



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Correlación de la expresión de miR-146a y el
polimorfismo rs2431697 en pacientes con lupus
eritematoso sistémico pediátrico.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Miguel Alejandro Maldonado Gordillo



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Cecilia Contreras Cubas
2016**

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Maldonado
Gordillo
Miguel Alejandro
54 26 91 58
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309177364
2. Datos del tutor
Dra.
Cecilia
Contreras
Cubas
3. Datos del sinodal 1
Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Ernesto
Soto Reyes
Solís
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Vilma Araceli
Maldonado
Lagunas
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Magali
Espinosa
Castilla
7. Datos del trabajo escrito
Correlación de la expresión de miR-146a y el polimorfismo rs2431697 en pacientes con
lupus eritematoso sistémico pediátrico.
61
2016

DEDICATORIAS

Este trabajo y en general son dedicados en especial a ustedes...mamá, papá.

Ustedes a lo largo de este camino siempre han estado conmigo, brindándome su apoyo incondicional y demostrándome el amor que solo una madre y un padre pueden dar a un hijo. Sin importar la circunstancia o dificultad, siempre estaban ahí dispuestos a resolverlos y salir adelante. Por todos los sacrificios que han realizado, aunque no lo digan, lo sé, desde aplazar su salud hasta “quitarse el alimento”.

Los esfuerzos que realizaste papá para que pudiera culminar el último paso, los consejos que me decías, la confianza y en general, la comprensión y cuidados que siempre has tenido conmigo. Sé que a veces quisieras dar todo por nosotros, pero das algo más importante el cariño y amor. A ti mamá el tiempo que dedicaste a mi educación desde edad temprana, por tus palabras de aliento, la preocupación por salud o por saber donde estaba, la lista sería interminable, pero si de alguien he aprendido lo que es ser querido y amado, es de una madre, de ti. Como te lo he dicho, eres mi orgullo.

De ustedes he aprendido demasiado, desde sus enseñanzas hasta en lo que no concordábamos, las pequeñas discusiones suceden así como las llamadas de atención, pero de lo malo también se aprende. Gran parte de lo que soy, se los debo a ustedes y decir un ¡Gracias!, no bastaría para expresar todo el amor, cariño y agradecimiento que tengo por ustedes, las palabras tampoco lo lograrían, por eso sólo puedo decirles: ¡Gracias por todo!

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, por la unión, cariño y por todo el apoyo otorgado en distintas etapas de mi vida. Por los consejos, las palabras de aliento y la ayuda brindada. Me siento afortunado de tener una familia como ésta, de una u otra forma siempre han estado ahí. Por esto y más, gracias tías Tere, Tita y Arminda. También a ustedes primos, Juliana y Luis.

A las personas que han sido parte importante a lo largo de estos años, los amigos se convierten en familia y más:

A ti Pedro, gracias por acompañarme en estas etapas, darme motivación en los momentos que necesitaba y porque no, también por los regaños y peleas, a veces son necesarias para entender que la estamos regando. Y pensar que un principio no nos llevaríamos bien, ahora después de varios años (casi 7, merece reconocimiento el aguantarme tanto tiempo), vas a tener que soportarme mucho más.

A ti Cristina, pensar que en un principio hablábamos muy poco, ahora ni quien nos calle, gracias por la amistad, las risas y tonteras que llegamos a hacer. Los desvelos por hacer los proyectos y trabajos fueron muy amenos, un gran equipo.

A ustedes Gibrán, Alejandro, Héctor y Alexis también, por los ánimos, las ocurrencias y los buenos momentos, mejor familia no pude tener.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, porque en sus instalaciones desde que ingrese a la preparatoria hasta el término en la Facultad de Ciencias, no he dejado de aprender y crecer en lo académico y personal. Me ha otorgado oportunidades que no pensaría como posibles. Es un orgullo haber estudiado en esta, la máxima casa de estudios.

A la Dra. Cecilia Contreras Cubas, por el apoyo en los dos últimos semestres de la carrera, así como haber aceptado el dirigir esta tesis y realizar el servicio social con ella. Agradezco por su tiempo y por compartir su conocimiento.

