouen afirmant que les anàlisis de variació genètica i les dades d'expressió gènica suggereixen que GNG4 pot estar associat amb un declivi cognitiu en l'envelliment normal.

lnc-HRAS-4:1

En “Pruebas genéticas - Costello, Síndrome de Costello - (Costello syndrome)” anuncia que lnc-HRAS-4:1 (proteïna H-Ras), involucrada principalment en la regulació de la divisió cel·lular. A través d'un procés conegut com la transducció de senyals, la proteïna H-Ras transmet els senyals de l'exterior de la cèl·lula al nucli cel·lular. La proteïna H-Ras és una GTPasa, cosa que significa que converteix la molècula GTP en una molècula de GDP. Les proteïnes H-Ras actuen com un interruptor, i s'activen i desactiven per les molècules GTP i GDP. Per transmetre senyals, la proteïna ha d'estar activada mitjançant la unió a una molècula de GTP. La proteïna H-Ras s'inactiva quan converteix GTP a GDP ja que quan la proteïna està lligada al GDP, no transmet senyals al nucli cel·lular.

El gen HRAS, pertany a una classe de gens coneguts com a oncògens¹¹. Quan els oncògens tenen mutacions, poden fer que les cèl·lules normals es tornin canceroses. Tot i així, no s'ha demostrat que guardi cap relació amb la malaltia de l'Alzheimer.

lnc-HSP90AA1-5:3

Com bé diuen Zuehlke, A. D., Beebe, K., Neckers, L., & Prince, T. (2015), La proteïna Hsp90, codificada pel gen HSP90AA1, Hsp90 és una proteïna essencial en tots els eucariotes i desencadena el paper d'un regulador important del plegament de proteïnes a la cèl·lula. Bohush, A., Bieganowski, P., & Filipek, A. (2019) expliquen que

¹⁰ Hipocamp: regió petita del cervell i més específicament del lòbul temporal que és reconeguda per ser part important del sistema límbic per la seva implicació amb la memòria a llarg termini i la memòria declarativa.

¹¹ Oncògen: gen anormal o activat que procedeix de la mutació d'un al·lel d'un gen normal anomenat protooncogen.

hi ha gran quantitat d'evidències que donen suport a que la proteïna Hsp90 i els seus co-xaperons tenen un paper decisiu en el plegament i la degradació de proteïnes distintives implicades en diverses malalties neurodegeneratives. Ells mateixos en el article "*Hsp90 and its co-chaperones in neurodegenerative diseases*" conclouen que les xaperones¹² i co-xaperones poden tenir un paper crucial en la protecció de les cèl·lules contra l'acumulació de dipòsits de proteïnes patològiques en malalties com el Alzheimer.

Lnc-NOS2-12:1

Colton, C. A., Vitek, M. P., Wink, D. A., Xu, Q., Cantillana, V., Previti, M. L., ... & Dawson, H. (2006) en el seu article "*NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease*" expliquen que el NO pot ser un factor clau que connecta les patologies amiloides i tau. L'eliminació genètica de la NOS2 en ratolins que expressen proteïna precursora d'amiloide mutada dona lloc a una hiperfosforilació patològica de la proteïna tau del ratolí, la seva redistribució al compartiment somatodendrític de les neurones corticals i de l'hipocamp i la formació d'agregats. La manca de NOS2 a la proteïna precursora de l'amiloide ratolí mutant suec va augmentar els nivells de pèptids beta-amiloide insolubles, la degeneració neuronal, l'activació de la caspasa-3 i la divisió tau, cosa que suggereix que el NO actua en un punt d'unió entre els pèptids beta-amiloide, l'activació de la caspasa¹³, i l'agregació tau.

