



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO  
CHÁVEZ"



---

**EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE UN PERFIL DE MIRNA (MIR-16, MIR-221 Y  
MIR-LET71) LIBRE EN PLASMA COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD EN  
ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.**

---

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIZACIÓN EN REUMATOLOGÍA.

---

AUTORA: PAOLA KINARA REYES LOYOLA

---

DR. JOSÉ FERNANDO GUADALAJARA BOO  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA.

ASESOR: DR. LUIS AMEZCUA GUERRA

MÉXICO, D.F.  
JULIO 2015.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Dr. José Fernando Guadalajara Boo.  
Director de enseñanza.

---

Dr. Manuel Martínez-Lavin  
Jefe de servicio de Reumatología

---

Dr Luis Amezcua Guerra.  
Asesor de Tesis



## **AGRADECIMIENTOS.**

A MI ESPOSO AMADO, DAN GRACIAS POR APOYARME EN CADA UNO DE LOS PROYECTOS QUE HE EMPRENDIDO, POR DARMER PALABRAS DE ALIENTO CUANDO MÁS LAS HE NECESITADO, TE AMO.

A MIS PADRES POR SER LOS PILARES DE MI VIDA, LOS AMO.

A MIS HERMANAS, AIDÉ Y SANDRA POR SER MIS EJEMPLOS A SEGUIR; GRACIAS POR SU AMOR.

A DIOS QUE SIEMPRE HA ESTADO CONMIGO, GRACIAS POR TODOS LOS OBSEQUIOS QUE ME HAS BRINDADO.

A LA FAMILIA DE REUMATOLOGÍA POR LAS ENSEÑANZAS NO SOLO EN EL ÁMBITO DE LO PROFESIONAL.

A MIS PACIENTES POR ENSEÑARME DÍA CON DÍA.

## **CONTENIDO**

<b>1 RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
2.1 Etiopatogenia y epidemiología de espondilitis anquilosante.	8
2.2 Manifestaciones clínicas.	10
2.3 Tratamiento.	12
2.4 Evaluación y seguimiento.	13
2.5 MicroRNA en espondilitis anquilosante.	16
2.6 VCAM e ICAM en espondilitis anquilosante.	16
2.7 Metaloproteasas en espondilitis anquilosante.	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>20</b>
4.1 Objetivo principal.	20
4.2 Objetivos secundarios.	20
<b>5. METODOLOGIA</b>	<b>21</b>
5.1 Diseño de estudio.	21
5.2 Población elegible.	21
5.3 Criterios de inclusión.	21
5.4 Criterios exclusión.	22
5.5 Procedimientos.	22
5.6 Estadístico.	23
<b>6. RESULTADOS.</b>	<b>24</b>
6.1 Pacientes y controles.	24
6.2 Expresión en plasma de los miR en pacientes con EA y controles sanos.	25
6.3 Expresión en plasma de MMP-1, MMP-9, VCAM, ICAM e IL-8 en pacientes con EA y controles sanos.	25
6.4 Evaluación de MMP-9, PCR y miR-Let7i como pruebas diagnósticas.	25

<b>6.5 Correlación de niveles de expresión plasmática de miR-16, miR-Let7i, miR-221, MMP-1, MPP-9, PCR, VCAM e ICAM con la puntuación obtenida en las escalas BASFI, BASDAI, ASQoL y ASDAS.</b>	<b>26</b>
<b>7. DISCUSIÓN.</b>	<b>29</b>
<b>8. CONCLUSIÓN.</b>	<b>31</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>32</b>

## **1. RESUMEN.**

La espondilitis anquilosante (EA) afecta principalmente a varones jóvenes menores de 30 años. Es claro que el diagnóstico y tratamiento oportunos pueden, eventualmente, disminuir la progresión a anquilosis y discapacidad permanente. Actualmente no existen biomarcadores confiables que reflejen el grado de actividad de la EA, y los miR tienen alto potencial para funcionar como marcadores. Sin embargo, para que los miR puedan funcionar como marcadores de enfermedad, deben ser medidos en muestras fáciles de obtener y rápidas de procesar, lo que no sucede con su determinación en células mononucleares de sangre periférica; así, nosotros proponemos realizar la medición de estos en plasma, el cuál sí es fácil de obtener y rápido de procesar.

Se exploró si hay diferencias en la concentración de miR-221, miR-16 y let-7i libre en el plasma de pacientes con EA en comparación con individuos sanos, y si estas diferencias son capaces de reflejar el grado de actividad de la EA. Además, evaluar si el nivel de miR-16, miR-221 y let-7i libre en plasma correlaciona con la actividad de la EA evaluada mediante las escalas clínicas ASDAS, BASFI, BASDAI y ASQoL; así con las concentraciones séricas de Metaloproteasa (MMP) 1 y 9, molécula de adhesión al endotelio vascular (VCAM-1) y moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Etiopatogenia y epidemiología de espondilitis anquilosante.

La espondilitis anquilosante (EA) es una entidad clínica perteneciente al espectro de padecimientos denominados como espondiloartritis (SpA). La EA se caracteriza por episodios alternantes de artritis en el esqueleto axial y periférico, formación de hueso en sitios aberrantes e involucro de tejidos extra articulares [1].

La asociación de EA con HLA-B27 es ampliamente conocida, y este subtipo de HLA tiene 3 características que lo distinguen del resto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I. 1) especificidad de unión, 2) tendencia a plegarse y 3) predilección de las cadenas pesadas a formar homodímeros durante el proceso de reciclamiento de la superficie celular.

La especificidad de unión del bolsillo de unión B en la hendidura de unión del HLA-B27+ es a péptidos de longitud menor 30 amino ácidos (aa), y que esta unión confiere un fenotipo de lento plegamiento resultado en una acumulación de una porción de las cadenas pesadas sintetizadas de *novo* en el retículo endoplásmico (RE), lo que produce estrés en el RE.

Aparte se han proceso otras vías en las cuales el HLA-B27 está involucrada en la patogénesis de la EA [2] Fig 1.

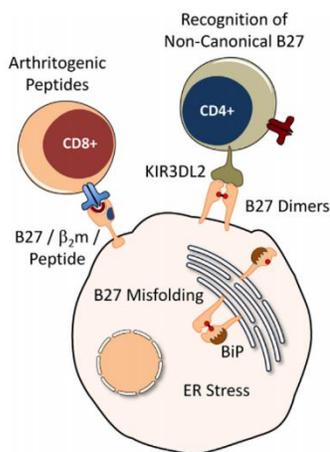


Fig 1. Hipótesis actuales de HLA-B27 en EA.

