

Análisis funcional *in silico* de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) de astrocitos humanos bajo estrés lipotóxico y su asociación con enfermedades neurodegenerativas

Valentina González Gómez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

Janneth González Santos

Doctora en Ciencias

Codirector

Andrés Felipe Aristizábal Pachón

Doctor en Ciencias Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mis padres Sonia Gómez Parra y Oscar González Ramírez, a mi hermana Laura Sofía González Gómez, a mi pareja Oscar Javier Pulido Delgado, a mis amigos, familiares y colegas y a todos los que me acompañaron en esta etapa.

Sin ustedes nada habría sido posible.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Biología por abrirme las puertas de la institución y brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente como Bióloga. A la Pontificia Universidad Javeriana y al grupo de investigación de Bioquímica Computacional y Bioinformática por permitirme realizar este proyecto bajo la dirección de los Dres. Janneth González Santos y Andrés Felipe Aristizábal Pachón, quienes me recibieron, orientaron e instruyeron a lo largo de este proyecto. A la Dra. Natalia Gil Jaramillo por haberme guiado y apoyado. Al Dr. Daniel Osorio por creer en mis capacidades y recomendarme con los Dres. Janneth y Andrés para poder llevar a cabo el proyecto de grado en la institución. A la Universidad Nacional de Colombia y al Dr. Andrés Pinzón que me brindaron los datos que permitieron realizar este proyecto. A todos ustedes lectores.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos.....	16
1.1 Objetivo General.....	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
2. Metodología	17
2.1. Predecir <i>in silico</i> las redes de interacción de lncRNAs expresados diferencialmente en astrocitos humanos en condiciones lipotóxicas.	17
2.1.1 Obtención de los datos	17
2.1.2 Red de interacción lncRNA-miRNA-mRNA (ceRNA).....	18
2.2 Evaluar <i>in silico</i> la relación de lncRNAs de astrocitos humanos expresados diferencialmente en condiciones lipotóxicas, con procesos relevantes en enfermedades neurodegenerativas.	19
2.2.1 Análisis de enriquecimiento funcional.....	19
2.2.2 Selección y validación de ejes lncRNA-miRNA-mRNA	20
3. Resultados.....	21
3.1. Redes de interacción ceRNA predichas <i>in silico</i> de lncRNAs expresados diferencialmente en astrocitos humanos en condiciones lipotóxicas	21
3.2 Evaluación <i>in silico</i> de la relación de los lncRNAs de astrocitos humanos expresados diferencialmente en condiciones lipotóxicas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas	22
3.2.1 Análisis de enriquecimiento funcional.....	22
3.2.2 Selección de ejes lncRNA-miRNA-mRNA.....	26

3.2.3 Validación de ejes lncRNA-miRNA-mRNA.....	27
4. Discusión.....	28
5. Conclusiones.....	37
6. Recomendaciones	38
Referencias bibliográficas.....	39

Lista de Figuras

Figura 1. Ejes lncRNA-miRNA-mRNA de ambas redes ceRNA potencialmente involucradas en astrocitos bajo estrés lipotóxico 28

Lista de Apéndices

Apéndice A. Transcriptoma con perfiles de expresión de genes diferencialmente expresados.

Apéndice B. Figuras y tablas.

Apéndice C. Estudios GEO con datos de expresión de miRNAs del NCBI.

Apéndice D. Términos GO y rutas PANTHER lncRNA AC092687.3 sin filtrar.

Apéndice E. Términos GO y rutas PANTHER lncRNA AC092687.3 filtradas.

Apéndice F. Términos GO y rutas PANTHER lncRNA SERTAD4-AS1 sin filtrar.

Apéndice G. Términos GO y rutas PANTHER lncRNA SERTAD4-AS1 filtradas.

Nota: Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS

Glosario

Cyto-c: Citocromo C.

DAMP: Patrones moleculares asociados al daño.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EN: Enfermedades neurodegenerativas.

EP: Enfermedad de Parkinson.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica.

EH: Enfermedad de Huntington.

GO: Gene Ontology.

In silico: Análisis realizado de forma computacional.

lncRNA: RNA largo no codificante.

miRNA: microRNA.

mtDNA: ADN mitocondrial.

MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial.

PA: Ácido palmítico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Resumen

Título: Análisis funcional *in silico* de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) de astrocitos humanos bajo estrés lipotóxico y su asociación con enfermedades neurodegenerativas *

Autor: Valentina González Gómez **

Palabras Clave: lncRNAs, miRNAs, lipotoxicidad, neurodegeneración, astrocitos, bioinformática, neuroinflamación.

Descripción: Las enfermedades neurodegenerativas (EN) son trastornos progresivos e irreversibles que causan deterioro neurológico gradual. El incremento de factores de riesgo como la obesidad han contribuido al aumento de casos de EN. La obesidad puede derivar en lipotoxicidad, afectando la función de neuronas y astrocitos a través de la inducción de factores neuroinflamatorios y otros efectos que pueden contribuir al desarrollo de las EN. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en este proceso no están completamente esclarecidos. Recientemente se ha demostrado que los RNA largos no codificantes (lncRNA) cumplen un papel regulador en los astrocitos y en las EN, lo que sugiere que el estudio de estas moléculas puede mejorar el conocimiento sobre los procesos neurodegenerativos. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue explorar el rol funcional de lncRNAs asociados a lipotoxicidad. Para ello, se seleccionaron dos lncRNA con expresión diferencial, obtenidos de astrocitos bajo condiciones lipotóxicas usando palmitato y bajo condiciones basales. Estos lncRNAs se analizaron usando DIANA-LncBase y DIANA-TarBase para establecer sus interacciones con miRNAs y mRNAs. Las redes de interacción resultantes se visualizaron empleando Cytoscape y el papel de las redes ceRNA en rutas metabólicas se dilucidaron a través de PANTHER y DIANA-miRpath. Las redes obtenidas se enriquecieron en procesos relacionados con las EN. Además, se propusieron 3 posibles ejes lncRNA/miRNA/mRNA basados en el perfil transcriptómico que podrían involucrarse en los mecanismos de las EN. Los tres ejes, AC092687.3/hsa-let-7e-5p/SOD2, AC092687.3/hsa-let-7e-5p/PMAIP1 y SERTAD4-AS1/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1 mostraron importancia en la regulación de procesos de apoptosis e inflamación, características relevantes de las EN. Estas redes y ejes propuestos ayudarán a comprender los mecanismos inducidos por la lipotoxicidad en astrocitos, ampliar el conocimiento sobre los lncRNAs y su papel regulador en las EN, identificando así moléculas potencialmente útiles para su diagnóstico temprano e implementación de terapias efectivas para contrarrestarlas.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Janneth González Santos. PhD en Ciencias. Codirector: Andrés Felipe Aristizábal Pachón. PhD en Ciencias Biomédicas

Abstract

Title: *In silico* functional analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) from human astrocytes under lipotoxic stress and their association with neurodegenerative diseases*

Author(s): Valentina González Gómez**

Key Words: lncRNAs, miRNAs, lipotoxicity, neurodegeneration, astrocytes, bioinformatics, neuroinflammation.

Description: Neurodegenerative diseases (ND) are progressive and irreversible disorders that cause gradual neurological deterioration. Increasing risk factors such as obesity have contributed to the increase in cases of ND. Obesity can lead to lipotoxicity, affecting the function of neurons and astrocytes through the induction of neuroinflammatory factors and other effects that may contribute to the development of ND. However, the molecular mechanisms involved in this process are not fully elucidated. Recently, long non-coding RNAs (lncRNAs) have been shown to play a regulatory role in astrocytes and in ND, suggesting that the study of these molecules may improve our understanding of neurodegenerative processes. Based on the above, the aim of this work was to explore the functional role of lncRNAs associated with lipotoxicity. For this purpose, two differentially expressed lncRNAs were selected, obtained from astrocytes under lipotoxic conditions using palmitate and under basal conditions. These lncRNAs were analyzed using DIANA-LncBase and DIANA-TarBase to establish their interactions with miRNAs and mRNAs. The resulting interaction networks were visualized using Cytoscape and the role of ceRNA networks in metabolic pathways was elucidated using PANTHER and DIANA-miRpath. The obtained networks were enriched in ND-related processes. In addition, 3 possible lncRNA/miRNA/mRNA axes were proposed based on transcriptomic profiling that could be involved in ND mechanisms. The three axes, AC092687.3/hsa-let-7e-5p/SOD2, AC092687.3/hsa-let-7e-5p/PMAIP1 and SERTAD4-AS1/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1 showed importance in the regulation of apoptosis and inflammation processes, relevant features of ND. These proposed networks and axes will help to understand the mechanisms induced by lipotoxicity in astrocytes, expand the knowledge about lncRNAs and their regulatory role in ND, thus identifying potentially useful molecules for their early diagnosis and implementation of effective therapies to counteract them.

*Bachelor thesis

** Science Faculty. School of Biology. Director: Janneth González Santos, PhD in Sciences. Codirector: Andrés Felipe Aristizábal Pachón. PhD in Biomedical Sciences

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) afectan a millones de personas en todo el mundo, siendo los desórdenes de mayor prevalencia la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH) (Erkkinen, Kim, & Geschwind, 2018; Maserejian, Vinikoor-Imler, Dilley, 2020; Pringsheim et al., 2012; Tysnes & Storstein, 2017; World Health Organization, 2021; Xu et al., 2020). Estos trastornos se caracterizan por la progresiva degeneración de la estructura y función neuronal (Maciotta et al., 2013). Debido al rápido envejecimiento de la población, el riesgo de la incidencia de las EN ha incrementado, y con ello, la tasa de muerte de la población senescente, lo cual lleva a un incremento en los costos económicos de atención médica (Zahra et al., 2020). Aunque las investigaciones sobre estas neuropatologías son recurrentes, el mecanismo de las mismas aún no se encuentra totalmente esclarecido, lo que dificulta la obtención de tratamientos efectivos que evite el desarrollo de las EN (Zahra et al., 2020).