Lnc-PHB2-1:2 / Lnc-PHB2-1:3

Com bé diuen Jiang, T., Wang, J., Li, C., Cao, G., & Wang, X. (2022), els membres de la família PHB, inclòs el PHB2, es van trobar originalment al nucli cel·lular i s'han identificat com a inhibidors de la proliferació cel·lular. Estudis recents *in vitro* i *in vivo* han revelat que els PHB tenen un rol important relacionat amb malalties del sistema nerviós. Els PHB poden prevenir l'apoptosi, la inflamació, la disfunció

¹² Xaperones: grup de proteïnes que tenen similitud funcional i ajuden al plegament de proteïnes.

¹³ Caspases: mediadors essencials dels processos d'apoptosi, la mort cel·lular programada.

mitocondrial i l'autofàgia en trastorns neurològics mitjançant diferents molècules i vies. Per tant, els PHB mostren un gran potencial en la protecció dels trastorns neurològics, com pot ser l'Alzheimer.

Lnc-TAOK3-9:1

En el estudi de Huang, Y., Sun, X., Jiang, H., Yu, S., Robins, C., Armstrong, M. J., ... & Qin, Z. S. (2021) es troba un enriquiment de cinases (ALPK3, DMPK, MAP3K11, MAP4K1 i TAOK3) als llocs EWASplus superiors. Aquesta fet és especialment rellevant per a l'Alzheimer ja que la hiperfosforilació patològica de la proteïna tau és una característica neuropatològica distintiva de l'Alzheimer. Les TAOK (mil i un aminoàcid cinases, també anomenades quinases semblants a STE20 derivades de la pròstata [PSK]) s'han investigat àmpliament per la seva capacitat per fosforilar MAPT i regular el conjunt de microtúbuls. Per exemple en el estudi de Tavares, I. A., Touma, D., Lynham, S., Troakes, C., Schober, M., Causevic, M., ... & Morris, J. D. (2013), es demostra que la proteïna tau és un substrat per a PSK, un grup de quinases i suggereixen que aquesta família de molècules, que inclouen la PSK3 (TAOK3) podria contribuir al desenvolupament de la patologia de l'AD i la demència.

Lnc-TIMM17B-2:1

Com bé diuen Bogorodskiy, A., Okhrimenko, I., Burkatovskii, D., Jakobs, P., Maslov, I., Gordeliy, V., ... & Borshchevskiy, V. (2021), la proteïna TIMM17B és una de les variants de la proteïna TIMM17, juntament amb la TIMM17A que no és tan abundant. La proteïna TIMM17 és un dels principals components de la translocasa del complex de la membrana mitocondrial interna 23 (TIM23), que classifica les proteïnes a la matriu mitocondrial interna (IMM). Aquest article també menciona que, com que es sap que la funció mitocondrial disminueix amb l'edat, es va formular la hipòtesi de la "cascada mitocondrial". Aquesta suggereix que els mitocondris són desencadenant i objectiu de la disfunció intracel·lular intervinguda per A β (β -amiloide) i el dany en les primeres etapes de l'AD. L'exposició als pèptids A β monomèrics i oligomèrics (A β) afecta negativament la funció mitocondrial,

provocant un augment de l'estrès dels radicals lliures (especialment ROS) i danys al genoma mitocondrial, alterant així el funcionament normal de les neurones.

NCAM1

Pel que fa a la proteïna NCAM1 es va observar que els nivells de PPA a la membrana del teixit neuronal variaven de 20-50% amb la presència de la proteïna d'adhesió NCAM (per la seva sigla en anglès 'molècula d'adhesió de cèl·lules nervioses'), la qual cosa indica un equilibri entre la Proteïna Precursora d'Amiloide (PPA). Aquest tipus de molècules d'adhesió cel·lular són del grup de les glicoproteïnes, es troben a la superfície de la majoria de les cèl·lules i tenen una especificitat molt alta, és a dir, tenen característiques que fan que solament siguin afines amb certes molècules. Poden haver-hi dos tipus d'adhesions: l'adhesió cèl·lula a cèl·lula o l'adhesió de la cèl·lula amb la matriu extracel·lular. És per això que pot ser que adhereixin la proteïna β -amiloide en aquests dos llocs.