A la Dra. Lorena Orozco, por permitir la realización del servicio social y la tesis de licenciatura en su laboratorio, del cual me llevo conocimientos y muchas experiencias.

Muchas gracias a mis sinodales: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas y a la Dra. Magali Espinosa Castilla, por aceptar formar parte de mi comité, sus enriquecedoras correcciones y comentarios que hicieron de éste un mejor trabajo.

A todos mis maestros que he conocido en mi etapa académica y también fuera de ella, por darme las herramientas necesarias para concluir etapas, de todos me llevo conocimientos y experiencias que no cambiaría por nada. Entre ellos, de manera especial agradezco a la M. en C. Georgina Nieto, por los consejos, la disposición para aclarar dudas y su ayuda. También hago un agradecimiento especial a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, por la disposición que tuvo para auxiliarme en el último año de la carrera, en una etapa difícil sin haber sido su estudiante, gracias.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica, por las atenciones brindadas y la oportunidad de conocer un campo nuevo que desconocía, donde pude hacer cosas que no hubiera imaginado.

ABREVIATURAS

3'UTR: Región 3' no traducida (por sus siglas en inglés: 3' Untranslated Region)

ACR: Colegio Americano de Reumatología (por sus siglas en inglés: American College of Rheumatology)

Ago2: Proteína Argonauta 2

AIMs: Marcadores Informativos de Ancestría (por sus siglas en inglés: Ancestry Informative Markers)

ANA: Anticuerpos anti-nucleares

APL: Anticuerpos anti-fosfolipídicos

BANK1: Proteína Acarreadora con un Repetido Ankyrin de Células B (por sus siglas en inglés: B-Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1).

CDs: Células Dendríticas

CD40L: Ligando de CD40

CDn: (CD4, CD40) Cúmulo de diferenciación (por sus siglas en inglés: Cluster Differentiation)

cDNA: DNA complementario (por sus siglas en inglés: complementary DNA)

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

Ct: Temperatura umbral (por sus siglas en inglés: Cycle threshold)

CMNs: Células Mononucleares

CNVs: Variantes en Números de Copias (por sus siglas en inglés: Copy Numbers Variants)

DGCR8: Región Crítica Di George (por sus siglas en inglés: Di George Critical Region)

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés: Deoxyribonucleic Acid)

DNMT1: Metil-transferasa de DNA (por sus siglas en inglés: DNA Methyltransferase)

ds-DNA: DNA de doble cadena (por sus siglas en inglés: double strand-DNA)

eSNP: SNP de expresión (por sus siglas en inglés: expression SNP)

FCGR2A: Fragmento Fc de IgG, Receptor de Baja Afinidad IIa (CD32) (por sus siglas en inglés: Fc Fragment Of IgG, Low Affinity IIa, Receptor for [CD32]).

FOXP3: Proteína con Dominio Forkhead Tipo 3 (por sus siglas en inglés: Forkhead Box Protein P3)

Fwd: Sentido directo de los oligos (por sus siglas en inglés: Forward)

gDNA: DNA genómico (por sus siglas en inglés: genomic DNA)

GTP: Guanosin trifosfato (por sus siglas en inglés: Guanosine Triphosphate)

GWAS: Estudios de Asociación de Genoma Completo (por sus siglas en inglés: Genome Wide Association Studies)

HLA-II: Antígeno Leucocitario Humano tipo II (por sus siglas en inglés: Human Leukocyte Antigen)

IC: Intervalo de Confianza

IFN-I: Interferon tipo I

IL-n: (IL-2, 4, 6, 17, 21, 22) Interleucina

IRAK-n: (IRAK1, 4, etc) Receptor Asociado a la Cinasa n (por sus siglas en inglés Interleukin n Receptor Associated Kinase)

IRF-n: (IRF7, IRF9, IRF8, IRF5, IRF3) Factor Regulador de Interferón n (por sus siglas en inglés: Interferon Regulator Factor n).

ITGAM: Integrina Alfa M (por sus siglas en inglés: Integrin, Alpha M).

JAK: Proteína Tirosina Cinasa: Cinasa Janus (por sus siglas en inglés: Janus Kinase).