Diversos estudios han observado la importancia de los astrocitos en el desarrollo de las EN (Lee et al., 2022; Siracusa et al., 2019). Estas células gliales cumplen diversas funciones como dar soporte metabólico y antioxidante a las neuronas, controlar la barrera hematoencefálica (BBB), entre otras, por lo que pueden ser considerados como los reguladores maestros del metabolismo cerebral (Lee et al., 2022; Rose et al., 2020; Verkhratsky et al., 2015). Por esto, responden a disfunciones metabólicas tales como el incremento de ácidos grasos plasmáticos, los cuales pueden atravesar la BBB (Ortiz-Rodriguez et al., 2019). Debido a los roles esenciales que cumplen los astrocitos en el mantenimiento de la función cerebral normal y a las implicaciones que trae el

declive de dichas funciones, han sido un modelo ampliamente usado para el estudio de las EN (Acioglu et al., 2021; Phatnani & Maniatis, 2015; Rose et al., 2020; Verkhratsky et al., 2015)

El aumento en los niveles de ácidos grasos plasmáticos como el ácido palmítico (PA) es una consecuencia del consumo de alimentos hipercalóricos, ricos en grasas saturadas, conduciendo al desarrollo de la obesidad (Hruby & Hu, 2015; Ortiz-Rodriguez et al., 2019). Esta última puede conducir a un fenómeno conocido como lipotoxicidad que puede generar un declive en las funciones cognitivas debido al desajuste de vías metabólicas que lleva a la disfunción y muerte de neuronas y otras células del SNC como los astrocitos (Ortiz-Rodriguez et al., 2019; Phatnani & Maniatis, 2015; J. Schaffer, 2003)

En relación a lo anterior, se ha observado que la lipotoxicidad puede desencadenar la producción de citocinas proinflamatorias y altera la función mitocondrial, provocando un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se traduce en estrés oxidativo (J. E. Schaffer, 2016; Schönfeld & Reiser, 2017). Los anteriores fenómenos pueden provocar alteraciones en las funciones fisiológicas normales de células microgliales y astrocitos, además de promover un estado de neuroinflamación, condición en la cual dichas células son reguladores críticos (González-Reyes et al., 2017; Nordengen et al., 2019; Rose et al., 2020; Soung & Klein, 2019). La prevalencia de un estado crítico de inflamación sumado a las anteriores condiciones puede llevar al desarrollo de las EN debido a disfunciones en la homeostasis cerebral (Cenini et al., 2019; Gupta et al., 2012; Kempuraj et al., 2017; Kwon & Koh, 2020; Ortiz-Rodriguez et al., 2019).

Aunque diversas investigaciones muestren la importancia que tienen los astrocitos en escenario lipotóxico en el desarrollo de las EN (Hidalgo-Lanussa et al., 2020; Ortiz-Rodriguez et al., 2019), proporcionando una base para el estudio de los mecanismos que están involucrados en

su desarrollo, aún queda un gran vacío de investigación debido a la comprensión insuficiente de los mecanismos moleculares inducidos por la lipotoxicidad en astrocitos y su papel en el desarrollo de los trastornos neurodegenerativos (Hidalgo-Lanussa et al., 2020; Ortiz-Rodriguez et al., 2019). Dicha carencia de conocimiento se puede abordar desde el estudio del campo de los RNAs no codificantes (ncRNAs) (Neal & Richardson, 2018; Zhou et al., 2021b).

Uno de los tipos de ncRNAs son los microRNAs (miRNAs) que poseen menos de 200 nucleótidos y se caracterizan por disminuir la estabilidad de los RNAs mensajeros (mRNAs) objetivo o inhibir su traducción (Slack & Chinnaiyan, 2019; Zhou et al., 2021a). Por otra parte, se encuentran los ncRNA largos (lncRNAs) caracterizados por controlar la expresión génica en cis (actúan cerca de sus sitios de transcripción) y trans (actúan en regiones genómicas o celulares distantes), influenciar la expresión génica a nivel transcripcional, post-transcripcional y epigenético, entre otras características (Slack & Chinnaiyan, 2019; Zhou et al., 2021). Actualmente, el campo de estudio de los ncRNAs ha ido en continuo crecimiento, debido a su importancia en numerosos procesos biológicos como la regulación de la apoptosis, donde participan en vías de señalización celular, como la vía de p53, y desempeñan un papel importante en la modulación de genes clave implicados en este proceso (Dahariya et al., 2019; T. Lin et al., 2019; Slack & Chinnaiyan, 2019; C.-W. Wei et al., 2018; J. H. Yang et al., 2013). Entre los enfoques de estas investigaciones, se encuentra la búsqueda de lncRNAs diferencialmente expresados en pacientes de ciertas enfermedades para considerarlos como potenciales biomarcadores (Cipolla et al., 2018).

En el caso de las EN, los lncRNAs han cobrado gran relevancia debido a que gran parte de estos se expresan en el tejido cerebral (aproximadamente 40%), excediendo así la cantidad de genes codificantes (Zhou et al., 2021a). Sumado a esto, tienen un rol importante en la regulación

de la diferenciación neuronal y en la plasticidad sináptica, en la determinación del destino de células gliales y neuronales, entre otras funciones fundamentales en el SNC. Por esto, no es sorprendente que la desregulación de lncRNAs pueda contribuir al desarrollo de EN (Quan, Zheng, & Qing, 2017; Roberts, Morris, & Wood, 2014; Wei et al., 2018; Zhou et al., 2021). Aunque se ha establecido una conexión entre la desregulación de los lncRNAs y los trastornos neurodegenerativos, aún existe un vacío en el conocimiento en cuanto a los mecanismos moleculares que correlacionan a los ncRNAs con el desarrollo y progresión de estas enfermedades, lo anterior debido en parte a la complejidad de las redes reguladoras involucradas.

Una hipótesis que se ha propuesto para estudiar dichas redes de regulación es la del RNA endógeno competitivo (ceRNA) (Salmena et al., 2011). Esta hipótesis propone que los RNAs determinan sus niveles de expresión compitiendo por una limitada cantidad de miRNAs a través de los elementos de respuesta a miRNA (MRE) (Salmena et al., 2011). Tanto RNAs codificantes como no codificantes pueden compartir MREs, lo que genera una competencia entre ellos por los miRNAs disponibles, lo cual lleva a la regulación de la abundancia de dichos miRNAs (Fan et al., 2018; Salmena et al., 2011; Yin et al., 2020). A pesar de la relevancia que puede tener las redes ceRNA en la patogénesis de las EN, solo se han reportado algunas redes de regulación de ceRNA en neurodegeneración en los últimos años (Cai & Wan, 2018; Faghihi et al., 2008; C. W. Wei et al., 2018). Por esto, estudiar las redes reguladoras en las que participan los lncRNAs y como las interacciones que se dan en ellas afectan la expresión génica puede ayudar a comprender mejor la función de los lncRNAs en el avance y desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas.

Aunque se ha observado que los lncRNAs desempeñan roles importantes en la regulación de la expresión génica y funciones celulares en los astrocitos, aún existen brechas de conocimiento sobre los mecanismos de acción de los lncRNAs anotados en dichas células, así como su

participación en vías metabólicas y funciones biológicas específicas. Es por esto que, investigar la influencia que tienen los lncRNA en estas células y su relación con un escenario de inflamación lipotóxica presenta una perspectiva novedosa para la dilucidación de los procesos moleculares relacionados a la neurodegeneración. Ampliar el conocimiento y comprensión de los mecanismos que subyacen a las EN permitirá que, a futuro, se desarrollen terapias efectivas y métodos de diagnóstico temprano para dichas enfermedades que suponga menores costos y facilidad en el acceso.

Esto cobra gran importancia ya que, uno de los factores que agudiza el impacto socioeconómico y sanitario de las EN es el diagnóstico tardío (Leifer, 2003). En países de bajos y medianos ingresos como Colombia, la carga sociosanitaria puede ser mucho mayor que en países con altos ingresos, debido a la existencia de numerosas barreras tales como recursos insuficientes, desigualdad en el acceso a los sistemas de atención y la carencia de profesionales de la salud capacitados en las EN (Alzheimer's Disease International, 2021). Si a lo anterior se le suma la influencia de otras condiciones que pueden incrementar la posibilidad de padecer EN, como lo es el exceso de peso (prevalencia del 56.4% de personas en Colombia) (Ministerio de Salud y Protección Social, 2021), el impacto socioeconómico y sanitario de los trastornos neurodegenerativos será mucho mayor, por lo que, se hace necesario realizar más estudios que permitan mitigarlo (Hruby & Hu, 2015; Ortiz-Rodriguez et al., 2019). En este sentido, el presente proyecto de trabajo de grado busca identificar y caracterizar lncRNAs diferencialmente expresados en astrocitos humanos bajo condiciones lipotóxicas; lo que puede aportar en el estudio de los mecanismos moleculares de estos, lo cual, podría contribuir en el conocimiento de lncRNAs como potenciales biomarcadores y/o dianas para el diagnóstico y tratamiento de las EN.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Caracterizar *in silico* el papel funcional de lncRNAs diferencialmente expresados en astrocitos humanos bajo condiciones lipotóxicas y su relación con procesos relevantes en enfermedades neurodegenerativas.

1.2 Objetivos Específicos

Predecir *in silico* las redes de interacción de lncRNAs expresados diferencialmente en astrocitos humanos en condiciones lipotóxicas.

Evaluar *in silico* la relación de lncRNAs de astrocitos humanos expresados diferencialmente en condiciones lipotóxicas, con procesos relevantes en enfermedades neurodegenerativas.

2. Metodología

2.1. Predecir *in silico* las redes de interacción de lncRNAs expresados diferencialmente en astrocitos humanos en condiciones lipotóxicas.

A continuación, se presentarán todos los pasos metodológicos para darle alcance al primer objetivo.

2.1.1 Obtención de los datos

En un estudio anterior (Rojas-Cruz et al., 2023) realizado por el laboratorio de Bioquímica Computacional y Bioinformática de la Universidad Javeriana, se evaluó la expresión diferencial de tres lotes diferentes de astrocitos humanos normales (células NHA: lotes #0000612736, #00005656712, #0000514417) (Lonza Cat # CC-2565) cultivados en medio basal de astrocitos (ABM) (Lonza, Basilea, Suiza) y suplementos SingleQuots (Lonza, Basilea, Suiza) durante 12 días a 37°C, atmósfera humidificada y 5% CO₂, sembrando 5×10^3 células/cm². El tratamiento utilizado para generar lipotoxicidad lo realizaron siguiendo los protocolos descritos por Martín-Jiménez, el cual, brevemente, lo efectuaron sometiendo ácido palmítico (PA) en combinación con albúmina sérica bovina (BSA), como modelo de inflamación, mientras que el tratamiento control fueron células sometidas únicamente al vehículo (VH). Posteriormente, extrajeron, secuenciaron y analizaron el RNA de cada grupo siguiendo la metodología descrita en (Angarita-Rodríguez et al., 2022), obteniendo los genes diferencialmente expresados a través del paquete edgeR (v3.36) en R (ver Apéndice A). A partir de esto, identificaron 17 transcritos de lncRNA expresados diferencialmente en astrocitos bajo condiciones de lipotoxicidad. Del análisis realizado en el estudio mencionado anteriormente, fueron seleccionados dos lncRNAs para ser analizados en el presente trabajo: Transcrito ENST00000606907 del lncRNA AC092687.3 regulado al alza y

transcrito ENST00000437764 del lncRNA SERTAD4-AS1 regulado a la baja, cuya información se encuentra registrada en la Tabla 1 del Apéndice B.