Lnc-CISH-2:1

La proteïna que forma part dels supressors de proteïnes de senyalització de citocines (SOCS)¹⁴, que també es diu inhibidor STAT induït per citocines (CIS), és una proteïna que en humans està codificada pel gen CISH i els seus ortòlegs¹⁵ s'han identificat en la majoria de mamífers amb genomes seqüenciats. Aquesta proteïna controla la senyalització del receptor de cèl·lules T (TCR) i les variacions de CISH amb certs SNP¹⁶

¹⁴ SOCS: proteïnes estan implicades en la restricció de les vies de senyalització cel·lular millorant la degradació dels receptors activats i eliminant els estímuls per a una activació continuada.

¹⁵ Ortòleg: quan una espècie divergeix en dues espècies separades, es diu que les còpies d'un sol gen de les dues espècies resultants són ortòlogues.

¹⁶ SNP: variació en la seqüència d'ADN que afecta una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) d'una seqüència del genoma

que s'associen amb la susceptibilitat a la bacterièmia, la tuberculosi i la malària. No obstant, no s'ha trobat una relació específica amb la malaltia de l'Alzheimer. Com bé diuen Walker, D. G., Whetzel, A. M., & Lue, L. F. (2015): "Tot i que en l'expressió dels gens clau SOCS no va canviar en gran mesura el seu resultat a la patologia de l'Alzheimer, hi va haver un augment significatiu dels nivells d'ARNm de SOCS-2, SOCS-3 i CIS i un augment dels nivells de proteïnes de SOCS-4 i SOCS-7. al cervell de l'AD. En resum, no hi va haver evidència d'un dèficit d'aquestes proteïnes clau reguladores de la inflamació en cervells vells o d'AD". Per tant, no està clara la seva implicació en la malaltia.

Lnc-HNF1B-2:4

Pel que fa a la proteïna HNF1B s'ha vist en diversos estudis que correspon a una relació amb la diabetis tipus II especialment en persones grans. Per exemple, en MedicinePlus afirmen que es troba en molts òrgans i teixits, inclosos els pulmons, el fetge, els intestins, el pàncrees, els ronyons, el tracte genital i el tracte urinari i es creu que té un paper en el seu desenvolupament. És especialment important per al desenvolupament i la funció dels ronyons i les cèl·lules beta del pàncrees.

Les cèl·lules beta produeixen i alliberen (secreten) l'hormona insulina. La insulina ajuda a regular els nivells de sucre en la sang controlant la quantitat de sucre (en forma de glucosa) que passa del torrent sanguini a les cèl·lules per utilitzar-la com a energia. No obstant, no s'ha trobat que guardés cap relació en específic amb la malaltia de l'Alzheimer.

Lnc-EIF2AK3-4:77

Pel que fa a la proteïna EIF2AK3, a l'estudi realitzat en el article de Wong, T. H., van der Lee, S. J., van Rooij, J. G., Meeter, L. H., Frick, P., Melhem, S., ... & van Swieten, J. C. (2019), es van seqüenciar 19 exomes de 8 famílies holandeses amb una alta càrrega d'AD i es va identificar EIF2AK3, que codificava per a la proteïna quinasa del reticle endoplasmàtic semblant a l'ARN (PERK), com a gen candidat. L'anàlisi va mostrar una associació significativa d'EIF2AK3 amb AD que estaven protagonitzades per variants rares, com la variant p. R240H. Aquest estudi suggereix que les variants rares d'EIF2AK3 poden estar associades amb el risc de malaltia de l'Alzheimer, no obstant, encara falta saber de quina manera ho fan i com poder minimitzar el risc.

SEGON ANÀLISI DE LES DADES

A l'analitzar més detalladament les dades obtingudes i comparant-les amb els valors de la taula, els quals indicaven en quin estadi estava més expressat el gen o la proteïna he pogut observar una notòria incongruència. Les proteïnes lnc-ANKRD22-1:2, lnc-C12orf73-3:7, lnc-HSP90AA1-5:3 i lnc-TIMM17B-2:1, que s'indicava que estaven més expressades en el grup control, és a dir, les d'un cervell sà, resultaven tenir una funció estretament relacionada amb l'Alzheimer, com bé es pot observar en l'anàlisi de dades anterior.