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LESa: Lupus Eritematoso Sistémico adulto

LESp: Lupus Eritematoso Sistémico pediátrico

LPS: Lipopolisacáridos (por sus siglas en inglés: Lipopolysaccharides)

MAX: Factor X asociado a myc (por sus siglas en inglés: myc-associated factor X)

MGMT: Gen de Metil-guanina-O6-DNA-metiltransferasa (MGMT, por sus siglas en inglés: O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene)

M:H: Relación Mujeres-Hombres

miRNA: microRNA

miRNA*: microRNA estrella

miR-SNPs: SNPs en genes de microRNAs

mRNA: RNA mensajero

MyD88: Factor de Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88 (por sus siglas en inglés: Myeloid Differentiation Primary Response 88).

NF- κ B: Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras kappa de las Células B Activadas (por sus siglas en inglés: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells)

NL: Nefritis lúpica

OR: Razón de momios (por sus siglas en inglés: Odds Ratio)

PACT: Proteína Activadora de Cinasas Inducida por Interferón (por sus siglas en inglés: Protein Activator of the Interferon-Induced Protein Kinase)

Pax5: Gen de Caja Pareada 5 (por sus siglas en inglés: Paired Box 5)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction)

Pol II: RNA Polimerasa 2

PPS: Solución de Precipitación de Proteínas (por sus siglas en inglés: Protein Precipitation Solution)

PPTG1: Proteína Pituitaria Transformadora de Tumor 1 (por sus siglas en inglés: Pituitary Tumor-Transforming 1)

PTPN22: Proteína Fosfatasa Tirocina, No Receptor Tipo 22 (por sus siglas en inglés: Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22)

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones (por sus siglas en inglés: Patron Receptor Recognition)

qPCR: PCR Cuantitativa o en Tiempo Real (por sus siglas en inglés: quantitative PCR)

RAN-GTP: Proteína Nuclear Relacionada a Ras-Guanosina Trifosfatasa (Por sus siglas en inglés: Ras-Related Nuclear Protein- Guanosine Triphosphatase).

RANTES: Ligando 5 de quimiocina con motivo C-también conocido como RANTES (por sus siglas en inglés: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)

RBC: Solución de Lisis de Glóbulos Rojos (por sus siglas en inglés: Red Blood Cell Lysis Buffer).

RISC: Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (por sus siglas en inglés: RNA Induced Silencing Complex).

RLR: Receptores tipo I del Gen Inducible por Ácido Retinoico (por sus siglas en inglés: RIG-I-like Receptors).

RNA: Ácido Ribonucleico (por sus siglas en inglés: Ribonucleic Acid)

RT-PCR: PCR Reverso Transcriptasa (por sus siglas en inglés: Reverse Transcriptase PCR)

Rv: Oligo antisentido (por sus siglas en inglés: Reverse)

SLICC: Colaboración Internacional de Lupus Sistémico (por sus siglas en inglés, Systemic Lupus International Collaboration)

Sm (Smith): Proteína Ribonucleica

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido (por sus siglas en inglés: Single Nucleotide Polymorphism)

ssRNA: RNA de Cadena Simple (por sus siglas en inglés: Single Strand RNA)

STAT-n: (STAT1, STAT4) Transductor de Señal y Activador de Transcripción n (por sus siglas en inglés: Signal Transducer and Activator of Transcription- n)

TCR: Receptor de Células T (por sus siglas en inglés: T Cell Receptor)

TDT: Análisis de Desequilibrio de Transmisión (por sus siglas en inglés: Transmission Disequilibrium Test)

Th-n: (Th1, Th2, Th17) Células T cooperadoras (por sus siglas en inglés: T helpers)

TLR: Receptor tipo Toll (por sus siglas en inglés: Toll-like receptor)

Tm: Temperatura Media

TRAF6: Receptor del Factor de Necrosis Tumoral Asociado al Factor 6 (por sus siglas en inglés: TNF Receptor-Associated Factor 6)

TRBP: Proteína de Unión a RNA Tar (por sus siglas en inglés: Tar RNA Binding Protein)

TSS: Sitio de Inicio de la Transcripción (por sus siglas en inglés: Start Transcription Site)