- 1) Péptidos artritogénicos se unen a HLA-B27 adecuadamente plegados y son presentados a linfocitos CD8+ autorreactivos
- 2) Reconocimiento no canónico de HLA-B27, por inmunoglobulinas asesinas (KIR3DL2)
- 3) Formación de oligómeros mal plegados unidos a BiP a las cadenas pesadas causando estrés del RE.

Tomado de Colbert R A, Tran T M, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. Molecular immunology. 2014; 47: 44-51.

La autofagia es una vía conservada y estrictamente conservada por lo que contenido celular pueden ser secuestrados y dirigidos a degradación lisosomal. La autofagia es un proceso basal presente en las células, sin embargo la acumulación de proteínas mal plegadas induce la expresión de esta vía.

Se han propuesto complejos de genes no-HLA a la patogénesis de EA, uno de los más estudiados y asociados; tanto en razas blancas y no blancas, es el ERAP; tanto los haplotipos ERAP-1 t y ERAP-2. ERP-1 y ERAP-2 son amidopeptidasas encargadas de degradar proteínas a péptidos con la longitud adecuada para unirse al complejo  $\beta$ 2m-cadena pesada, lo cual es indispensable para que el HLA-B27 madure a un complejo trimolecular en el retículo endoplásmico. El ERAP-1 también promueve la expresión de receptores de superficie para TNF, IL-1 e IL-6 y es posible que puedan modificar el balance de citocinas y su unión a sus receptores. Otros genes no-HLA propuestos son genes IL-1R, IL-23R [3].

La prevalencia e incidencia de la EA tiene diferencias considerables entre las diferentes poblaciones y grupos étnicos. La prevalencia es mucho más común entre familiares relacionados en primer grado con pacientes HLA-B27+, ya que el 10 al 30% de ellos tienen signos o síntomas de EA.

En México la EA corresponde al 60% de todas las SpA; teniendo una prevalencia del 0.09% de la población, esto fue reportado en el 2008, que corresponde a 64, 686 individuos. En la población pediátrica con artritis idiopática juvenil, la variedad artritis relacionada con entesitis representa el 35%; y la asociación en esta población con la presencia de HLA-B27 es del 90%. El 75% de los pacientes con artritis relacionada con entesitis cumplirán los criterios de Nueva York modificados para EA en un periodo de 5 a 10 después de haber presentado los síntomas.

El 45% de los pacientes con SpA indiferenciada, tendrán criterios diagnósticos de EA en los siguientes 3 años de haber presentado síntomas.

El gasto anual de para el tratamiento anual de un paciente con en EA es aproximadamente \$1710 dólares, siendo el 25.3% cubierto por la familia directamente, esto es reportado por

los servicios de salud en EUA, sin contar que las pérdidas económicas por ausencia laboral ya que la mayoría de los pacientes inician sintomatología en edad productiva laboral [4].

## **2.2 Manifestaciones clínicas.**

### Musculoesqueléticas.

#### *Lumbalgia*

Es el síntoma más común, presentándolo hasta el 80%, el dolor puede ser severo en fases iniciales de la enfermedad, se puede localizar en la articulación sacroiliaca y se irradia a las crestas iliacas, trocánter mayor o región dorsal del muslo. El dolor alterna del lado a lado y se incrementa con movimientos que provoquen un movimiento repentino de la espalda. Con la evolución suele volverse bilateral persistente con sensación de rigidez y dolor en la parte inferior de la espalda que es peor en la mañana, el dolor suele despertar al paciente mientras duerme, especialmente durante la segunda mitad del sueño.

#### *Dolor torácico.*

Esto es debido al involucro de la columna torácica y la presencia de entesitis en las articulaciones costoesternal y esternoclavicular, que se incrementa con movimientos inspiratorios y espiratorios. En fases iniciales de la enfermedad se puede evidenciar una leve a moderada reducción de la expansión de la caja torácica.

#### *Entesitis.*

Estas lesiones son en sitios de unión de tendones y esqueleto; complejo entesial, siendo los sitios más afectados tendón de Aquiles, articulaciones costoesternal, procesos espinosos, cresta iliaca, trocánter mayor, tuberosidades tibiales.

#### *Articulaciones extra axiales.*

Las articulaciones coxofemorales y glenohumeral son las más frecuentes articulaciones extra axiales, afectando hasta el 35%. En población mexicana la enfermedad coxofemoral la más común. La rodilla también se puede afectar en EA. La articulación temporomandibular se afecta en el 10% de los casos.

## Manifestaciones extra axiales.

### *Oftalmológico.*

Uveítis anterior aguda o iridociclítis es el más común manifestación extra articular, ocurre en el 25 a 30% de los pacientes; no hay una clara relación con la actividad articular. La mayoría de los ataques se autolimita entre las 4 a 8 semanas; sin embargo se debe de dar tratamiento oportuno para evitar secuelas oculares.

### *Enfermedad cardiovascular.*

Las afectaciones pueden ser silentes o causar manifestaciones clínicas, que involucran aortitis ascendente, incompetencia de válvula aórtica, conducción eléctrica anormal, cardiomegalia y pericarditis.

La incompetencia aórtica es secundaria a la dilatación e inflamación de la aorta. Las alteraciones en la conducción eléctrica se incrementan conforme a la duración de la enfermedad. La prevalencia de infarto al miocardio es de 4.4% en pacientes con EA, comparado con el 2.1% de la población general.

### *Enfermedad pulmonar.*

El involucro pulmonar es una rara manifestación tardía, caracterizada por fibrosis pulmonar de lóbulos superiores, suelen aparecer a 2 décadas después de la presentación del inicio de la enfermedad. Las manifestaciones pueden ser tos, disnea y algunas veces hemoptisis.

### *Involucro neurológico.*

Las complicaciones neurológicas de EA pueden ser causados por fractura, inestabilidad articular, compresión o inflamación. Los niveles de raíces nerviosas más comúnmente involucrados son C5-C6 o C6-C7. La subluxación atlantoaxial espontánea se observa más en pacientes con afectación periférica que aquellos con afectación axial únicamente.

El síndrome de cauda equina es una rara pero grave complicación, el síndrome afecta las raíces nerviosas lumbosacras. Las lesiones no compresivas existen; como pueden ser aracnoiditis y adhesión aracnoidea.