VALORACIÓ (NOVA LÍNIA DE RECERCA)

El fet de trobar-nos amb aquesta incoherència fa que es pugui plantejar una nova hipòtesis que expliqui el fet anterior i, conseqüentment, s'obrirà una nova línia de recerca envers l'àmbit de l'Alzheimer.

D'una banda, una hipòtesis possible pot ser que hi hagi alguna molècula que actuï com a inhibidora d'aquestes proteïnes o bé que faci que no puguin dur a terme la

seva funció que afavoreix el desenvolupament de l'Alzheimer. D'altra banda, pot ser que els gens tinguin poca penetrància¹⁷ i que, per tant, no es manifesti en el fenotip dels individus fent que no desenvolupin la malaltia neurodegenerativa en qüestió.

¹⁷ Penetrància: la freqüència amb que un gen es manifesti en el fenotip dels individus.

CONCLUSIONS

Per una banda, hem trobat que hi ha proteïnes/micropèptids que independentment del gen que la codifica o ella mateixa, poden tenir diverses implicacions en la malaltia de l'Alzheimer, fent correcta la nostra hipòtesi inicial.

També s'ha vist que hi ha micropèptids que poden actuar de manera beneficiosa per l'individu, com són:

- el lnc-HSP90AA1-5:3, del grup de les Hsp90, que desenvolupen un paper crucial en la protecció de les cèl·lules contra l'acumulació de dipòsits de proteïnes patològiques en malalties com el Alzheimer
- el lnc-PHB2-1:2 / lnc-PHB2-1:3, que forma part del grup de les PHB, les quals poden prevenir l'apoptosi, la inflamació, la disfunció mitocondrial i l'autofàgia en trastorns neurològics mitjançant diferents molècules i vies
- el lnc-NOS2-12:1 que actua en un punt d'unió entre els pèptids beta-amiloide, l'activació de la caspasa (mediador que pot provocar la mort cel·lular), i l'agregació tau.

D'altra banda, trobem micropèptids que afavoreixen l'expansió i el progrés de la malaltia com són els que contenen aquesta taula:

Tabla 3: Funcions de les proteïnes perjudicials

MICROPÈPTID	FUNCIÓ
lnc-ANKRD22-2:1	Altera l'homeòstasi o equilibri intern davant d'agressions externes, ja siguin de naturalesa biològica (agents patògens) o fisicoquímiques (com contaminants o radiacions) i internes (per exemple, cèl·lules canceroses).
lnc-C12orf73-1:1	Afavoreix la hipometilació global (pèrdua de metilació global) de l'ADN en neurones del còrtex cerebral humà,

factor que pot ajudar a la proliferació de la malaltia.

Lnc-TAOK3-9:1

La proteïna tau és un substrat per a PSK, un grup de quinases i suggereixen que aquesta família de molècules, que inclouen la PSK3 (TAOK3) podria contribuir al desenvolupament de la patologia de l'AD i la demència

NCAM1

Pot fer que adhereixin molècules a la cèl·lula o a la matriu extracel·lular, una d'elles pot ser la proteïna β -amiloide.

Lnc-TIMM17B-2:1

Classifica les proteïnes a la matriu mitocondrial interna (IMM), funció mitocondrial que disminueix amb l'edat i que es desencadeni la disfunció intracel·lular mediada per $A\beta$ (β -amiloide) i el dany en les primeres etapes de l'AD.