Tregs: Células T reguladoras

XPO5: Exportina 5

YY1: Factor de transcripción Ying Yang 1

Índice

Resumen	1
I Introducción	3
I.1. El lupus eritematoso sistémico (LES)	3
I.1.1. El lupus eritematoso pediátrico (LESp)	5
I.2. La etiopatogenia del LES	6
I.3. La genética del LES	8
I.4. La vía del interferón tipo I (IFN-I)	10
I.5. Los microRNAs	12
I.5.1. La biogénesis de los microRNAs	12
I.5.2. Los polimorfismos de un solo nucleótido en genes de miRNAs	15
I.5.3. La expresión de miRNAs en LES	16
I.5.3.1. miR-146a en LES	17
I.5.3.2. Polimorfismos de un solo nucleótido en miR-146a y LES	19
II Justificación	21
III Hipótesis	21
IV Objetivos	21
IV.1. Objetivo general	21
IV.2. Objetivos particulares	22

V	Metodología	22
VI	Resultados	26
VI.1.	Las frecuencias alélicas y genotípicas del rs2431697 en población mexicana y su comparación con otras poblaciones continentales	26
VI.2.	Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs2431697 en controles y en pacientes con LESp	27
VI.3.	Estudio de asociación caso-control en pacientes con LESp	29
VI.4.	Estudio de asociación con nefritis lúpica (NL) en pacientes con LESp	29
VI.5.	Estudio de desequilibrio de transmisión (TDT) del SNP rs2431697	30
VI.6.	Correlación genotipo-expresión de miR-146a en pacientes con LESp	30
VI.6.1.	Efecto del SNP rs2431697 en la transcripción de miR-146a en pacientes con LESp	32
VI.7.	Correlación de la expresión de miR-146a con NL en pacientes con LESp	36
VII	Discusión	38
VIII	Conclusiones	42
IX	Referencias	43

Resumen

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica y crónica que afecta predominantemente a mujeres en una relación de M:H de 9:1. Del 10 al 20% del total de los casos con LES se presentan en edad pediátrica y se presenta con una incidencia de 0.36-0.9 niños por cada 100,000 nacidos vivos. El LES pediátrico (LESp) y LES adulto son idénticos en síntomas, sin embargo, el LESP presenta un curso clínico más grave y una mayor afectación de órganos, entre éstas se encuentra la nefritis lúpica (NL), que consiste en el cambio del tejido del parénquima por tejido fibroso en el riñón. Siendo esta afección más frecuente en los pacientes pediátricos y una de las que compromete la vida en mayor medida.

En la patogenia del LES intervienen tanto por factores ambientales como genéticos, sin embargo, la alta heredabilidad de éste y una alta concordancia en gemelos monocigóticos sugieren una importante contribución genética en el desarrollo de este padecimiento. Además, se ha reportado que la incidencia del LES varía de acuerdo al origen étnico de las poblaciones, siendo las poblaciones africanas y latinoamericanas las más afectadas.

Estudios de asociación de genoma completo y de gen candidato, muestran que la mayoría de los genes asociados a LES están involucrados en la respuesta inmune, tales como la vía del interferón tipo I (IFN-I). Asimismo, se han reportado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes de microRNAs (miRNAs), los cuales son RNAs pequeños que regulan a los RNA mensajeros (mRNA) de manera post-transcripcional. En la región genómica que contiene a miR-146a, son numerosos miR-SNPs los que se han encontrado, sin embargo, destacan algunos por estar asociados a enfermedades como cáncer, tal es el caso del miR-SNP rs2910164 localizado en el precursor de este miRNA. Estudios recientes reportan un miR-SNP localizado en la región promotora de miR-146a (rs2431697), el cual comprende el cambio de una citosina (C) por una timina (T). Este SNP se ha asociado a LES en las poblaciones china y europea, y la presencia del alelo T correlaciona con la disminución de la expresión del miRNA maduro en individuos sanos. De manera interesante, en pacientes con LES se ha observado la sub-expresión de miR-146a, el cual tiene como mRNAs blanco a varios genes de la vía de IFN-I (*IRAK1*, *TRAF6*, *STAT1* e *IRF5*), por lo que se le considera un regulador clave en la respuesta inmune. Además en la región que codifica para el pri-miR146a, se encontró un miRNA maduro, el miR-3142. A la fecha, no ha sido estudiado, por lo tanto se desconoce las vías en que pueda participar como regulador negativo.