2.1.2 Red de interacción lncRNA-miRNA-mRNA (ceRNA)

La red de interacción de RNA endógeno competitivo (ceRNA) está compuesta por las interacciones entre lncRNA-miRNA-mRNA. Con base a esto, inicialmente, haciendo uso del repositorio DIANA-LncBase v.3 (última actualización en noviembre de 2019) (Karagkouni et al., 2020), el cual posee información de objetivos de miRNA respaldados experimentalmente; se estudió la interacción lncRNA-miRNA. Para esto, se buscaron los ID de los transcritos de cada lncRNA en dicho repositorio, de donde se obtuvieron los miRNAs con interacción de alta confianza con los lncRNAs seleccionados. Los resultados se filtraron con base a los siguientes criterios: Validación experimental directa; especie en donde fueron obtenidos (*Homo sapiens*); métodos usados para validación de las interacciones de alto rendimiento (HITS-CLIP, PAR-CLIP, CLEAR-CLIP, miR-CLIP, Luciferase Reporter Assay). Seguidamente, se obtuvieron los mRNAs interactuantes con los miRNAs empleando las bases de datos DIANA-TarBase v.8 (última actualización en noviembre de 2017) (Karagkouni et al., 2018) y DIANA-mirPath v.3 (última actualización en mayo de 2015) (Vlachos et al., 2015). Esta última fue empleada además para realizar un análisis de predicción de rutas (ver punto 2.2.1.2). Los resultados se filtraron usando los criterios mencionados anteriormente para las interacciones lncRNA-miRNA.

Por medio del software FunRich 3.1.4 (Fonseka et al., 2021), se construyeron diagramas de Venn para cada miRNA, para así identificar el solapamiento de los mRNAs interactuantes obtenidos de las herramientas del consorcio DIANA usadas. Los mRNAs en común se emplearon para completar las interacciones miRNA-mRNA. Finalmente, la red de interacción lncRNA-

miRNA-mRNA (ceRNA) se construyó integrando los interactomas de lncRNA-miRNA y miRNA-mRNA, y fue recreada usando el software Cytoscape 3.9.1 (Shannon et al., 2003).

2.2 Evaluar *in silico* la relación de lncRNAs de astrocitos humanos expresados diferencialmente en condiciones lipotóxicas, con procesos relevantes en enfermedades neurodegenerativas.

A continuación, se presentarán todos los pasos metodológicos para darle alcance al segundo objetivo.

2.2.1 *Análisis de enriquecimiento funcional*

2.2.1.1 Análisis de enriquecimiento funcional de mRNAs. El análisis de enriquecimiento funcional se realizó a partir de dos aproximaciones. El primero fue el análisis de enriquecimiento funcional de mRNAs, el cual se llevó a cabo empleando todos los mRNAs de la red de interacción ceRNA realizada. Estos se ingresaron en el sistema de clasificación PANTHER v.17 (Thomas et al., 2022) y se empleó el enfoque de análisis de sobrerrepresentación estadística (ORA por sus siglas en inglés), el cual evalúa estadísticamente la fracción de una lista de genes de interés en una lista de genes de referencia (Khatri et al., 2012). El análisis de enriquecimiento se realizó por términos Gene Ontology (GO) y rutas PANTHER, usando como umbral de selección un p-valor corregido por Benjamini-Hochberg $FDR < 0.05$ y filtrando los resultados con base a términos relacionados con neurodegeneración e inflamación. Los términos GO filtrados y las rutas PANTHER seleccionadas se visualizaron por medio de gráficas de barras realizadas en el programa R versión 4.2.1 usando el paquete ggplot2 versión 3.3.6.

2.2.1.2 Análisis de enriquecimiento funcional de miRNAs. La segunda aproximación se llevó a cabo por medio del análisis de enriquecimiento de rutas KEGG de miRNAs. Para esto, se ingresaron los miRNAs de la red de interacción ceRNA en la herramienta DIANA-mirPath v.3

(Vlachos et al., 2015) (usada anteriormente en la construcción de la red ceRNA. Ver punto 2.1.2). Se consideraron las rutas KEGG enriquecidas con un p-valor corregido por FDR < 0.05 y se filtraron teniendo en cuenta únicamente las rutas que tuvieran relación informada con el desarrollo de EN. Las vías KEGG seleccionadas se visualizaron por medio de un gráfico de burbujas realizado en el programa R versión 4.2.1 usando el paquete ggplot2 versión 3.3.6.

2.2.2 Selección y validación de ejes lncRNA-miRNA-mRNA

La red ceRNA *in silico* se comparó con los perfiles de expresión hallados en el transcriptoma empleado inicialmente (ver punto 2.1.1), el cual se encuentra en el Apéndice A. Haciendo uso del software Cytoscape 3.9.1 (Shannon et al., 2003), se identificaron los mRNAs de la red *in silico* que presentaran datos de expresión. La identificación de dichos mRNAs permitió encontrar los ejes lncRNA-miRNA-mRNA que, probablemente puedan estar desregulados en astrocitos humanos bajo condiciones lipotóxicas. Los ejes ceRNAs seleccionados se dividieron en dos tipos de acuerdo con la expresión de los lncRNAs y mRNAs, así: Tipo 1; transcrito de lncRNA regulado al alza, miRNA regulado a la baja y mRNA regulado al alza. Tipo 2; transcrito de lncRNA regulado a la baja, miRNA regulado al alza y mRNA regulado a la baja.

Adicionalmente, para verificar que los mRNAs identificados anteriormente estuvieran presentes en la red *in silico* y en el transcriptoma, se realizaron diagramas de Venn entre los dos conjuntos de datos por medio del programa FunRich 3.1.4 (Fonseka et al., 2021), con el fin de seleccionar los más probables ejes ceRNAs. Seguidamente, se evaluó el enriquecimiento de los ejes con rutas PANTHER y términos GO que estuvieran asociadas a procesos de relevancia en nuestro modelo. Posterior a la identificación de los ejes, se seleccionaron los ejes a analizar en el presente estudio, con base a los perfiles de expresión de los genes y a como estos se encontraban

enriquecidos en las rutas PANTHER y términos GO. Esta selección permitió enfocar la investigación en un número manejable de genes y cumplir con los objetivos del presente proyecto.

Por otra parte, empleando la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (Barrett et al., 2013) del NCBI, se obtuvieron los datos de expresión de miRNAs de los siguientes estudios relacionados con neurodegeneración; GSE155700, GSE46579 y GSE48552. Esto con el fin de evaluar si dichos datos respaldaban los ejes propuestos por el análisis presentado anteriormente. Los estudios del GEO mencionados se encuentran en el Apéndice C.

Finalmente, se realizó una exploración en la literatura, relacionada con los mRNAs obtenidos de la red de interacción ceRNA, lo cual, permitió caracterizar la función biológica de estos genes, potencialmente relacionada con procesos enmarcados en la neurodegeneración. Con base a esta información, se plantearon los mecanismos de acción de los ejes ceRNAs, los cuales se representaron de forma gráfica por medio de la herramienta BioRender (BioRender, s.f.). De esta forma se dilucidó la posible asociación de los lncRNAs analizados con las EN.

El flujo de trabajo seguido en la metodología (punto 2.1 a 2.2.2) se encuentra esquematizado en un diagrama estilo PRISMA que se encuentra en la Fig. 1 del Apéndice B.

3. Resultados

3.1. Redes de interacción ceRNA predichas *in silico* de lncRNAs expresados diferencialmente en astrocitos humanos en condiciones lipotóxicas

El análisis se inició con el transcrito ENST00000606907 del lncRNA AC092687.3. Dicho lncRNA presentó 4 interacciones reportadas con miRNAs en la base de datos DIANA-LncBase v.3. Seguidamente, se obtuvieron los mRNAs con interacción confirmada con dichos miRNAs de

las bases de datos DIANA-TarBase y DIANA-mirPath. El total de interacciones anotadas fue de 346. De los 4 miRNAs asociados al lncRNA de estudio, uno fue excluido, el hsa-miR-1-3p, debido a que no se hallaron interacciones con mRNAs reportadas en DIANA-mirPath. Las interacciones lncRNA-miRNA para el lncRNA AC092687.3 se muestra en la Tabla 2 del Apéndice B.

Seguidamente, se analizó el transcrito ENST00000437764 del lncRNA SERTAD4-AS1. Este presentó 8 interacciones con miRNAs en la base de datos DIANA-LncBase v.3. Posterior a los filtros aplicados, solo se seleccionaron 5 interacciones y, con respecto a las interacciones miRNAs-mRNAs, se hallaron 576 mRNAs entre las bases de datos DIANA-TarBase y DIANA-mirPath. Posteriormente, se integraron los interactomas de lncRNA-miRNA y miRNA-mRNA correspondientes a cada lncRNA. Las interacciones lncRNA-miRNA para el lncRNA SERTAD4-AS1 se muestra en la Tabla 3 del Apéndice B.

3.2 Evaluación *in silico* de la relación de los lncRNAs de astrocitos humanos expresados diferencialmente en condiciones lipotóxicas con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas

3.2.1 Análisis de enriquecimiento funcional

3.2.1.1 Análisis de enriquecimiento funcional por medio de PANTHER. El análisis de enriquecimiento funcional por medio de PANTHER v.17 (Thomas et al., 2022) usando los mRNAs de las redes de interacción, permitió identificar los términos GO y las rutas metabólicas enriquecidas para cada transcrito de lncRNA en astrocitos bajo condiciones lipotóxicas.