També hi ha altres micropèptids que

- no han presentat cap relació amb l'Alzheimer
 - lnc-C5orf60-3:7
 - lnc-HRAS-4:1
 - lnc-HNF1B-2:1
- sí que guarden una relació però encara és desconeguda , conseqüentment, queda per descobrir de quina manera afecten a la malaltia. Aquests són:
 - lnc-GNG4-8:1
 - lnc-CISH-2:1
 - lnc-EIF2AK3-4:77

Finalment, s'han trobat micropèptids o gens que, tot i mostrar-se més expressats en el grup control, duien a terme una funció que ajudava al desenvolupament de la malaltia de l'Alzheimer. Aquest fet dona lloc a una nova pregunta d'investigació i obre les portes a una nova línia de recerca que ajudarà a ampliar els coneixements envers aquesta malaltia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bogorodskiy, A., Okhrimenko, I., Burkatovskii, D., Jakobs, P., Maslov, I., Gordeliy, V., ... & Borshchevskiy, V. (2021). Role of Mitochondrial Protein Import in Age-Related Neurodegenerative and Cardiovascular Diseases. *Cells*, 10(12), 3528.
2. Bonham, L. W., Evans, D. S., Liu, Y., Cummings, S. R., Yaffe, K., & Yokoyama, J. S. (2018). Neurotransmitter pathway genes in cognitive decline during aging: evidence for GNG4 and KCNQ2 genes. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias*[®], 33(3), 153-165.
3. Chen, K. P., & Dou, F. (2012). Selective interaction of amyloid precursor protein with different isoforms of neural cell adhesion molecule. *Journal of Molecular Neuroscience*, 46(1), 203-209.
4. Chowdhury, U. N., Islam, M. B., Ahmad, S., & Moni, M. A. (2020). Systems biology and bioinformatics approach to identify gene signatures, pathways and therapeutic targets of Alzheimer's disease. *Informatics in Medicine Unlocked*, 21, 100439
5. Colton, C. A., Vitek, M. P., Wink, D. A., Xu, Q., Cantillana, V., Previti, M. L., ... & Dawson, H. (2006). NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(34), 12867-12872.
6. Couch, Y., Buzàs, E. I., Di Vizio, D., Gho, Y. S., Harrison, P., Hill, A. F., ... & Carter, D. R. (2021). *A brief history of nearly EV-erything—The rise and rise of extracellular vesicles*. *Journal of extracellular vesicles*, 10(14), e12144.
7. Gallart-Palau, X., Guo, X., Serra, A., & Sze, S. K. (2020). *Alzheimer's disease progression characterized by alterations in the molecular profiles and biogenesis of brain extracellular vesicles*. *Alzheimer's research & therapy*, 12(1), 1-15.
8. Gallart-Palau, X., Serra, A., & Sze, S. K. (2016). *Enrichment of extracellular vesicles from tissues of the central nervous system by PROSPR*. *Molecular neurodegeneration*, 11(1), 1-13.

9. Gallart-Palau, X., Serra, A., Hase, Y., Tan, C. F., Chen, C. P., Kalaria, R. N., & Sze, S. K. (2019). *Brain-derived and circulating vesicle profiles indicate neurovascular unit dysfunction in early Alzheimer's disease*. *Brain pathology*, 29(5), 593-605.
10. Han, J., Feng, G. H., Liu, H. W., Yi, J. P., Wu, J. B., & Yao, X. X. (2022). *Classifying mild cognitive impairment and Alzheimer's disease by constructing a 14-gene diagnostic model*. *American journal of translational research*, 14(7), 4477.
11. Hernández Hincapié, H. G. (2015). *Estudio de patrones genómicos de metilación de ADN en enfermedad de Alzheimer orientado hacia neuronas piramidales corticales y su concordancia con leucocitos de sangre periférica*. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
12. Huang, Y., Sun, X., Jiang, H., Yu, S., Robins, C., Armstrong, M. J., ... & Qin, Z. S. (2021). *A machine learning approach to brain epigenetic analysis reveals kinases associated with Alzheimer's disease*. *Nature communications*, 12(1), 1-12.
13. Jiang, T., Wang, J., Li, C., Cao, G., & Wang, X. (2022). *Prohibitins: A Key Link between Mitochondria and Nervous System Diseases*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
14. Liu, J., Wu, J., Wang, R., Zhong, D., Qiu, Y., Wang, H., ... & Zhu, Y. (2021). *ANKRD22 drives rapid proliferation of Lgr5+ cells and acts as a promising therapeutic target in gastric mucosal injury*. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(4), 1433-1455.
15. Ni, Y. Q., Xu, H., & Liu, Y. S. (2022). *Roles of Long Non-coding RNAs in the Development of Aging-Related Neurodegenerative Diseases*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15.
16. Prel, A., Dozier, C., Combier, J. P., Plaza, S., & Besson, A. (2021). *Evidence that regulation of Pri-miRNA/miRNA expression is not a general rule of miPEPs function in humans*. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3432.