### *Involucro renal.*

La nefropatía por IgA ha sido reportada en el 37% de los pacientes, hematuria microscópica y proteinuria puede ocurrir en el 35%, la significancia clínica de estos hallazgos y el deterioro de la función renal es incierta [5].

### **2.3 Tratamiento.**

Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) tienen eficacia y efectividad demostrada para el alivio de síntomas. Cuando se administran por periodos prolongados hasta por un año, pueden mejorar la movilidad espinal y los reactantes de fase aguda. Se ha demostrado misma eficacia con inhibidores selectivos y no selectivos de COX-2, sin embargo el riesgo a efectos adversos gastrointestinales son más frecuentes con el uso de los últimos.

Los fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) de la artritis reumatoide, metotrexato, leflunomida y sulfasalazina en la EA proveen modesta mejoría solo en artritis periférica.

Mientras que los glucocorticoides pueden ser efectivos en tratamiento local intra articular o en entesitis periférica.

El pamidronato, un bisfosfonato administrado por vía intravenosa (IV), mostró efectividad sintomática en afectación axial.

### *Terapia biológica.*

El tratamiento anti-TNF es la piedra angular en la EA; cuatro anti-TNF han probado beneficio en el EA, infliximab, etanercept, adalimumab y golimumab. Todos han demostrado respuesta ASAS-20 en rango de 55 a 60% y respuesta ASAS-40 en rango de 45-50%. El grupo de pacientes que ha tenido mejor resultado con esta terapia, son aquellos con estadio pre-radiográfico y con una enfermedad de corta duración con mejoría en parámetros objetivos; reactantes de inflamación, cambios histopatológicos de la sinovia y hallazgos en resonancia magnética; sin embargo hasta el momento no han demostrado eficacia en la prevención en el daño estructural [5].

## **2.4 Evaluación y seguimiento.**

El tratamiento temprano de la enfermedad ha mostrado disminuir la tasa de progresión de daño radiográfico, por lo que las escalas clinimétricas y biomarcadores que gradúan la actividad de la enfermedad, juegan un papel crucial para valorar respuesta o falla a tratamiento. Sin embargo, hasta el momento no hay un consenso sobre la aplicación de estas herramientas para la medición de la actividad de la enfermedad [1].

La medición de la actividad y las alteraciones funcionales en los pacientes con EA se realiza mediante la aplicación de escalas clínicas. En estas se incluye el índice de actividad de la enfermedad de espondilitis anquilosante (BASDAI, por sus siglas en inglés), propuesta en el año de 1994 por Garrett y colaboradores y que evalúa los 5 principales síntomas de EA (cansancio, artritis axial y periférica, áreas de sensibilidad y rigidez articular matutina) mediante el uso de escalas análogas visuales de 10 cm. Este índice tiene confiabilidad, reproducibilidad y sensibilidad al cambio. El BASDAI ha sido usado como medidor de la actividad de la enfermedad en ensayos clínicos que prueban diferentes tratamientos; actualmente, hay versiones adaptadas a diferentes idiomas, incluyendo el español [6].

EL índice de la funcionalidad de EA (BASFI, por sus siglas en inglés) es el instrumento preferido para la medición de la función en EA. La función física no es un parámetro único, sino más bien una colección de diferentes conceptos de salud. El deterioro de 0.5 a 1 unidad por año o un puntaje basal alto de BASFI pueden predecir un curso de la enfermedad severa con el tiempo [7].

Recientemente se han creado nuevas herramientas para medir la actividad que incluyen variables clínicas y de laboratorio, como el puntaje de actividad de la EA (ASDAS, por sus siglas en inglés), la cual es simple, reproducible y discrimina entre diferentes grados de actividad de la enfermedad y de remisión: Además de explorar los 5 principales síntomas de EA, esta escala incluye los reactantes de fase aguda proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG) [8]. En estudios exploratorios se encontró sensibilidad y especificidad para remisión de 76.9% y 88%, para actividad leve de 86.9% y 75.8%, y para actividad alta de 85.8% y 76%, respectivamente [9]. Si bien es atractivo y fácil de realizar, la

medición de PCR y VSG en forma independiente es insuficiente en el ámbito de EA, ya que son poco específicos de la enfermedad; sin embargo sus niveles séricos no se correlacionan bien con el grado de actividad de la enfermedad [10].

Instrumento para medir la calidad de vida para espondilitis anquilosante (ASQoL) toma una serie de conjuntos de parámetros que ayuda a valorar el impacto de la EA y podría ayudar a valorar la respuesta del tratamiento según el punto de vista del paciente [11].

Existen otras escalas que incluyen estudios de imagen sea radiografía o resonancia magnética. Estas incluyen al índice radiológico de espondilitis anquilosante (BASRI), sin embargo su aplicación involucra mayor costo y no es factible realizarlo en forma rutinaria en la consulta diaria [12].

Se han explorado diferentes biomarcadores séricos, los cuales están involucrados en la fisiopatogenia de la enfermedad y su correlación con la actividad de la enfermedad, Tabla 1 [9]. Su valor clínico está por definirse.

<b>Biomarcador</b>	<b>Prueba estadística</b>	<b>Valor de P</b>	<b>Comparador</b>
Metaloproteasa-3 de matriz	Correlación de Spearman	0.0007	BASDAI
		0.017	BASDAI
	ROC	0.01	BASDAI
		0.009	BASDAI
		0.014	PCR
Nivel basal de BALP	Correlación de Spearman	0.005	PCR
Neopéptido C2C	Regresión lineal	0.048	PCR

	Correlación de Spearman	de	0.04	VSG
	Correlación de Spearman	de	<0.05	VSG
Propéptido-C de colágeno tipo II	Correlación de Spearman	de	<0.05	BASDAI
Factor estimulador de colonias de macrófago	Correlación de Spearman	de	0.004	BASDAI
Amiloide A	Correlación de Spearman	de	0.007	BASDAI
	Correlación de Pearson	de	< 0.0001	BASDAI
Interleucina 6	Correlación de Spearman	de	<0.0011	PCR
			<0.0011	VSG
			0.034	PCR
	Correlación de Spearman	de	0.001	VSG
			0.0327	BASDAI
Basal de VEGF	Correlación de Spearman	de	0.030	PCR
VEGF a 2 años			0.009	VSG
			0.018	BASDAI
			0.010	PCR
			0.011	VSG

0.003

BASDAI

## **2.5 MicroRNA en espondilitis anquilosante.**

Los microRNA (miR) son moléculas pequeñas monocatenarias de ácido ribonucleico (RNA) no codificante, constituidos aproximadamente de 22 nucleótidos, que regulan la expresión de múltiples genes a nivel post transcripcional. Estos miR juegan un papel importante en las vías de regulación de procesos fisiológicos [13], y su expresión alterada se ha encontrado implicada en la patogénesis de diferentes formas de artritis [14, 15].