En el presente estudio se genotipificó el SNP rs2431697 en una cohorte de 343 pacientes y 436 controles en población mexicana. Se realizaron los análisis de asociación caso-control y desequilibrio de transmisión (TDT). Además, se determinaron los niveles de expresión de todas las formas de miR-146a (pri-miR-146a, pre-miR-146a y miR-146a, miR-146a*) y del miRNA maduro localizado en el cuerpo de miR-146a, miR-3142 mediante PCR en tiempo real (qPCR) para determinar la correlación con el genotipo del SNP rs2431697. También se realizó la correlación de la expresión de miR-146a con NL.

El SNP rs2431697 no se encontró asociado a LESP ni a NL en la población mexicana. Sin embargo, al comparar las frecuencias alélicas con otras poblaciones, el alelo menor T se encuentra en menor frecuencia en la población mexicana. Debido a que el SNP rs2431697 se localiza en la región promotora de miR-146a y genes aledaños como miR-3142, se llevó a cabo una correlación del genotipo y los niveles de expresión de los miRNAs. Se observó que los individuos homocigotos TT y heterocigotos CT, presentaron un aumento en la expresión de todas las formas de miR-146a y miR-3142. Estos resultados sugieren que en los individuos portadores del alelo menor T existe una disminución de la transcripción. Utilizando la base de datos ENCODE y la herramienta informática PROMO, se encontraron dos sitios de unión del factor de transcripción NF- κ B cercanos al miR-SNP, además de sitios de unión de Max y Pax5 que coinciden con el sitio de localización del miR-SNP. Además, la base de datos ENCODE revela marcas epigenéticas propias de enhancer, tales como la metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me1) y la acetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H3K27me3), que se encuentran enriquecida en esta zona. Esto sugiere que el sitio donde se encuentra el miR-SNP es un enhancer y no la región promotora como ha sido descrita previamente.

Por último, se observó una tendencia en la disminución en la expresión de la forma madura de miR-146a en pacientes con NL, asociándolo a la gravedad de la enfermedad.

En conclusión, el miR-SNP rs2431697 no se asoció con LESP ni NL en la población mexicana. Los individuos portadores del alelo menor T mostraron una disminución significativa de todas las formas de miR-146a, así como de miR-3142, lo que sugiere que este alelo tiene algún efecto en la transcripción, probablemente al interferir con el reconocimiento de factores de transcripción como NF- κ B, Max y Pax5. De acuerdo a la base de datos ENCODE, el miR-SNP rs2431697 se localiza en un sitio de enhancer, en lugar de la región promotora. Pacientes con NL presentan un aumento en la expresión de miR-146a, por lo que este miRNA podría jugar un papel importante en la gravedad del LES.

I. Introducción

I.1. El lupus eritematoso sistémico (LES).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune con un amplio espectro de presentaciones clínicas, en la que ocurre daño en la mayoría de los órganos y tejidos. Se caracteriza por la producción de auto-anticuerpos, principalmente aquellos que reconocen DNA de doble cadena (anti-dsDNA), así como por la activación del complemento y el depósito de complejos inmunes ¹. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en mujeres en edad reproductiva (entre los 15 y 40 años de edad) en una relación M:H de 9:1, por lo que se piensa que las hormonas contribuyen a su prevalencia mediante mecanismos aún desconocidos ². Algunos de los síntomas característicos de esta enfermedad son: eritema malar, artralgias, fiebre, dolor en los músculos y en el pecho al respirar profundamente, entre otros.

Debido a que esta enfermedad es sistémica, su diagnóstico es difícil y puede confundirse con otras enfermedades. Recientemente, el colegio americano de reumatología (ACR, por sus siglas en inglés: American College of Rheumatology) ha establecido que para diagnosticar a un paciente con LES, este debe de presentar por lo menos cuatro de los once criterios que se enlistan en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de LES. Tomada y modificada de ³.