Los resultados del análisis para el transcrito ENST00000606907 del lncRNA AC092687.3 reveló un total de 1950 términos GO y 42 rutas PANTHER significativas (p-valor ajustado < 0.05) (ver Apéndice D) a partir de la lista de genes que interactúan indirectamente con dicho lncRNA,

obtenida a través de la integración de los datos de DIANA-TarBase y DIANA-miRPath. Después de aplicar un filtro para dejar solo los términos y rutas más relevantes a nuestro modelo, se seleccionaron 30 términos GO y 19 rutas PANTHER para su posterior análisis (ver Apéndice E).

Entre las rutas en las que están involucrados los genes diana que interactúan indirectamente con AC092687.3, se encuentran vías metabólicas primarias que participan directamente en la apoptosis (vía de p53, respuesta al estrés oxidativo y las vías de señalización de la apoptosis), inflamación y neuroinflamación (como lo son la inflamación mediada por quimiocinas y citocinas, señalización de receptores tipo Toll, activación de células T y B, ruta de señalización del PDGF, entre otras). Asimismo, se encuentran vías involucradas directamente en neurodegeneración como vía de la enfermedad de Parkinson, vía de la enfermedad de Huntington y vía de la enfermedad de Alzheimer-presenilina. Entre estas, destacan especialmente las siguientes vías con una alta significancia estadística y gran cantidad de genes enriquecidos: vía de p53 (FDR = 1.55×10^{-13} y 19 genes), vía de la MAPK p38 (FDR = 3.03×10^{-11} y 13 genes) y vía de señalización de la inflamación mediada por quimiocinas y citocinas (FDR = 7.36×10^{-9} y 22 genes). La gráfica de análisis de enriquecimiento de rutas PANTHER para AC092687.3 se observa en la Fig. 2 del Apéndice B.

Por otra parte, entre los términos GO enriquecidos para los genes diana del lncRNA AC092687.3, destacan principalmente los que cuentan con una alta significancia estadística, gran cantidad de genes enriquecidos y significado biológico relevante para el modelo de estudio: regulación de la muerte celular programada (FDR = 2.59×10^{-34} y 103 genes) y respuesta celular al estrés (FDR = 3.07×10^{-34} y 106 genes) para los procesos biológicos (BP); adhesión focal (FDR = 1.57×10^{-13} y 48 genes) y complejo de proteína quinasa serina/treonina (FDR = 4.82×10^{-8} y genes) para componentes celulares (CC); actividad de proteína quinasa serina/treonina (FDR =

2.58×10^{-14} y 38 genes), y unión a receptor de señalización (FDR = 6.63×10^{-10} y 65 genes) para funciones moleculares (MF). Igualmente, cabe resaltar dos términos que, aunque no tengan gran cantidad de genes enriquecidos ni sean tan significativos estadísticamente como los términos destacados anteriormente, tienen un significado biológico relevante: proceso apoptótico de células gliales (FDR = 3.25×10^{-3} y 3 genes) para BP, y unión a p53 (FDR = 4.05×10^{-2} y 6 genes) para MF. La gráfica de análisis de enriquecimiento de términos GO para AC092687.3 se observa en la Fig. 3 del Apéndice B.

En cuanto al transcrito ENST00000437764 del lncRNA SERTAD4-AS1, su análisis de enriquecimiento funcional reveló un total de 1707 términos GO y 56 rutas PANTHER significativas (p-valor ajustado < 0.05) (ver Apéndice F) en la lista de genes diana que interactúan indirectamente con dicho lncRNA. Al igual que con el lncRNA AC092687.3, se filtraron los resultados con base al modelo biológico del estudio, conservando así los términos y rutas más relevantes, de las cuales se seleccionaron 30 términos GO y 17 rutas PANTHER para su posterior análisis (ver Apéndice G).

Entre las rutas PANTHER seleccionadas se encuentran vías metabólicas principales que intervienen directamente en procesos de apoptosis (tales como la vía de p53, Ras, MAPK p38, la respuesta al estrés oxidativo, y las vías de señalización de la apoptosis y TGF-beta), inflamación y neuroinflamación (como la inflamación mediada por quimiocinas y citocinas, la vía de señalización mediada por el receptor histamínico H2, la activación de células T, la ruta de señalización del PDGF, entre otras), y otras como la vía de las enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer-presenilina. Entre las vías metabólicas obtenidas, se destacan principalmente las que cuentan con la mayor cantidad de genes enriquecidos, mayor significancia estadística y significado biológico, las cuales son: vía de p53 (FDR = 1.81×10^{-10} y 16 genes), vía

de señalización de FGF (FDR = 1.70×10^{-9} y 17 genes), vía de señalización de la inflamación mediada por quimiocinas y citocinas (FDR = 4.75×10^{-6} y 18 genes). La gráfica de análisis de enriquecimiento de rutas PANTHER para SERTAD4-AS1 se observa en la Fig. 4 del Apéndice B.

Con relación a los términos GO seleccionados, se destacan los siguientes términos que cuentan con una alta significancia estadística, gran cantidad de genes enriquecidos y significado biológico relevante para el modelo de estudio: respuesta celular al estrés (FDR = 2.08×10^{-21} y 85 genes) y muerte celular (FDR = 3.06×10^{-13} y 57 genes) para BP; compartimento de control de calidad del retículo endoplásmico (FDR = 1.54×10^{-4} y 6 genes) para CC; unión al factor de transcripción (FDR = 2.3×10^{-10} y 38 genes) y actividad de proteína quinasa serina/treonina (FDR = 4.04×10^{-9} y 30 genes) para MF. La gráfica de análisis de enriquecimiento de términos GO para SERTAD4-AS1 se observa en la Fig. 5 del Apéndice B.

3.2.1.2 Análisis de enriquecimiento funcional por medio de DIANA-mirPath. Por otra parte, se realizó el análisis de enriquecimiento funcional desde una segunda aproximación, el cual fue ejecutado a través de la herramienta DIANA-mirPath v.3 (Vlachos et al., 2015). Este análisis permitió explorar las posibles vías metabólicas reguladas por los miRNAs presentes en las redes de interacción de ambos lncRNAs. De las vías identificadas, se eliminaron aquellas que no se relacionaban con el modelo de estudio.

Al realizar el análisis de enriquecimiento funcional del transcrito ENST00000606907 del lncRNA AC092687.3 mediante la herramienta DIANA-mirPath v.3, se ingresaron los 3 miRNAs que interactuaban con el lncRNA. Los resultados mostraron 9 vías metabólicas significativas y asociadas a nuestro modelo. Entre estas vías destacan la vía de señalización de Hippo (FDR = 9.14×10^{-6}), p53 (FDR = 1.51×10^{-3}) y MAPK (FDR = 6.46×10^{-3}), y la ruta de la enfermedad de

Huntington,. La gráfica del análisis de enriquecimiento por medio de DIANA-mirPath para AC092687.3 se observa en la Fig. 6 del Apéndice B.

Por otra parte, para el transcrito ENST00000437764 del lncRNA SERTAD4-AS1, el análisis de enriquecimiento se realizó con los 5 miRNAs de la red de interacción. De los resultados obtenidos se identificaron 9 vías significativas. Entre estas se destacan, igualmente, la vía de señalización de Hippo (FDR = 2.29×10^{-14}), y MAPK (FDR = 4.72×10^{-2}); y la vía de p53 (FDR = 3.69×10^{-2}). La gráfica del análisis de enriquecimiento por medio de DIANA-mirPath para SERTAD4-AS1 se observa en la Fig. 7 del Apéndice B.

3.2.2 Selección de ejes lncRNA-miRNA-mRNA

Con el fin de completar la construcción de las redes ceRNA, se compararon las redes *in silico* construidas con los perfiles de expresión de mRNAs hallados en el transcriptoma empleado (ver Apéndice A). En consecuencia, en la red ceRNA del lncRNA AC092687.3 se identificaron 18 mRNAs sobreexpresos, De esta manera, la red ceRNA para dicho lncRNA, resultó de la siguiente forma: Transcrito ENST00000606907 del lncRNA AC092687.3 interactúa con 3 miRNAs (hsa-miR-4525, hsa-miR-1226-5p y hsa-let-7e-5p) que regulan 346 genes, 18 de los cuales fueron encontrados en los perfiles de expresión del transcriptoma. Estos genes se encontraban dentro de los ejes tipo 1. A partir de estos 18 genes, se seleccionaron los dos genes con mayor expresión y enriquecimiento en vías: *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/SOD2* y *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/PMAIP1*. La red ceRNA del lncRNA AC092687.3 se observa en la Fig. 8 del Apéndice B.

De manera similar, en la red ceRNA del lncRNA SERTAD4-AS1, fueron identificados 8 mRNAs con expresión a la baja, lo que permitió completar la red ceRNA, resultando de la siguiente forma: Transcrito ENST00000437764 del lncRNA SERTAD4-AS1 interactúa con 5 miRNAs

(hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-708-5p, hsa-miR-369-3p y hsa-miR-28-5p), que a su vez regulan 576 genes, de los cuales 8 fueron hallados en los perfiles de expresión del transcriptoma. Estos genes se encontraban dentro de los ejes tipo 2. A partir de estos 8 genes, se seleccionó el gen con menor expresión y mayor enriquecimiento en vías: *SERTAD4-AS1(ENST00000437764)/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1*. Es importante resaltar que el miRNA hsa-miR-125b-5p comparte todos sus genes diana con el miRNA hsa-miR-125a-5p, lo que generó un nuevo eje para esta última red, siendo el *SERTAD4-AS1(ENST00000437764)/hsa-miR-125a-5p/NUDT16L1*. La red ceRNA del lncRNA SERTAD4-AS1 se observa en la Fig. 9 del Apéndice B.