17. Sun, P., Hamblin, M. H., & Yin, K. J. (2022). *Non-coding RNAs in the regulation of blood–brain barrier functions in central nervous system disorders*. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 1-39.
18. Tavares, I. A., Touma, D., Lynham, S., Troakes, C., Schober, M., Causevic, M., ... & Morris, J. D. (2013). Prostate-derived sterile 20-like kinases (PSKs/TAOKs) phosphorylate tau protein and are activated in tangle-bearing neurons in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15418-15429.
19. The G protein subunit gene families. *Genomics*. 1999;62(3):544–552. doi:10.1006/geno.1999.5992.
20. Van Niel, G., Carter, D. R., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., & Vader, P. (2022). *Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(5), 369-382.
21. Vendrell, J.M., (2000) *Las afasias: semiología y tipos clínicos*. *REV NEUROL* 2001; 32 (10): 980-986
22. Walker, D. G., Whetzel, A. M., & Lue, L. F. (2015). Expression of suppressor of cytokine signaling genes in human elderly and Alzheimer’s disease brains and human microglia. *Neuroscience*, 302, 121-137
23. Wong, T. H., van der Lee, S. J., van Rooij, J. G., Meeter, L. H., Frick, P., Melhem, S., ... & van Swieten, J. C. (2019). EIF2AK3 variants in Dutch patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 73, 229-e11
24. Zhou, H., Hu, H., & Lai, M. (2010). Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biology of the Cell*, 102(12), 645-655.
25. Zuehlke, A. D., Beebe, K., Neckers, L., & Prince, T. (2015). Regulation and function of the human HSP90AA1 gene. *Gene*, 570(1), 8-16.

WEBGRAFIA

1. Alzheimer's association. (s. f.). *Etapas*. Alzheimer's Disease and Dementia. Recuperat 26 de juliol de 2022, de <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/etapas?lang=es-MX>
2. *ARN no codificante*. (s. f.). Recuperat 26 d'agost de 2022, de https://es-academic.com/dic.nsf/eswiki/1256150#Historia_y_Descubrimiento
3. Avello G, L., Canales-Johnson, A., Manríquez-Navarro, P., & Lanfranco G., R. (2012, septiembre). *Evaluación de la enfermedad de Alzheimer en etapa temprana: biomarcadores y pruebas neuropsicológicas*. *Alzheimer en etapa temprana*. Recuperado 23 de junio de 2022, de https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0034-98872012000900014&script=sci_arttext
4. Calvo, D. D. D. G. (2017, 13 octubre). *ARN no codificante: ¿una nueva fuente de biomarcadores?* - *Sociedad Española de Cardiología*. Recuperat 26 d'agost de 2022, de <https://secardiologia.es/blog/8896-arn-no-codificante-una-nueva-fuente-de-biomarcadores>
5. Donoso, A. (2003, noviembre). *La enfermedad de Alzheimer*. *La enfermedad del Alzheimer*. Recuperat 26 de juliol de 2022, de https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071792272003041200003&script=sci_arttext&tlng=pt
6. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/hnf1b/>
7. Mayo Clínic. (2022, 19 febrer). *Enfermedad de Alzheimer - Síntomas y causas* - *Mayo Clinic*. Recuperat 25 de juliol de 2022, de <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/symptoms-causes/syc-20350447>