Criterio	Especificaciones
1. Eritema malar	
2. Erupción discoide	
3. Fotosensibilidad	
4. Úlceras orales	
5. Artritis	
6. Serositis	a) Pleuritis b) Pericarditis
7. Alteraciones renales	a) Proteinuria (>0.5 g/día) b) Cilindros celulares: hemoglobina
8. Desórdenes neurológicos	a) Convulsiones b) Psicosis
9. Alteraciones hematológicas	a) Anemia hemolítica b) Leucopenia (<4,000/mm ³ ≥ a 2 ocasiones) c) Linfopenia (<1,500/mm ³ ≥ a 2 ocasiones) d) Trombocitopenia
10. Alteraciones inmunológicas	a) Anticuerpos anti-DNA b) Anticuerpos anti-Sm c) Anticuerpos anti-APL
11. Anticuerpos	ANA en valores elevados

Sm: Smith. Anticuerpos anti-proteína ribonucleica. APL: Anticuerpos anti-fosfolípidos. ANA: Anticuerpos anti-nucleares

El LES comienza a manifestarse con una fase pre-clínica caracterizada por la producción de auto-anticuerpos y continúa con una fase clínica más específica. En esta última, se produce un estado de inflamación e involucramiento de múltiples órganos (como pulmón y corazón), así mismo en algunos tejidos como el músculo esquelético ⁴. De la misma manera, pueden llegar a ocurrir infecciones o padecimientos como la aterosclerosis, siendo éstos en conjunto una causa de mortalidad (Figura 1).

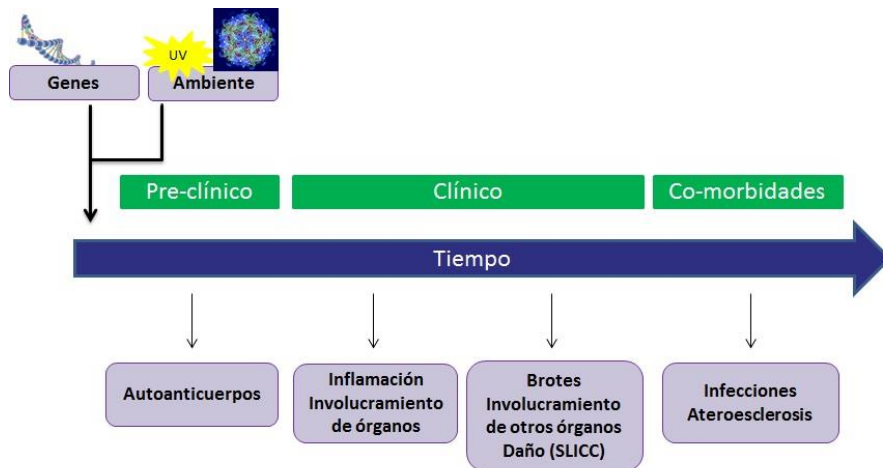


Figura 1. Esquema del curso clínico de LES. La manifestación de la enfermedad comienza con una fase preclínica con la producción de auto-anticuerpos y continúa con una fase con características clínicas más específicas, como inflamación y el involucramiento de órganos. Culmina con el daño sistémico en el individuo, y en conjunto con otros trastornos como aterosclerosis o infecciones que pueden llegar a comprometer la vida del individuo. SLICC: Systemic Lupus International Colaboration. Tomado y modificado de Bertias, G., *et al.* Ann. Rheumatic Dis. 69, (2010). ⁴.

Una de las afectaciones con mayor prevalencia es el daño renal, conocida como nefritis lúpica (NL), la cual se presenta en un 60% de los pacientes con LES. En la NL existe daño en el riñón, que consiste en la degradación del parénquima y su reemplazo por tejido fibroso; sus manifestaciones clínicas incluyen proteinuria, sedimentos urinarios activos y daño renal agudo, por lo tanto se debe de dar un tratamiento oportuno al paciente para evitar un daño permanente ⁵.

El LES es una enfermedad compleja, en la que se han encontrado diferencias entre los pacientes que debutan en edad pediátrica y adulta, principalmente en el cuadro clínico y la gravedad de la enfermedad ^{2,4,6}. Por lo anterior, se ha clasificado en LES adulto (LESa) y pediátrico (LESp).

I.1.1. El lupus eritematoso pediátrico (LESp).