El involucro de los miR en EA apenas se está explorando [16, 17]. En un estudio se exploraron 270 miR en linfocitos T de sangre periférica de pacientes con EA. Sin embargo, únicamente el miR-16, miR-221 y let-7i se encontraron sobre expresados en los pacientes con EA. De hacer notar, la concentración de estos miR mostró una correlación positiva con el índice BASRI para columna lumbar. Adicionalmente, no se encontró correlación con los niveles séricos de PCR o el grado de sacroiliitis por radiografía [17]. Se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-16, miR-221 y let-7i suprime la expresión de Bcl-2, c-kit y TLR4, respectivamente. Además, let-7i se ha visto involucrado en la sobreproducción de interferón- $\gamma$  y en la supresión de la expresión del receptor TLR-4.

## **2.6 VCAM e ICAM en espondilitis anquilosante.**

Las manifestaciones extra articulares son responsables del incremento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes con espondilitis anquilosantes. Una alta incidencia de mortalidad cardiovascular sea reportado en los paciente con EA, Han y colaboradores encontraron un incremento de riesgo a aterosclerosis 1.5 veces más en comparación a población sana.

Este incremento de riesgo cardiovascular se observa en diferentes patologías reumáticas, esto es secundario a la mediación de factores inflamatorios, los cuales se asocian a aterosclerosis acelerada. Especialmente en paciente con EA la hipertensión, niveles bajos

de colesterol-HDL y apoA-1 se correlaciona con este incremento del riesgo cardiovascular [18].

Las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 se encuentran expresadas en la superficie luminal de las células endoteliales o en forma soluble en el plasma. Su función es mediar la adhesión de varios tipos de leucocitos a la superficie endotelial para su posterior diapédesis. Su producción es estimulada por citocinas inflamatorias.

En el 2012 Stinghen y colaboradores, exploró la correlación entre los niveles plasmáticos de VCAM-1 e ICAM-1 con el grado de actividad de la enfermedad; usando escalas de actividad de la enfermedad (BASDAI, BASFI, ASDAS y ASQoL) y reactantes de inflamación (PCR). En una cohorte de 85 pacientes sin tratamiento de terapia anti-TNF, encontraron que los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 no se correlacionó con ninguna de las escalas de actividad de la enfermedad y reactantes de la inflamación [19], sin embargo estos resultados son contradictorios; ya que Garg y colaboradores, en el 2014 realizaron un estudio de intervención en un grupo de 32 pacientes solo con tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad (FARME), recibieron tratamiento con rosuvastatina 10 mg/día o placebo por 24 semanas. Se realizaron mediciones basales de dilatación media de flujo (FMD) por USG-Doppler, escalas de actividad (BASDAI y BASFI), reactantes de inflamación (PCR y VSG), citocinas inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ) y moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1). En este estudio se reportó mejoría de la FMD, disminución de niveles séricos de IL-6, PCR, ICAM-1, posterior al tratamiento. Pero no se encontró mejoría en los puntajes de las escalas BASFI y BASDAI [20].

## **2.7 Metaloproteasas en espondilitis anquilosante.**

La remodelación de la matriz extracelular es clave para la homeostasis tisular. En situaciones patológicas como es en EA la relación normal del proceso de reparación esta alterada. El remodelado de la MEC libera productos de degradación proteica, neopéptidos, que son generados por las proteasas expresados localmente en el área afectada. Estos fragmentos de degradación pueden servir como biomarcadores de la actividad de la enfermedad.

Colágena tipo V es importante para la formación de fibras de colágeno, también se ha implicado en la inducción de la activación y motilidad en diferentes tipos celulares. Se ve sobre expresado en procesos de recambio tisular alto. Las MMP son endopeptidasas, las cuales son claves en la degradación proteica de la MEC como son el colágeno y proteoglicanos. La MMP 2 y 9 degradan el colágeno tipo V, Veidal y colaboradores en el 2012, reportaron que estas dos metaloproteasas están sobre activadas en la EA, esto fue demostrado al encontrar altas concentraciones de C5M, neo péptido de degradación de colágeno V, en los pacientes con EA a comparación de controles sanos. Por lo que proponen como un biomarcador este neopéptido como actividad de la enfermedad [21]. Skjot-Arkil H y colaboradores en el 2012, reportaron que MMP y catepsina degradan la proteína C reactiva, realizaron medición de PCR sérica, MMP-PCR y catepsina-PCR (CAT-PCR) en 40 pacientes con EA y 40 controles pareados por edad y sexo, en dicho estudio se reportó que en pacientes con EA tenían concentraciones elevadas de MMP-PCR y CAT-PCR a comparación de controles sanos, mientras que no hubo diferencia de concentraciones séricas de PCR entre EA y controles sanos; también proponen a estos dos neopéptidos como biomarcadores de la actividad de la enfermedad [22].

La MMP-1 es una colagenasa intersticial que es capaz de degradar colágeno tipo II y tipo III, está involucrado en múltiples procesos fisiológicos que mantienen la integridad osteocondral. Kaspiris A. y colaboradores en el 2013 reportaron sobreexpresión de MMP-1 en los osteoblastos en muestras de sinovia de pacientes con osteoartritis avanzada, ellos proponen que esta sobre expresión promueve la degradación de colágeno tipo I no mineralizada, exponiendo sitios de superficie ósea. Siendo esto un prerrequisito para activación de osteoclastos y degradación ósea. En este mismo estudio se reportó la presencia de células apoptóticas con sobreexpresión de MMP-1, sugiriendo que la MMP-1 tiene sustratos de como receptores de citocinas, enzimas y receptores de superficie celular [23].

Con base en estos antecedentes, proponemos explorar la concentración de miR-221, miR-16 y let-7i en plasma, así como las concentraciones plasmáticas de IL-8, MMP-1, MMP-9, VCAM e ICAM en pacientes con espondilitis anquilosante y su correlación con el grado de

actividad de la enfermedad, mediante la aplicación de los índices clinimétricos BASDAI y ASDAS; así como su correlación con funcionalidad y calidad de vida mediante la aplicación de BASFI Y ASQoL respectivamente.