8. Menéndez, G. S. (2002, octubre). *Péptido beta amiloide, proteína Tau y enfermedad de Alzheimer*. Recuperat 25 de juliol de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002002000400006&script=sci_arttext&tIng=en
9. NCBI - Homo sapiens gene C5orf60, encoding chromosome 5 open reading frame 60. (s. f.). Recuperat del 18 de octubre de 2022, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human>
10. Setó-Salvia, N., Clarimón, Jordi., (març 2010) *Genética en la enfermedad de Alzheimer*. Recuperat 25 de juliol de 2022, de https://www.researchgate.net/profile/Nuria-Seto-Salvia/publication/42390807_Genetics_of_Alzheimer's_disease/links/0046352e6690ac5e05000000/Genetics-of-Alzheimers-disease.pdf
11. User, S. (s. f.). Pruebas genéticas - Costello, Síndrome de . . . , - (Costello syndrome) - Gen HRAS. IVAMI. Recuperado 19 de octubre de 2022, de <https://www.ivami.com/es/pruebas-geneticas-mutaciones-de-genes-humanos-enfermedades-neoplasias-y-farmacogenetica/1519-pruebas-geneticas-costello-sindrome-de-costello-syndrome-gen-i-hras>

IMATGES

- Il·lustració 1. Plaques senils i cabdells de proteïna TAU
<https://alzheimermcp.site123.me/alzheimer/placas-y-ovillos> 5
- Il·lustració 2. Tres etapes del Alzheimer
<https://www.alzheimeruniversal.eu/2015/03/20/hablando-claro-hablando-del-alzheimer/alzheimer-como-afecta-el-cerebro/> 6
- Il·lustració 3. Vesícules extracel·lulars <https://www.infosalus.com/asistencia/noticia-expertos-contemplan-importancia-vesiculas-extracelulares-investigar-trastornos-endocrinos-20220425172830.html> 11
- Il·lustració 4: Estructura i composició dels exosomes i ectosomes.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982218300927#fig2> 13
- Il·lustració 5. Esquema de formació d'ectosomes i exosomes.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982218300927> 14
- Il·lustració 6. Plaques senils. <https://psicologiymente.com/neurociencias/placas-seniles> 14
- Il·lustració 7. Estructura ARN no codificant.
https://es.wikipedia.org/wiki/ARN_no_codificante 17
- Il·lustració 8: Parts de la barrera hematoencefàlica
<https://www.xataka.com/medicina-y-salud/tratamientos-sin-fronteras-atravesamos-de-forma-no-invasiva-la-barrera-hematoencefalica-por-primera-vez> 19
- Il·lustració 9: Esquema barrera hematoencefàlica
<https://multitematika.com/XXI21/C/BarreraHematoEncefalica.html> 20
- Il·lustració 10: Diagrama esquemàtic que representa els passos del mètode implicats en l'aïllament dels EV del plasma sanguini humà mitjançant Protein Organic Solvent Precipitation (PROSPR). <https://www.nature.com/articles/srep14664> 23
- Il·lustració 11. Esquema de la configuració òptica utilitzada en NTA.
<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3936> 24
- Il·lustració 12: Esquema simplificat d'un microscopi electrònic de transmissió. Dibuix de Graham Colm, cortesia de Wikimedia Commons.
<https://www.ccber.ucsb.edu/ucsb-natural-history-collections-botanical-plant-anatomy/transmission-electron-microscope> 26
- Il·lustració 13: Micrografia de microscopi electrònic de transmissió (TEM)
https://es.123rf.com/photo_97131105_micrograf%C3%ADa-de-microscopio-

electr%3%B3nico-de-transmisi%3%B3n-tem-que-muestra-varios- org%3%A1nulos-mitocondrias-lisosomas-.html.....	26
○ Il·lustració 14: Màquina LC-MS/MS: https://www.mccrone.com/mm/lc-msms-chemical-analysis/	28
○ Il·lustració 15: Programa Peaks https://www.bioinfor.com/peaks-online/	28