3.2.3 Validación de ejes lncRNA-miRNA-mRNA

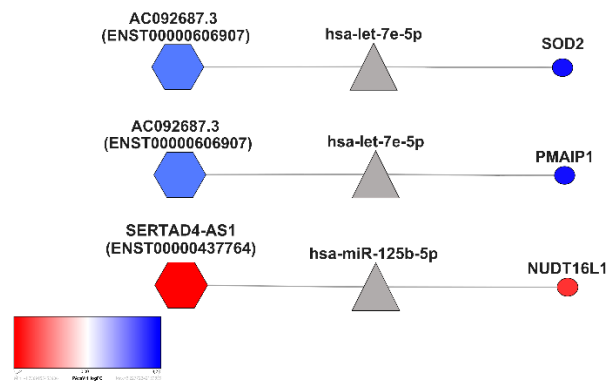
Con el fin examinar el rol de los miRNAs en los ejes seleccionados, se usó la base de datos GEO del NCBI de la que se obtuvieron diferentes estudios relacionados con las EN para obtener los perfiles de expresión diferencial de cada miRNA (hsa-let-7e-5p, hsa-miR-125a-5p y hsa-miR-125b-5p). En este sentido, para el miRNA hsa-let-7e-5p, se encontró una disminución significativa en su expresión en los estudios GSE46579 y GSE48552 al comparar pacientes con EA vs control (CTR). En cuanto al miRNA hsa-miR-125b-5p, se observó un aumento en los niveles de expresión de dicho miRNA en los estudios GSE48552 y GSE155700 al evaluar pacientes con EA y con demencia frontotemporal vs CTR, respectivamente. Por último, para el miRNA hsa-miR-125a-5p, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión en ninguno de los estudios analizados, por lo que el eje que incluía a dicho miRNA fue eliminado. Los resultados específicos de la validación de los miRNAs se encuentran en la Tabla 4 del Apéndice B.

Con base a los resultados de la validación de miRNAs realizada anteriormente, los ejes que contarían con un mayor soporte y cuya expresión de los RNAs que los conforman concordaba con

los tipos de ejes propuestos para cada lncRNA (ver punto 2.2.2), serían los ejes *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/SOD2* y *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/PMAIP1*, y el eje *SERTAD4-AS1(ENST00000437764)/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1*, los cuales, fueron los seleccionados finalmente para analizar. Los ejes seleccionados de las redes ceRNA del lncRNA AC092687.3 y SERTAD4-AS1 se observan en la Fig. 1.

Figura 1

Ejes lncRNA-miRNA-mRNA de ambas redes ceRNA potencialmente involucradas en astrocitos bajo estrés lipotóxico



Nota: lncRNA, forma de hexágono; miRNAs, forma de triángulo; mRNAs, forma de círculo. Los valores de Log2 Fold Change se muestran mediante el color del nodo. Los nodos de color rojo corresponden a los valores de expresión más bajos, los de color azul corresponden a los valores más altos y los de color gris corresponden a los miRNAs que no contaban con datos de expresión.

4. Discusión

La identificación y entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a las EN ha sido un gran tema de interés en la investigación biomédica debido no solo al impacto en la calidad

de vida de quienes las padecen, sino también al impacto socioeconómico que suponen (Zahra et al., 2020). A medida que la población envejece y los factores de riesgo como la obesidad aumentan, la prevalencia de las EN también lo hace, representando a la población una carga sociosanitaria cada vez mayor (Hruby & Hu, 2015; Zahra et al., 2020). Debido a esto, se ha buscado estudiar la patogénesis de las EN desde distintas aproximaciones, como lo es la investigación de lncRNAs en astrocitos bajo condiciones lipotóxicas y su relación con procesos de neurodegeneración.

Con el fin de investigar el rol que cumplen los lncRNAs en dichos procesos, en el presente proyecto se exploró de forma *in silico* el papel funcional de los lncRNAs AC092687.3 y SERTAD4-AS1 que contaban con expresión diferencial en astrocitos bajo condiciones lipotóxicas, a partir de lo cual, se hallaron redes *in silico* de genes y miRNAs relacionados con cada lncRNA. Mediante el uso del análisis transcriptómico aportado por el grupo de investigación, se identificaron tres ejes potenciales a partir de las redes ceRNA *in silico*, siendo AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/SOD2, AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/PMAIP1 y SERTAD4-AS1(ENST00000437764)/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1. Estos están implicados en procesos de apoptosis, respuesta celular al estrés y neuroinflamación principalmente, procesos que, fueron respaldados por la identificación de términos GO y rutas metabólicas. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que ambos lncRNAs y los ejes en los que se encuentran podrían estar involucrados en procesos relevantes para el desarrollo de las EN en un contexto de astrocitos bajo lipotoxicidad.

Para explorar el papel de los lncRNAs y sus redes ceRNA en el modelo biológico de estudio y como su desregulación se asocia con las EN, en la presente investigación se realizó un análisis integral de las interacciones ceRNA y la evaluación *in silico* de los lncRNAs SERTAD4-AS1 (lncRNA de clase antisentido y cadena negativa) y AC092687.3 (lncRNA de clase antisentido y

cadena negativa), los cuales, han sido estudiados en algunas patologías (Feng et al., 2023; Wu et al., 2022; S. Yang et al., 2021; Zhang et al., 2020). Sin embargo, la información disponible sobre ambos lncRNAs es limitada y aún no se conoce con exactitud su función biológica y mecanismo molecular. Especialmente, en el contexto neurodegenerativo, la relación de los lncRNAs AC092687.3 y SERTAD4-AS1 con las EN aún es desconocida.

Con base a lo anterior, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional de términos GO y vías biológicas mediante las herramientas PANTHER y DIANA-mirPath, lo cual permitió identificar las posibles funciones y mecanismos moleculares de los lncRNAs de interés en el modelo biológico de estudio. Los resultados revelaron que ambos lncRNAs pueden estar modulando la expresión de ciertos genes que están relacionados con la respuesta a condiciones de estrés celular, señalización celular, la respuesta inmunológica y la inflamación, así como en procesos de muerte celular.

Estos procesos engloban vías como la vía de p53, que desempeña un papel crucial en la respuesta del daño del ADN, apoptosis e inflamación (Aloi et al., 2015). Además de esta vía, se identificaron otras relevantes como la vía la vía de Hippo, involucrada en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis; y la vía de señalización de MAPK (vía MAPK p38 en PANTHER), relacionada con la respuesta al estrés celular e inflamación. Estas vías, junto con otras enriquecidas, han sido relacionadas con procesos de neurodegeneración (Albert-Gascó et al., 2020; Sahu & Mondal, 2020; Sileo et al., 2022; Talebi et al., 2021). Igualmente, cabe resaltar que los términos GO enriquecidos para ambos lncRNAs se relacionan con los procesos anteriormente mencionados. En ellos se incluyen procesos apoptóticos de células gliales, unión a p53, respuesta al estrés celular, regulación de la permeabilidad mitocondrial y actividad quinasa, entre otros. Adicionalmente, ambos lncRNAs se enriquecen igualmente en vías relacionadas directamente con

EN, siendo estas la vía de la enfermedad de Parkinson, Huntington y la vía de la enfermedad de Alzheimer-presenilina,

A pesar de que se identificaron rutas y términos enriquecidos relacionadas con procesos neurodegenerativos, es importante considerar que pueden existir otras vías, (principalmente relacionadas a la supervivencia celular), que tengan efectos opuestos a estos procesos y brinden protección contra los mismos, como lo pueden ser las vías de señalización de TGF-beta y FGF (Caraci et al., 2011; Klimaschewski & Claus, 2021). Esto se puede dar ya que, ambos lncRNAs podrían enriquecer genes inhibidores en dichas vías. Es decir, AC092687.3 al estar sobreexpresado enriquece genes que posiblemente actúen como moduladores negativos, y al estar aumentados, inhiben dichas vías. Por otro lado, SERTAD4-AS1, al estar expresado a la baja, podría enriquecer esas mismas vías debido a que los genes que las enriquecen, posiblemente, sean promotores de las mismas y se encuentren disminuidos. Igualmente, es posible que dichas rutas se encuentren enriquecidas debido a que los genes que las enriquecen posiblemente se manifiesten como una respuesta adaptativa de los astrocitos ante el daño causado por la lipotoxicidad (Fulda et al., 2010). Sin embargo, es necesario investigar cada vía y sus términos GO asociados para comprender completamente la relación de los lncRNAs con las mismas y su significado en neurodegeneración.

En este sentido, para investigar más a fondo el rol de los lncRNAs en astrocitos bajo estrés lipotóxico y su relación con las EN, se propusieron los siguientes ejes de regulación ceRNA: *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/SOD2* y *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/PMAIP1* para AC092687.3 y *SERTAD4-AS1(ENST00000437764)/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1* para SERTAD4-AS1. Para entender el papel de los ejes ceRNAs, y, por tanto, de los lncRNAs analizados en el modelo biológico de estudio, se evaluó la función de los genes *SOD2*, *PMAIP1* y *NUDT16L1*.

En primer lugar, se analizó el gen *PMAIP1* perteneciente al eje AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/PMAIP1 del lncRNA AC092687.3. Este gen, también llamado *NOXA*, es un gen pro-apoptótico perteneciente a la subfamilia BCL-2 del dominio de homología 3 (BH3) activado por p53 ante diversas señales de estrés celular (Aloi et al., 2015; Oda et al., 2000; Yakovlev et al., 2004). En el presente estudio, se plantea la hipótesis de que la lipotoxicidad genera la sobreexpresión del lncRNA AC092687.3(ENST00000606907), conduciendo a una mayor captación del miRNA hsa-let-7e-5p por este lncRNA, reduciendo el efecto regulador del miRNA sobre el mRNA de *PMAIP1*. La falla en la regulación post-transcripcional de *PMAIP1* y su mayor expresión debido a la activación del factor de transcripción p53 (causado por lipotoxicidad, inflamación y ROS) conduce a una vía de respuestas que resulta en la neutralización de las proteínas BCL-2A1 y MCL1, induciendo la liberación de complejos Bax/Bak (Roufayel et al., 2022). Esto lleva a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), lo que ocasiona la liberación de componentes mitocondriales como cyto-c y ADN mitocondrial (mtDNA) (Dumont et al., 2020; Seo et al., 2003; White et al., 2014). Es importante destacar, que la sobreexpresión de *PMAIP1* es un evento que se produce en respuesta al daño crónico y prolongado causado por la lipotoxicidad.

Al producirse la salida de dichos componentes mitocondriales, se puede generar una cascada de respuestas que lleva a la apoptosis y a la neuroinflamación. Inicialmente, el cyto-c se une a la proteína APAF-1 dando lugar a la formación del apoptosoma, complejo que activa la procaspasa-9, conduciendo a la activación de la vía intrínseca de las caspasas y la consecuente inducción de la apoptosis (Heilig et al., 2023). Entre las posibles consecuencias, cabe destacar que al morir, podrían liberarse el cyto-c y el mtDNA acumulados en el citosol del astrocito apoptótico al espacio extracelular, donde actúan como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y

activan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de células circundantes, desencadenando una respuesta inflamatoria (Eleftheriadis et al., 2016).