### **3. Justificación**

La EA afecta principalmente a varones jóvenes, alrededor de los 30 años de vida. Es claro que el diagnóstico y tratamiento oportunos pueden, eventualmente, disminuir la progresión a anquilosis y discapacidad permanente [4]. Actualmente no existen biomarcadores confiables que reflejen el grado de actividad de la EA, y los miR tienen alto potencial para funcionar como marcadores [9]. Sin embargo, para que los miR puedan funcionar como marcadores de enfermedad, deben ser medidos en muestras fáciles de obtener y rápidas de procesar, lo que no sucede con su determinación en células mononucleares de sangre periférica; así, nosotros proponemos realizar la medición de estos en plasma, el cuál sí es fácil de obtener y rápido de procesar.

### **4. Hipótesis**

La medición de miR-221, miR-16 y let-7i libre en plasma servirá para discriminar pacientes con EA de individuos sanos, y funcionará como marcador de actividad de la EA.

#### **4.1 Objetivo principal**

Explorar si hay diferencias en la concentración de miR-221, miR-16 y let-7i libre en el plasma de pacientes con EA en comparación con individuos sanos, y si estas diferencias son capaces de reflejar el grado de actividad de la EA.

#### **4.2 Objetivos secundarios**

- 1- Evaluar si el nivel plasmático de miR-16, miR-221 y let-7i libre en plasma correlaciona con la actividad de la EA evaluada mediante las escalas clínicas ASDAS, BASFI, BASDAI y ASQoL.
- 2- Evaluar si el nivel plasmático de MMP-1, MMP-9, VCAM-1, ICAM-1 y PCR solubles en plasma correlaciona con la actividad de la EA evaluada mediante las escalas clínicas ASDAS, BASFI, BASDAI y ASQoL.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Diseño de estudio.

Estudio exploratorio de corte transversal.

### 5.2 Población elegible.

Pacientes de los departamentos y servicios de reumatología de las siguientes sedes hospitalarias:

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Hospital General “Manuel Gea González”.

### 5.3 Criterios de inclusión.

Hombres y mujeres mayores de 18 años de edad que cumplan los criterios diagnósticos modificados de Nueva York de 1984, de acuerdo a:

<i>Criterios radiológicos</i> 1- Sacroilitis bilateral grado $\geq$ II o unilateral grado III a IV.
<i>Criterios clínicos.</i> 1- Lumbalgia y rigidez lumbar de duración de al menos de 3 meses, mejora con el ejercicio y no mejora con el descanso. 2- Limitación del movimiento de columna lumbar, tanto en el plano sagital y planos frontales. 3- Limitación de la expansión torácica en relación con los rangos normales para edad y sexo.
<i>Diagnóstico definitivo es 1 criterios radiológico + 2 criterios clínicos.</i>

Las muestras de sanguíneas se obtuvieron de individuos clínicamente sanos, donadores de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, aparejados por edad ( $\pm 5$  años) y género.

#### **5.4 Criterios exclusión.**

Paciente con infección activa, neoplasia, embarazo, cirugía o trauma reciente (último mes).

#### **5.5 Procedimientos.**

1- Hoja de colección de datos (ver anexo1)

2- La aplicación de escalas clínicas BASDAI, ASDAS, BASFI y ASQoL (Anexo 1). El cálculo de puntaje de ASDAS se realizara por el investigador usando la aplicación on-line [http://www.asas-group.org/clinical-instruments/asdas\\_calculator/asdas.html](http://www.asas-group.org/clinical-instruments/asdas_calculator/asdas.html)

3- Toma de 6 cc de sangre periférica por venopunción en tubo impregnado con EDTA mediante técnica de aspersión.

4- La medición de las concentraciones plasmáticas de MMP-1, MMP-9, VCAM e ICAM se realizará mediante inmunoensayo enzimático ligado a enzimas con técnica de sándwich y reactivos comerciales. Se utilizó reactivos de BioLegend.

5- La extracción de RNA se realizó a partir de 100 microlitros de plasma usando el Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) con 1 microL de RNA bacteriano (Roche). Posteriormente, 2,5 microlitros (RNA 25 ng) del aislado se utilizarán para la transcripción inversa utilizando el TaqMan MicroRNA Transcription Kit (Applied Biosystems) en 15 microlitros de reacción. Las reacciones serán incubadas en un termociclador durante 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, y 5 minutos a 85°C. Después, 3 microlitros de DNAc serán amplificados utilizando el ensayo específico para cada miR en un LightCycler 480 II (Roche, Basilea, Suiza) con el kit LightCycler 480 Probes Master. Las condiciones de termociclado serán: desnaturalización inicial a 95 ° C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s, y 72°C durante 3 s. La cuantificación relativa de miR se estimará por la fórmula 2- (miR objetivo – hsa-miR-39 Cp).

## **5.6 Estadístico.**

Se utilizó la prueba de d'Agostino-Pearson para evaluar el grado de normalidad de la distribución. Las variables dicotómicas serán presentadas mediante frecuencias y proporciones; mientras que las variables ordinales o dimensionales fueron representadas como media y desviación estándar.

La inferencia estadística se realizó mediante coeficientes de correlación de Spearman, según la distribución de los datos. Las diferencias se exploró por prueba Mann-Whitney para variables dimensiones y ordinales. Todos los análisis se realizaron a dos lados y se fijará un valor de significancia en  $P < 0.05$ .

La base de datos se generó en la hoja de cálculo Excel (Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) y se analizará en el paquete estadístico GraphPad Prism ver 4.02 (Graph Pad Inc, San Diego CA, USA).

## 6. RESULTADOS.

### 6.1 Pacientes y controles.

Se reclutaron 17 pacientes con edad promedio 43.5 años de edad, 6 mujeres y 11 hombres, con tiempo de diagnóstico de la enfermedad promedio de 12.85 años. Los pacientes número 4, 6, 8 y 12 tienen tratamiento solo con analgesia, mientras que paciente 7 y 17 con terapia biológica con anti-TNF, etanercept 50 mg semanal y adalimumab 40 mg quincenal, respectivamente, resto de pacientes tenían tratamiento anti inflamatorio no esteroideo (AINE), tabla 2.

No	Edad	Sexo	Dx (años)	Tratamiento
1	44	F	7	Meloxicam 15 mg diarios
2	39	M	15	Diclofenaco 5 mg/d
3	66	M	48	Sulfasalazina 1g/d, Prednisona 7.5 mg/d
4	49	F	8	Paracetamol 500 mg cada 8 horas en caso de dolor
5	29	M	3	Ibuprofeno 400 mg/8 hrs
6	39	F	4	Paracetamol 500 mg en caso de dolor
7	27	M	8	Etanercept 50 mg
8	53	F	2	Sulfasalazina 3g/d, celecoxib 200 mg/24 hrs.
9	28	M	8	sin tratamiento
10	53	M	7	Sulfasalazina 3g/d, celecoxib 200 mg/24 hrs.
11	56	F	2	Sulfasalazina 3g/d, Diclofenaco 50 mg cada 24 hrs
12	26	M	8	Paracetamol 500 mg cada 8 horas en caso de dolor.
13	20	M	0.5	Sulfasalazina 3 g/día, diclofenaco 100 mg/d
14	38	F	6	Sulfasalazina 3g/día, prednisona 5 mg/d
15	59	M	36	Metotrexato 5 mg/sem.
16	62	F	48	Metotrexato 25 mg/sem, Etoricoxib 90 mg/di, Prednisona 5 mg/d
17	54	M	8	Sundilaco 200 mg, adalimumab 40 mg cada 15días

Los controles sanos fueron un total de 14, siendo 6 mujeres y 8 hombres, con edad promedio de 42.65 años de edad.

## 6.2 Expresión en plasma de los miR en pacientes con EA y controles sanos.

Se exploró si había diferencia de expresión de miR-16, miR-Let7i y miR-221 y que pudiera identificar pacientes de los controles sanos esto se realizó mediante la prueba Mann-Whitney, se encontró que solamente que miR-Let7i tiene un  $p < 0.05$  ( $p = 0.03$ ), ver tabla 3.

MIR	EA (PROMEDIO)	CONTROLES (PROMEDIO)	Valor de p
MIR-16	0.49830588	0.44312857	0.7
MIR-LET7I	0.02050938	0.00109	0.003
MIR-221	0.00415	0.0026	0.1

## 6.3 Expresión en plasma de MMP-1, MMP-9, VCAM, ICAM e IL-8 en pacientes con EA y controles sanos.

Se exploró si había diferencia de expresión de MMP-1, MMP-9, VCAM, ICAM e IL-8 y que pudiera identificar pacientes de los controles sanos esto se realizó mediante la prueba Mann-Whitney, se encontró que PCR, MMP-9 tienen una  $p < 0.05$  ( $p = 0.003$  y  $0.009$  respectivamente), ver tabla 4.

MOLÉCULA	EA (PROMEDIO)	CONTROLES (PROMEDIO)	Valor de p
PCR mg/dL	20.2035882	2.97069231	0.003
MMP-1	1275.82353	635.642857	0.1
MMP-9	1202.47059	700.142857	0.009
VCAM	14063.2941	13657.4286	0.3
ICAM	12016.4706	12008.2857	0.6

## 6.4 Evaluación de MMP-9, PCR y miR-Let7i como pruebas diagnósticas.

Se evaluaron las moléculas que mostraron una mayor concentración en pacientes con EA; con un valor de  $p$  significativa (MMP-9, PCR y MiR-Let7i), como pruebas diagnósticas mediante la curva ROC, ver tabla 5., Fg2, Fg3 y Fg4.

MOLÉCULA	% SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD	INTERVALO DE CONFIANZA	Valor de p
MMP-9	85	0.71-0.99	0.0008
PCR mg/dL	81	0.66-0.97	0.003
MIR-LET7I	72	0.53-0.91	0.03

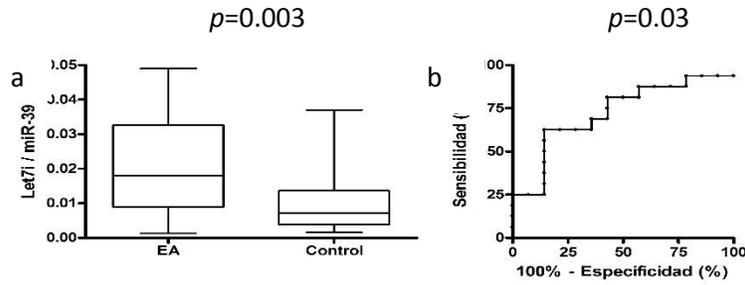


Fig 2.

a) Comparación de niveles séricos de miR-Let7i en plasma de pacientes con EA y controles sanos, fue significativamente mayor en pacientes con EA.

b) Curva ROC teniendo un % sensibilidad/especificidad del 72%

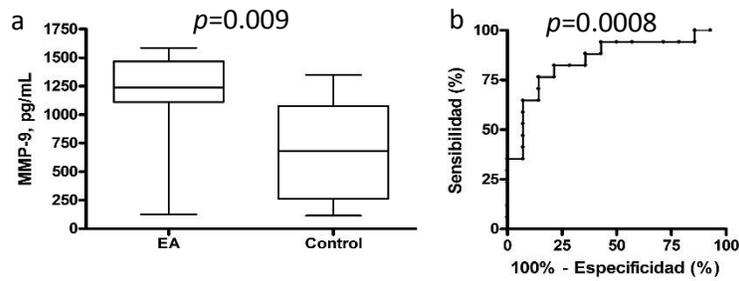


Fig 3.

a) Comparación de niveles séricos de MMP-9 en plasma de pacientes con EA y controles sanos, fue significativamente mayor en pacientes con EA.

b) Curva ROC teniendo un % sensibilidad/especificidad del 85%

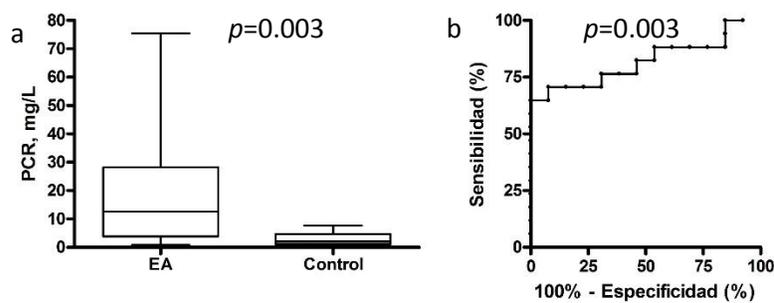


Fig 4.

a) Comparación de niveles séricos de PCR en plasma de pacientes con EA y controles sanos, fue significativamente mayor en pacientes con EA.

b) Curva ROC teniendo un % sensibilidad/especificidad del 81%

### 6.5 Correlación de niveles de expresión plasmática de miR-16, miR-Let7i, miR-221, MMP-1, MPP-9, PCR, VCAM e ICAM con la puntuación obtenida en las escalas BASFI, BASDAI, ASQoL y ASDAS.