Basado en el estudio de Lin et al., 2022, es posible plantear que el cyto-c actúa como DAMP al unirse a los receptores tipo Toll 4 (TLR4) de otros astrocitos y activar la vía MAPK-JNK, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y la respuesta inmunitaria de dichos astrocitos (M. Lin et al., 2022). De forma similar, el mtDNA se puede unir a receptores tipo Toll 9 (TLR9) de los endosomas de células gliales, donde induce la activación de la vía MAPK p38 y la subsecuente activación del factor de transcripción NF- κ B que lleva a la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α y posiblemente a la activación del inflammasoma NLRP3 (M. Lin et al., 2022; Qiu et al., 2022). En conjunto, estas vías de respuesta pueden provocar un estado de neuroinflamación y muerte celular, los cuales son procesos relevantes en las EN (Kwon & Koh, 2020; Talebi et al., 2021; White et al., 2014). El mecanismo de acción del eje anteriormente explicado se encuentra representado en la Fig. 10 del Apéndice B.

Además de PMAIP1, el lncRNA AC092687.3 también regula a otro mRNA diana del miRNA hsa-let-7e-5p, siendo este SOD2 (eje AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/SOD2). El gen SOD2 codifica para la enzima superóxido dismutasa 2 mitocondrial (SOD2/MnSOD), crucial en la neutralización de ROS al catalizar la conversión del superóxido en peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Jung et al., 2019). En el contexto celular del presente trabajo, la lipotoxicidad en los astrocitos genera la producción excesiva de ROS que lleva al estrés oxidativo (el cual puede estimular vías inflamatorias) y estimula la sobreexpresión de SOD2 (Rahman & Biswas, 2006; Schönfeld & Reiser, 2017). Paralelamente, se induce la sobreexpresión del lncRNA AC092687.3(ENST00000606907), lo que modula los niveles de SOD2 al interferir con el miRNA hsa-let-7e-5p.

Esto podría reflejar una respuesta adaptativa de SOD2 como respuesta al estrés oxidativo generado por la lipotoxicidad (Ruszkiewicz & Albrecht, 2015). Esta sobreexpresión ha sido observada en eritrocitos de pacientes con EA, indicando los altos niveles de ROS que se da en dicha EN y reflejando un mecanismo compensatorio contra el daño oxidativo (De Leo et al., 1998; Ruszkiewicz & Albrecht, 2015). No obstante, es posible que el daño celular generado por la lipotoxicidad sea tan alto y prolongado que la célula no pueda contrarrestarlo, la sobreexpresión de SOD2 sea insuficiente y resulte eventualmente en la muerte celular (Fulda et al., 2010).

En consecuencia, la sobreexpresión de dicha enzima no solo podría reflejar la posible insuficiencia de la respuesta adaptativa, sino que también podría tener efectos perjudiciales en la célula. Esta situación podría darse si se genera un desbalance en la actividad de otras enzimas antioxidantes como la catalasa (Hussain et al., 2004). Esto podría generarse debido a que, la regulación al alza de SOD2 se lleva a cabo por dos posibles mecanismos (desregulación del eje ceRNA y ambiente celular oxidativo), lo que podría resultar en una falta de coordinación con otras enzimas antioxidantes. Lo anterior puede provocar una acumulación excesiva de H₂O₂, que puede generar un aumento del estrés oxidativo, una respuesta inflamatoria más intensa y provocar daño al ADN (Eno et al., 2013; Fulda et al., 2010; Henning et al., 2022; Hussain et al., 2004; Ruszkiewicz & Albrecht, 2015). Estos eventos pueden activar factores de transcripción como p53 que pueden incrementar la expresión de proteínas pro-apoptóticas, inducir, entre otras, la disfunción mitocondrial y resultar en la apoptosis de los astrocitos (Fulda et al., 2010). Debido a esto, es posible que se produzca la cascada de respuestas mencionada anteriormente para el eje AC092687.3/hsa-let-7e-5p/PMAIP1. El mecanismo de este eje se encuentra representado en la Fig. 11 del Apéndice B.

En tercer lugar, se analizó el gen *NUDT16L1* perteneciente al eje *SERTAD4-AS1(ENST00000437764)/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1* del lncRNA SERTAD4-AS1. Este gen, también conocido como *TIRR*, es un regulador de la función de la proteína 1 de unión a p53 (53BP1). Esta última se une a p53 formando un complejo (53BP1-p53) que es clave en la reparación de las roturas de doble cadena del ADN (DSBs) y en el control de las decisiones celulares antitumorígenicas, por lo que, la expresión de 53BP1 es esencial para la señalización normal de p53 (Cuella-Martin et al., 2016; Parnandi et al., 2021; Rass et al., 2022). En células sanas, se ha observado que la unión de TIRR al dominio Tudor de 53BP1, forma un complejo estable que impide que esta última se una a la cromatina y al factor de transcripción p53, generando que TIRR sea un regulador negativo de 53BP1 y, por tanto, del complejo 53BP1-p53 y de la señalización de la vía de p53 (Parnandi et al., 2021).

A partir de esto, en este estudio se plantea que el estrés lipotóxico crónico y prolongado en los astrocitos, puede conducir a una disminución en la expresión del lncRNA SERTAD4-AS1 (ENST00000437764), lo que provoca que el miRNA hsa-miR-125b-5p inhiba la traducción del gen *NUDT16L1/TIRR* causando una disminución en los niveles de esta última. Esta deficiencia de TIRR, sumado al daño del ADN a causa de la lipotoxicidad, promueve la unión de 53BP1 a las DBSs y a p53 (Botuyan et al., 2018; Strano et al., 2001, 2005). Al unirse a p53 e incrementar la formación del complejo 53BP1-p53, causa su activación aberrante, provocando un incremento en la transcripción de genes mediada por p53 en condiciones de estrés celular, entre el que se encuentra el gen pro-apoptótico *BAX* (Parnandi et al., 2021). Este último puede generar la cascada de eventos mencionada anteriormente para el eje *AC092687.3(ENST00000606907)/hsa-let-7e-5p/PMAIP1*. El modelo planteado se representa en la Fig. 12 del Apéndice B.

En conjunto, los resultados de enriquecimiento y los tres ejes de regulación ceRNA analizados en el presente trabajo evidencian la complejidad de las interacciones moleculares en astrocitos en respuesta a la lipotoxicidad. La regulación de estos ejes puede seguir un orden de activación de acuerdo con la magnitud del daño inducido por la lipotoxicidad. De esta forma, el insulto inicial de PA activa al eje AC092687.3/hsa-let-7e-5p/SOD2 como una respuesta adaptativa para contrarrestar el daño oxidativo. Es importante destacar que la exposición continua y prolongada al exceso de PA y la acumulación de ROS, puede inducir la activación de vías inflamatorias, lo que, a su vez, puede agravar el daño en los astrocitos.

Debido a la cronicidad del daño, la respuesta adaptativa inicial puede volverse insuficiente y, en cambio, potencialmente perjudicial debido al aumento de H₂O₂, que genera un incremento en el estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria más intensa, así como daño al ADN (Chelombitko, 2018; Pálmai-Pallag & Bachrati, 2014). Estos eventos pueden llevar a la activación de p53. Sumado a esto, de forma simultánea se activa el eje SERTAD4-AS1/hsa-miR-125b-5p/NUDT16L1, impactando igualmente en la activación de p53, incrementándola. La activación de dicho factor de transcripción puede modular la respuesta al daño, y dependiendo de la magnitud y duración de este, puede resultar en una mayor transcripción de genes pro-apoptóticos, como PMAIP1. En este escenario, si el daño lipotóxico y la inflamación persisten de manera crónica, la sobreexpresión de PMAIP1, influenciada tanto por la activación de p53 como por la regulación de su correspondiente eje (AC092687.3/hsa-let-7e-5p/PMAIP1), puede contribuir a la disfunción mitocondrial y, finalmente contribuir al inicio de la cascada apoptótica. Entre las posibles consecuencias de este evento, se encuentra la liberación de componentes mitocondriales al espacio extracelular, los cuales, pueden actuar como DAMPs al unirse a receptores Toll de otras células circundantes y producir la neuroinflamación (M. Lin et al., 2022; Qiu et al., 2022). Esta respuesta,

tanto inflamatoria como apoptótica puede provocar una variedad de efectos en el SNC y estar presente en el desarrollo de las EN (Guttenplan et al., 2021; Phatnani & Maniatis, 2015; Takuma et al., 2004). Es relevante recordar que estos eventos representan una fracción limitada de un complejo entramado de interacciones que se da en la respuesta de los astrocitos sometidos a estrés lipotóxico, por lo que otras moléculas y factores pueden contribuir a la misma. El modelo planteado para la conexión de los tres ejes se representa en la Fig. 13 del Apéndice B.

5. Conclusiones

Mediante el uso de un enfoque computacional, el presente estudio caracterizó los efectos de los lncRNAs AC092687.3 y SERTAD4-AS1 en astrocitos sometidos a estrés lipotóxico. Los resultados evidencian redes de RNA endógeno competitivo para cada lncRNA, donde se incluye las interacciones de cada lncRNA con los miRNAs y los mRNAs diana de los últimos. A partir de esta predicción *in silico* de interacciones para cada lncRNA, y por medio del planteamiento de dos ejes de regulación ceRNA para cada uno, se evaluó el papel que tenían dichas moléculas en el modelo biológico de estudio. Estos ejes ceRNA evidenciaron una fuerte relación de cada lncRNA, con procesos y vías que llevan a la disfunción mitocondrial, lo que puede conducir a la apoptosis y neuroinflamación, los cuales son procesos relevantes en el desarrollo de las EN. Lo anterior se vio respaldado por los procesos asociados con cada lncRNA, (obtenidos del enriquecimiento de miRNAs y mRNAs) como respuesta al estrés, neuroinflamación y muerte celular. Estos resultados proporcionan una base para el estudio de los lncRNAs AC092687.3 y SERTAD4-AS1 en el contexto neurodegenerativo, lo cual, hasta el momento, había permanecido inexplorado. Adicionalmente, en un contexto más general, los resultados contribuyen a una mejor comprensión

de las funciones de los lncRNA en las enfermedades neurodegenerativas y proporcionan indicaciones para futuras investigaciones. Sin embargo, a pesar de la obtención de resultados prometedores, es importante tener en cuenta algunas limitaciones. Entre estas se destaca los posibles sesgos en la obtención de los resultados debido a la selección de bases de datos y herramientas y a los umbrales usados, que puede provocar la pérdida de vías y procesos importantes que no estén involucrados en las últimas. De igual forma, se resalta que los resultados obtenidos son aproximaciones basadas en modelos computacionales. Para confirmar la validez de estas hipótesis, se requiere llevar a cabo la validación experimental de los resultados de forma *in vitro* o *in vivo*.

6. Recomendaciones

Para futuros estudios, se sugiere realizar el análisis de enriquecimiento desde la aproximación GSEA usando perfiles de expresión para los genes analizados, lo cual, permitirá tener un mejor entendimiento de lo que puede estar sucediendo en el modelo biológico de estudio.

Adicionalmente, recomienda llevar a cabo experimentos de validación que pueden incluir la sobreexpresión o la supresión de los lncRNAs bajo condiciones de control y PA para observar cómo esto afecta a la expresión (mediante qPCR) de las otras moléculas de RNA involucradas en los ejes, esto con el fin de corroborar las interacciones propuestas en los ejes ceRNA y darles mayor validez a los mecanismos de acción y significado biológico de los ejes planteados.

Referencias bibliográficas

- Acioglu, C., Li, L., & Elkabes, S. (2021). Contribution of astrocytes to neuropathology of neurodegenerative diseases. *Brain Research*, *1758*, 147291. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147291>
- Ajitkumar, A., & De Jesus, O. (2022). *Huntington Disease*.
- Albert-Gascó, H., Ros-Bernal, F., Castillo-Gómez, E., & Olucha-Bordonau, F. E. (2020). MAP/ERK Signaling in Developing Cognitive and Emotional Function and Its Effect on Pathological and Neurodegenerative Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124471>
- Aloi, M. S., Su, W., & Garden, G. A. (2015). *The p53 Transcriptional Network Influences Microglia Behavior and Neuroinflammation*. *35*(5), 401–415.
- Alzheimer's Disease International. (2021). *World Alzheimer Report 2021*. <https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2021/>
- Angarita-Rodríguez, A., Mendoza-Mejía, N., Gonzalez, J., Aristizabal, A. F., Hidalgo-Lanussa, O., Rubio-Mesa, J. J., Barreto, G. E., & Pinzon, A. (2022). Multi-Omics Integrative Analysis Coupled to Control Theory and Computational Simulation of a Genome-Scale metabolic Model Reveal Controlling Biological Switches in Human Astrocytes Under Palmitic Acid-Induced Lipotoxicity. *Frontiers in Systems Biology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fsysb.2022.896265>
- Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C. L., Serova, N., Davis, S., & Soboleva, A. (2013). NCBI GEO: archive for functional

- genomics data sets—update. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), D991–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- Botuyan, M. V., Cui, G., Drané, P., Oliveira, C., Detappe, A., Brault, M. E., Parnandi, N., Chaubey, S., Thompson, J. R., Bragantini, B., Zhao, D., Chapman, J. R., Chowdhury, D., & Mer, G. (2018). Mechanism of 53BP1 activity regulation by RNA-binding TIRR and a designer protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, *25*(7), 591–600. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0083-z>
- Cai, Y., & Wan, J. (2018). Competing Endogenous RNA Regulations in Neurodegenerative Disorders: Current Challenges and Emerging Insights . In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00370>
- Caraci, F., Battaglia, G., Bruno, V., Bosco, P., Carbonaro, V., Giuffrida, M. L., Drago, F., Sortino, M. A., Nicoletti, F., & Copani, A. (2011). TGF- β 1 pathway as a new target for neuroprotection in Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *17*(4), 237–249. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2009.00115.x>
- Cenini, G., Lloret, A., & Cascella, R. (2019). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 2105607. <https://doi.org/10.1155/2019/2105607>
- Chelombitko, M. A. (2018). Role of Reactive Oxygen Species in Inflammation: A Minireview. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, *73*(4), 199–202. <https://doi.org/10.3103/S009639251804003X>
- Cipolla, G. A., de Oliveira, J. C., Salviano-Silva, A., Lobo-Alves, S. C., Lemos, D. S., Oliveira, L. C., Jucoski, T. S., Mathias, C., Pedroso, G. A., Zambalde, E. P., & Gradia, D. F. (2018). Long non-coding RNAs in multifactorial diseases: Another layer of complexity. *Non-Coding*

RNA, 4(2). <https://doi.org/10.3390/ncrna4020013>

Cuella-Martin, R., Oliveira, C., Lockstone, H. E., Snellenberg, S., Grolmusova, N., & Chapman, J. R. (2016). 53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms. *Molecular Cell*, 64(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.002>

Dahariya, S., Paddibhatla, I., Kumar, S., Raghuwanshi, S., Pallepati, A., & Gutti, R. K. (2019). Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Molecular Immunology*, 112(January), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.011>

De Leo, M. E., Borrello, S., Passantino, M., Palazzotti, B., Mordente, A., Daniele, A., Filippini, V., Galeotti, T., & Masullo, C. (1998). Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 250(3), 173–176. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00469-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00469-8)

Dumont, A., Lohard, S., Maillet, L., Juin, P. P., & Barillé-, S. (2020). NOXA the BCL-2 Family Member behind the Scenes in Cancer Treatment. *Journal of Cellular Signaling*, 1(4), 127–143. <https://doi.org/10.33696/signaling.1.021>

Eleftheriadis, T., Pissas, G., Liakopoulos, V., & Stefanidis, I. (2016). Cytochrome c as a Potentially Clinical Useful Marker of Mitochondrial and Cellular Damage . In *Frontiers in Immunology* (Vol. 7). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00279>

Eno, C. O., Zhao, G., Venkatanarayan, A., Wang, B., Flores, E. R., & Li, C. (2013). Noxa couples lysosomal membrane permeabilization and apoptosis during oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.051>

Erkkinen, M. G., Kim, M.-O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*,

10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>

Faghihi, M. A., Modarresi, F., Khalil, A. M., Wood, D. E., Sahagan, B. G., Morgan, T. E., Finch, C. E., St. Laurent III, G., Kenny, P. J., & Wahlestedt, C. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase. *Nature Medicine*, *14*(7), 723–730. <https://doi.org/10.1038/nm1784>

Fan, C. N., Ma, L., & Liu, N. (2018). Systematic analysis of lncRNA-miRNA-mRNA competing endogenous RNA network identifies four-lncRNA signature as a prognostic biomarker for breast cancer 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *Journal of Translational Medicine*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1640-2>

Feng, N.-N., Du, X.-Y., Zhang, Y.-S., Jiao, Z.-K., Wu, X.-H., & Yang, B.-M. (2023). Overweight/obesity-related transcriptomic signature as a correlate of clinical outcome, immune microenvironment, and treatment response in hepatocellular carcinoma . In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 13). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.1061091>

Fonseka, P., Pathan, M., Chitti, S. V, Kang, T., & Mathivanan, S. (2021). FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *Journal of Molecular Biology*, *433*(11), 166747. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166747>

Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*, *2010*, 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>

González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., & Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's Disease from a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective . In *Frontiers in Molecular*

- Neuroscience* (Vol. 10). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00427>
- Gupta, S., Knight, A. G., Gupta, S., Keller, J. N., & Bruce-Keller, A. J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *120*(6), 1060–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x>
- Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Prakash, P., Wijewardhane, P. R., Hasel, P., Rufen-Blanchette, U., Münch, A. E., Blum, J. A., Fine, J., Neal, M. C., Bruce, K. D., Gitler, A. D., Chopra, G., Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2021). Neurotoxic reactive astrocytes induce cell death via saturated lipids. *Nature*, *599*(7883), 102–107. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03960-y>
- Heilig, R., Lee, J., & Tait, S. W. G. (2023). Mitochondrial DNA in cell death and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, *51*(1), 457–472. <https://doi.org/10.1042/BST20221525>
- Henning, Y., Blind, U. S., Larafa, S., Matschke, J., & Fandrey, J. (2022). Hypoxia aggravates ferroptosis in RPE cells by promoting the Fenton reaction. *Cell Death and Disease*, *13*(7), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05121-z>
- Hidalgo-Lanussa, O., Baez-Jurado, E., Echeverria, V., Ashraf, G. M., Sahebkar, A., Garcia-Segura, L. M., Melcangi, R. C., & Barreto, G. E. (2020). Lipotoxicity, neuroinflammation, glial cells and oestrogenic compounds. *Journal of Neuroendocrinology*, *32*(1), e12776. <https://doi.org/10.1111/jne.12776>
- Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, *33*(7), 673–689. <https://doi.org/10.1007/s40273-014-0243-x>
- Hussain, S. P., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., Hofseth, L. J., Moake, M., Nagashima, M., Forrester, K. S., & Harris, C. C. (2004). p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. *Cancer Research*, *64*(7), 2350–2356.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-2287-2>

Jung, C.-H., Kim, E. M., Song, J.-Y., Park, J. K., & Um, H.-D. (2019). Mitochondrial superoxide dismutase 2 mediates γ -irradiation-induced cancer cell invasion. *Experimental & Molecular Medicine*, 51(2), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0207-5>

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>

Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Tastsoglou, S., Skoufos, G., Karavangeli, A., Pierros, V., Zacharopoulou, E., & Hatzigeorgiou, A. G. (2020). DIANA-LncBase v3: indexing experimentally supported miRNA targets on non-coding transcripts. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D101–D110. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1036>

Kempuraj, D., Thangavel, R., Selvakumar, G. P., Zaheer, S., Ahmed, M. E., Raikwar, S. P., Zahoor, H., Saeed, D., Natteru, P. A., Iyer, S., & Zaheer, A. (2017). Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration . In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 11). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2017.00216>

Khatri, P., Sirota, M., & Butte, A. J. (2012). Ten Years of Pathway Analysis: Current Approaches and Outstanding Challenges. *PLOS Computational Biology*, 8(2), e1002375. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002375>

Klimaschewski, L., & Claus, P. (2021). Fibroblast Growth Factor Signalling in the Diseased Nervous System. *Molecular Neurobiology*, 58(8), 3884–3902.