Se exploró la correlación entre las diferentes moléculas y las puntuaciones obtenidas en las diferentes escalas clinimétricas, mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Se encontró que las escalas BADAI y ASQoL no tuvieron correlación con ninguna de las moléculas; mientras que el BASFI tuvo correlación directa con PCR, MMP-1 con valor de p significativo (0.006 y 0.002 respectivamente), y con miR-16 tiene una correlación negativa (p=0.005).

Con la escala ASDAS se tiene correlación positiva con PCR y MMP-1 solamente con valor de p significativa (0.001 y 0.004 respectivamente). Ver tabla 5 y Fg 5, 6 y 7.

ESCALA/MOLÉCULA	r	Valor de p
BASFI/MMP-1	0.065	0.004
BASFI/MIR-16	-0.65	0.005
ASDAS/MMP-1	0.65	0.004

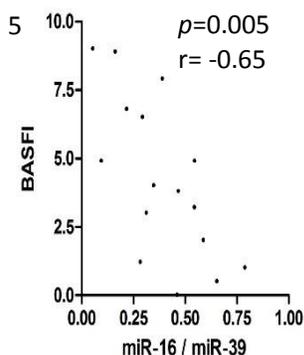


Fig 5.  
Correlación entre los niveles séricos de miR-16 y BASFI en pacientes con EA.

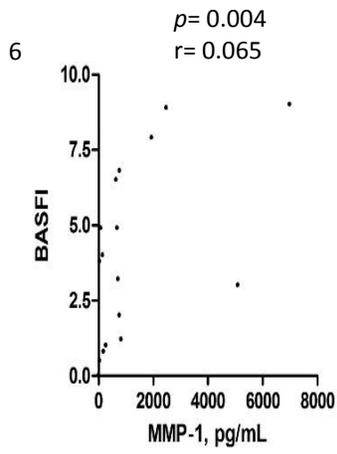


Fig 6.  
Correlación entre los niveles séricos de MMP-1 y BASFI en pacientes con EA.

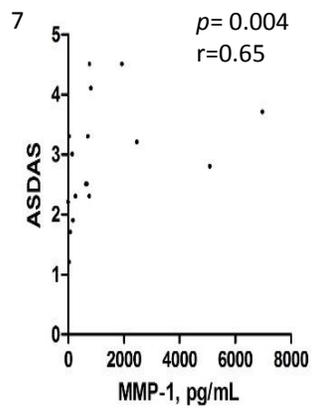


Fig 7.  
Correlación entre los niveles séricos de MMP-1 y BASFI en pacientes con EA.

## 7. Discusión.

En nuestro estudio se demostró que miR-Let7i se encuentra sobre expresada en plasma de pacientes con EA a comparación de controles sanos en población mexicana; mientras que miR-221 y miR-16 no se encontró diferencia significativa; a comparación del estudio realizado por Lei N y colaboradores en población china, en el que se encontró los 3 miR sobre expresados. Esta diferencia respalda la complejidad genética y la patogénesis de la enfermedad, ya que se ha explorado numerosos miR y su correlación con actividad de EA.

MiR-let7i induce autofagia para proteger la células T de la apoptosis mediante expresión a la baja del receptor factor de crecimiento tipo insulínico tipo-1 (IGF1R), ya que inhibe vías de señalización abajo incluyendo inhibición de la fosforilación de mTOR y Akt. También inhibe Bcl-2 y promueve la acumulación de Bax, todo esto resulta en inhibición de apoptosis acelerada de linfocitos T esto es confirmado por incisión de la cascapsa 3y PPAR, Hou y colaboradores también encontraron sobreexpresión de este miR en los pacientes con EA en comparación con pacientes sano, por lo que puede ser una biomarcador útil para diferenciar de los individuos sanos y enfermos [24].

MiR-16 también se relaciona en procesos de apoptosis y diferenciación celular, a comparación de lo reportado por Lei N y colaboradores no se encontró sobre expresado en EA con respecto a controles sanos, el gen de miR-16 se encuentra en el cromosoma 13q14, y la delección bi alélica se asocia con baja expresión de miR-16 [25]. También se ha explorado su nivel de expresión en artritis reumatoide y artritis idiopática juvenil, encontrándose sobre expresado en pacientes con actividad de la enfermedad. MiR-16 inhibe Bcl-2 y sobre expresa las proteínas Bmi1 y CCND1 en macrófagos y monocitos [26]; sin embargo esto no es observado en población mexicana por alteraciones alélicas que no permita la sobre expresión de este miR como es observado en otras poblaciones.

Si bien el miR-16 no es biomarcador adecuado para diferenciar individuos sanos y enfermos en población mexicana. Los niveles séricos tienen una correlación inversa con los puntajes en BASFI, lo cual está en contra en lo observado al menos en AIJ y AR, en donde la correlación es directa. Sin embargo se necesitan estudios longitudinales para explorar la

correlación entre las variaciones anuales de los puntajes del BASFI y los niveles séricos miR-16; ya que un descenso anual del 0.5 a 1 punto del puntaje basal del BASFI se asocia con una EA activa y más agresiva [7].

Como se ha reportado en población brasileña e india, por Feijo V. y Garg N. respectivamente, no hay correlación entre los puntajes de BASDAI, BASFI y ASQoL y los niveles séricos de ICAM y VCAM, pero sí con las cifras de presión sistólica y diastólica arterial, niveles séricos colesterol LDL y HDL así como el incremento de riesgo cardiovascular, sin embargo esto no es el fin nuestro estudio por lo que no recabamos estas variables en nuestra muestra.

Hasta el momento no hay estudios exploratorios de los niveles de expresión de MMP1 y EA, sin embargo creemos que está involucrada en la patogénesis de EA, ya que la sobreexpresión de MMP1 afecta la integridad osteocondral, como lo reportó Kaspiris A. en pacientes con osteoartritis avanzada. Si bien no es adecuado biomarcador para diferenciar individuos sanos de enfermos, si tienen una correlación directa con los puntajes en BASFI, lo cual es de esperarse ya que puntajes basales altos de BASFI puede predecir una actividad más activa y grave. También tiene una correlación directa con ASDAS lo cual apoya su correlación con BASFI.