<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02367-0>

Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>

Lee, H.-G., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2022). Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(5), 339–358. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00390-x>

Leifer, B. P. (2003). Early diagnosis of Alzheimer's disease: clinical and economic benefits. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51(5 Suppl Dementia), S281-8. <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.5153.x>

Lin, M., Liu, N., Qin, Z., & Wang, Y. (2022). Mitochondrial-derived damage-associated molecular patterns amplify neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43(10), 2439–2447. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00879-6>

Lin, T., Hou, P.-F., Meng, S., Chen, F., Jiang, T., Li, M.-L., Shi, M.-L., Liu, J.-J., Zheng, J.-N., & Bai, J. (2019). Emerging Roles of p53 Related lncRNAs in Cancer Progression: A Systematic Review. *International Journal of Biological Sciences*, 15(6), 1287–1298. <https://doi.org/10.7150/ijbs.33218>

Maciotta, S., Meregalli, M., & Torrente, Y. (2013). The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(DEC), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00265>

Neal, M., & Richardson, J. R. (2018). Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(2), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.11.004>

- Nordengen, K., Kirsebom, B.-E., Henjum, K., Selnes, P., Gísladóttir, B., Wettergreen, M., Torsetnes, S. B., Grøntvedt, G. R., Waterloo, K. K., Aarsland, D., Nilsson, L. N. G., & Fladby, T. (2019). Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1399-2>
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., & Tanaka, † Nobuyuki. (2000). Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis. *Science*, *288*(5468), 1053–1058. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>
- Ortiz-Rodriguez, A., Acáz-Fonseca, E., Boya, P., Arevalo, M. A., & Garcia-Segura, L. M. (2019). Lipotoxic Effects of Palmitic Acid on Astrocytes Are Associated with Autophagy Impairment. *Molecular Neurobiology*, *56*(3), 1665–1680. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1183-9>
- Pálmai-Pallag, T., & Bachrati, C. Z. (2014). Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. *Microbes and Infection*, *16*(10), 822–832. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.10.001>
- Parnandi, N., Rendo, V., Cui, G., Botuyan, M. V., Remisova, M., Nguyen, H., Drané, P., Beroukhim, R., Altmeyer, M., Mer, G., & Chowdhury, D. (2021). TIRR inhibits the 53BP1-p53 complex to alter cell-fate programs. *Molecular Cell*, *81*(12), 2583-2595.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.03.039>
- Phatnani, H., & Maniatis, T. (2015). Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020628>
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., & Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement*

- Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(9), 1083–1091.
<https://doi.org/10.1002/mds.25075>
- Qiu, Y., Huang, Y., Chen, M., Yang, Y., Li, X., & Zhang, W. (2022). Mitochondrial DNA in NLRP3 inflammasome activation. *International Immunopharmacology*, 108, 108719.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108719>
- Quan, Z., Zheng, D., & Qing, H. (2017). Regulatory Roles of Long Non-Coding RNAs in the Central Nervous System and Associated Neurodegenerative Diseases . In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 11).
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2017.00175>
- Rahman, I., & Biswas, S. K. (2006). *OXIDANTS AND ANTIOXIDANTS / Antioxidants, Enzymatic* (G. J. Laurent & S. D. B. T.-E. of R. M. Shapiro (eds.); pp. 258–266). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00283-0>
- Rass, E., Willaume, S., & Bertrand, P. (2022). 53BP1: Keeping It under Control, Even at a Distance from DNA Damage. In *Genes* (Vol. 13, Issue 12).
<https://doi.org/10.3390/genes13122390>
- Roberts, T. C., Morris, K. V., & Wood, M. J. A. (2014). The role of long non-coding RNAs in neurodevelopment, brain function and neurological disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), 20130507.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0507>
- Rojas-Cruz, A. F., Martín-Jiménez, C. A., González, J., González-Giraldo, Y., Pinzón, A. M., Barreto, G. E., & Aristizábal-Pachón, A. F. (2023). Palmitic Acid Upregulates Type I Interferon–Mediated Antiviral Response and Cholesterol Biosynthesis in Human Astrocytes. *Molecular Neurobiology*, 60(8), 4842–4854. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03366-z>

- Rose, J., Brian, C., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2020). Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance . In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14).
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.536682>
- Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., & Murshid, N. (2022). BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. In *Life* (Vol. 12, Issue 2).
<https://doi.org/10.3390/life12020256>
- Ruszkiewicz, J., & Albrecht, J. (2015). Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochemistry International*, 88, 66–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.12.012>
- Sahu, M. R., & Mondal, A. C. (2020). The emerging role of Hippo signaling in neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 98(5), 796–814.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jnr.24551>
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146(3), 353–358.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>
- Schaffer, J. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology*, 281–287.
<https://doi.org/10.1097/01.mol.0000073508.41685.7f>
- Schaffer, J. E. (2016). Lipotoxicity: Many Roads to Cell Dysfunction and Cell Death: Introduction to a Thematic Review Series. In *Journal of lipid research* (Vol. 57, Issue 8, pp. 1327–1328).
<https://doi.org/10.1194/jlr.E069880>
- Schönfeld, P., & Reiser, G. (2017). Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration. *Neurochemistry*

- International*, 109, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.018>
- Seo, Y.-W., Shin, J. N., Ko, K. H., Cha, J. H., Park, J. Y., Lee, B. R., Yun, C.-W., Kim, Y. M., Seol, D., Kim, D., Yin, X.-M., & Kim, T.-H. (2003). The Molecular Mechanism of Noxa-induced Mitochondrial Dysfunction in p53-Mediated Cell Death *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 48292–48299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308785200>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Scientific image and illustration software. (s/f). Biorender.com. Recuperado el 6 de septiembre de 2023, de <https://www.biorender.com/>
- Sileo, P., Simonin, C., Melnyk, P., Chartier-Harlin, M.-C., & Cotellet, P. (2022). Crosstalk between the Hippo Pathway and the Wnt Pathway in Huntington’s Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Cells*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/cells11223631>
- Siracusa, R., Fusco, R., & Cuzzocrea, S. (2019). Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies . In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 10). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01114>
- Slack, F. J., & Chinnaiyan, A. M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell*, 179(5), 1033–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.017>
- Soung, A., & Klein, R. S. (2019). *Astrocytes: Initiators of and Responders to Inflammation* (T. Spohr (ed.); p. Ch. 6). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89760>
- Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccarini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., Del Sal, G., Levrero, M., & Blandino, G. (2005). The

- Transcriptional Coactivator Yes-Associated Protein Drives p73 Gene-Target Specificity in Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, 18(4), 447–459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.008>
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., & Blandino, G. (2001). Physical Interaction with Yes-associated Protein Enhances p73 Transcriptional Activity *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), 15164–15173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010484200>
- Takuma, K., Baba, A., & Matsuda, T. (2004). Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 72(2), 111–127. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.02.001>
- Talebi, M., Talebi, M., Kakouri, E., Farkhondeh, T., Pourbagher-Shahri, A. M., Tarantilis, P. A., & Samarghandian, S. (2021). Tantalizing role of p53 molecular pathways and its coherent medications in neurodegenerative diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 93–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.042>
- Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L.-P., & Mi, H. (2022). PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*, 31(1), 8–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.4218>
- Tysnes, O.-B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 124(8), 901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M., & Hertz, L. (2015). Why are Astrocytes Important? *Neurochemical Research*, 40(2), 389–401. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1403-2>

- Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W460-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>
- Wei, C.-W., Luo, T., Zou, S.-S., & Wu, A.-S. (2018). The Role of Long Noncoding RNAs in Central Nervous System and Neurodegenerative Diseases . In *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (Vol. 12). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2018.00175>
- Wei, C. W., Luo, T., Zou, S. S., & Wu, A. S. (2018). The role of long noncoding RNAs in central nervous system and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(September). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00175>
- White, M. J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, R. M., Cambier, J. C., Herold, M. J., van Delft, M. F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, M. E., Huang, D. C. S., & Kile, B. T. (2014). Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. *Cell*, *159*(7), 1549–1562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.036>
- Wu, D., Poddar, A., Ninou, E., Hwang, E., Cole, M. A., Liu, S. J., Horlbeck, M. A., Chen, J., Replogle, J. M., Carosso, G. A., Eng, N. W. L., Chang, J., Shen, Y., Weissman, J. S., & Lim, D. A. (2022). Dual genome-wide coding and lncRNA screens in neural induction of induced pluripotent stem cells. *Cell Genomics*, *2*(11), 100177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100177>
- Xu, L., Liu, T., Liu, L., Yao, X., Chen, L., Fan, D., Zhan, S., & Wang, S. (2020). Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*, *267*(4), 944–953. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09652-y>

- Yakovlev, A. G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., & Faden, A. I. (2004). BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(27), 28367–28374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313526200>
- Yang, J. H., Li, J. H., Jiang, S., Zhou, H., & Qu, L. H. (2013). ChIPBase: A database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 177–187. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1060>
- Yang, S., Zhou, Y., Zhang, X., Wang, L., Fu, J., Zhao, X., & Yang, L. (2021). The prognostic value of an autophagy-related lncRNA signature in hepatocellular carcinoma. *BMC Bioinformatics*, *22*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04123-6>
- Yin, J., Zeng, X., Ai, Z., Yu, M., Wu, Y., & Li, S. (2020). Construction and analysis of a lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in oral cancer. *BMC Medical Genomics*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12920-020-00741-w>
- Zahra, W., Rai, S. N., Birla, H., Singh, S. Sen, Dilnashin, H., Rathore, A. S., & Singh, S. P. (2020). *The Global Economic Impact of Neurodegenerative Diseases: Opportunities and Challenges BT - Bioeconomy for Sustainable Development* (C. Keswani (ed.); pp. 333–345). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9431-7_17
- Zhang, H., Chen, X., Zhang, D., Liu, L., Song, J., Xu, Y., & Tian, J. (2020). Identification of a Novel Six-Long Noncoding RNA Signature for Molecular Diagnosis of Dilated Cardiomyopathy. *DNA and Cell Biology*, *39*(12), 2174–2183. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.5670>
- Zhou, S., Yu, X., Wang, M., Meng, Y., Song, D., Yang, H., Wang, D., Bi, J., & Xu, S. (2021a). Long Non-coding RNAs in Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cell*

and Developmental Biology, 9(August). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.719247>

Zhou, S., Yu, X., Wang, M., Meng, Y., Song, D., Yang, H., Wang, D., Bi, J., & Xu, S. (2021b).

Long Non-coding RNAs in Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases . In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9).

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2021.719247>