Los niveles séricos de MMP9 permiten diferenciar pacientes de controles sanos, ya que se encuentra en concentraciones más altas en los primeros. Como lo había reportado Veidal y colaboradores en el 2012, sin embargo no tiene correlación con escalas clínicas.

Como ya es ampliamente conocido los niveles plasmáticos de PCR y otros reactantes de fase agudo tienen una débil correlación con la actividad en forma aislada, por lo que se ha hecho el esfuerzo de incluirlo junto con otras variables clínicas como es en el ASDAS. Aunque en este estudio se vio una diferencia entre las concentraciones séricas de los pacientes con EA y controles sanos, se debe tener con cautela ya que su elevación no es específica de esta enfermedad.

## **8. Conclusión.**

Los biomarcadores que son útiles para diferenciar a los pacientes con EA y controles sanos en población mexicana con PCR, MMP-9 y miR-Let7i, sin embargo no fueron capaces de reflejar el grado de actividad de la EA. Los niveles séricos de MMP-1 es un biomarcador que se correlaciona en forma directa con los puntajes obtenidos en las escalas ASDAS y BASFI. Mientras que la correlación fue inversa del biomarcador miR-16 con el puntaje obtenido en la escala BASFI.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Raychaudhuri SP, Deodhar A. The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis. *J Autoimmun.* 2014 Feb-Mar;48-49:128-33..

[2] Colbert R A, Tran T M, Layh-Schmitt G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis. *Molecular immunology.* 2014;47:44-51.

[3] Alvarez- Navarro C, López de Castro J A. ERAP1 structure, function and pathogenic role in ankylosing spondylitis and other MCH-associate disease. *Molecular Immunology.* 2014; 57: 12-21.

[4] Burgos-Vargas R, Peláez-Ballestas I. Epidemiology of spondyloarthritis in México. *Am J Med Sci.* 2011 Apr;341(4):298-300.

[5] Magharoui A E. extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications. *European Journal of Internal Medicine.* 2011;22:554-60.

[6] Cardiel MH, Londoño JD, Gutiérrez E, Pacheco-Tena C, Vázquez-Mellado J, Burgos-Vargas R. Translation, cross-cultural adaptation, and validation of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the Dougados Functional Index (DFI) in a Spanish speaking population with spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol.* 2003 Jul-Aug;21(4):451-8.

[7] Zochling J, Braun J. Assesments in ankylosing spondylitis. *Best practice and research clinical rheumatology.* 2007; 21: 699-701.

[8] Lukas C, Landewé R, Sieper J, Dougados M, Davis J, Braun J, van der Linden S, Van der Heijde D; Assessment of SpondyloArthritis international Society. Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(1):18-24.

- [9] Godfrin-Valnet M, Prati C, Puyraveau M, Toussirot E, Letho-Gyselink H, Wendling D. Evaluation of spondylarthritis activity by patients and physicians: ASDAS, BASDAI, PASS, and flares in 200 patients. *Joint Bone Spine*. 2013;4:393-8.
- [10] De Vlam K. Soluble and tissue biomarkers in ankylosing spondylitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:671-82.
- [11] Doward L C, et al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 20-6.
- [12] Castrejón Fernández I, Sanz Sanz J. [Conventional Radiology: Total BASRI and SASSS]. *Reumatol Clin*. 2010;6 Suppl 1:33-6.
- [13] Hrdlickova B, de Almeida RC, Borek Z, Withoff S. Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1910-1922.
- [14] Okuhara A, Nakasa T, Shibuya H, Niimoto T, Adachi N, Deie M, Ochi M. Changes in microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod Rheumatol*. 2012;22:446-57.
- [15] Nakasa T, Nagata Y, Yamasaki K, Ochi M. A mini-review: microRNA in arthritis. *Physiol Genomics*. 2011;43:566-70.
- [16] Huang J, Song G, Yin Z, Luo X, Ye Z. Elevated miR-29a expression is not correlated with disease activity index in PBMCs of patients with ankylosing spondylitis. *Mod Rheumatol*. 2014;24:331-4.
- [17] Lai NS, Yu HC, Chen HC, Yu CL, Huang HB, Lu MC. Aberrant expression of microRNAs in T cells from patients with ankylosing spondylitis contributes to the immunopathogenesis. *Clin Exp Immunol*. 2013;173:47-57.
- [18] Maksimowicz-McKinnon K, Bhatt DL, Calabrese LH. *Curr Opin Rheumatol*. 2004; 16: 18–24.

- [19] Feijo A., et al. IL-8 but not other biomarkers of endothelial damage is associated with disease activity in patients with ankylosing spondylitis without treatment with anti-TNF agents *Rheumatol Int.* 2013;33: 1779-83.
- [20] Garg N, Krishan P, Syngle A. Rosuvastatin improves endothelial dysfunction in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2015; 34: 1065-71.
- [21] Veidal S, et al. MMP mediated type V collagen degradation (C5M) is elevated in ankylosing spondylitis. *Clinical Biochemistry* 2012; 45: 541-6.
- [22] Skjot-Arkil H, et al. Investigation of two novel biochemical markers of inflammation, matrix metalloproteinase and cathepsin generated fragments of C-reactive protein, in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical and experimental Rheumatology.* 2012; 30: 371-9.
- [23] Kaspiris A, Khaldi L, Grivas T, Vasiliadis E, Kouvaras I, Dagkas S, Chronopoulos E, Papadimitriou E. Subchondral cyst development and MMP-1 expression during progression of osteoarthritis: An immunohistochemical study. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research.* 2013; 99: 523-9.
- [24] Hou C, Zhu M, Sun M, Lin Y. MicroRNA let-7i induced autophagy to protect T cell from apoptosis by targeting IGF1R. 2014; 453: 728-34.
- [25] Chatzikiyakidou A, Voulgari P, Georgiou I, Drosos A. miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmunity Reviews.* 2012;11: 636-41.
- [26] Kamiya Y, Kawada J-I, Kawano Y, Torii Y, Kawabe S, Iwata N, Ito Y. Serum microRNAs as Potential Biomarkers of Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Rheumatol.* 2015; DOI 10.1007/s10067-015-2922-1.