El LESp se presenta con una incidencia de 0.3 a 0.9 por 100,000 niños nacidos vivos por año, y con una prevalencia de 3.3 a 8.8 por 100,000 niños nacidos vivos ^{7,8}. Algunos estudios reportan que la edad media en la que se presenta esta enfermedad en los niños es entre los 11 y 12 años, y es raro encontrar a pacientes con menos de 5 años ^{9,10}. En general, se diagnostica con LESp a aquellos individuos menores de 16 años de edad. Los pacientes diagnosticados con LESp presentan una serie de síntomas que incluyen: fiebre, fatiga, anorexia, pérdida de peso, alopecia y artralgia. Estos y otros signos de inflamación generalizada difusa, incluyendo linfadenopatía y

hepatoesplenomegalia, pueden ocurrir tanto al inicio como durante los brotes de la enfermedad ¹⁰. La tasa de mortalidad del LESp aumenta con el tiempo, y a diferencia del LESa, se mantiene alta a pesar de no existir condiciones mórbidas pre-existentes. Por esta razón, se debe proporcionar un enfoque especializado y multidisciplinario con la finalidad de reducir el daño ¹¹.

Los criterios de diagnóstico más comunes en LESp son: eritema malar, artritis, anormalidades hematológicas, el involucramiento del sistema nervioso central, además de una mayor prevalencia de NL. Estas afectaciones son más frecuentes en los pacientes pediátricos que en los adultos, y cabe mencionar que en conjunto comprometen la vida del individuo ^{8,12,13}. La gravedad del daño en el riñón desencadena, en la mayoría de los casos, en glomerulonefritis que es una característica dominante en el cuadro clínico con una frecuencia del 50 al 75% de los pacientes ^{11,14,15}. En LES, la glomerulonefritis se clasifica de la Clase I (daño mínimo mesangial) a la Clase IV (esclerosis avanzada y nefritis). Dentro de éstas se considera principalmente el involucramiento mesangial, el grado de daño renal y el grado de involucramiento que afecta el glomérulo ¹⁴.

El inicio de LES en edades tempranas se ha asociado con un mayor número de alelos de riesgo, lo que podría explicar la gravedad de LESp en comparación con LESa. Además, se ha observado que la mayoría de las variantes genéticas asociadas a LES se localizan en genes que participan en la señalización o producción del interferón tipo I (IFN-I), lo cual correlaciona con los altos niveles de esta citocina en suero de pacientes, principalmente de IFN- α ¹⁶.

I.2. La etiopatogenia del LES.

Se han propuesto varios factores asociados a la patogenia del LES, entre estos se encuentran los ambientales como el tabaquismo, infecciones por el virus Epstein-Barr, así como la exposición a la luz ultravioleta ¹⁷. La regulación epigenética también se ha asociado al desarrollo de LES, debido a que los pacientes con LES presentan un mayor estado de hipometilación global ¹⁸. Por otra parte, se ha observado que los estrógenos regulan la señalización y activación de las células del sistema inmune, por lo que se sugiere fuertemente que el factor hormonal se encuentra implicado en la patogenia, ya que son las mujeres en edad reproductiva las que presentan mayor incidencia de LES ¹⁹. Se ha reportado que en los brotes de LES, el estrógeno lleva a la sobre-expresión de citocinas del tipo Th2 (IL-4), las cuales a su vez desencadenan la activación de linfocitos B y como consecuencia la producción de auto-anticuerpos que reconocen ds-DNA y la selección de clonas auto-reactivas ¹⁹⁻²¹. También se ha observado un papel importante de los estrógenos en la inflamación sistémica mediante la activación de genes de la vía del IFN-I ²².

La disregulación del sistema inmune en LES se caracteriza por anomalías humorales y celulares, principalmente en la respuesta inmune innata y adaptativa. Aún se desconoce la etiopatogenia del lupus, aunque se ha sugerido que el mecanismo de la apoptosis y el funcionamiento incorrecto de la fagocitosis pueden llevar al reconocimiento de antígenos nucleares propios. Al ocurrir algún daño o infección en la célula, el mecanismo de apoptosis permite mantener la homeostasis y evitar algún daño en los tejidos. Durante este proceso, se libera el contenido celular (cromatina, citocinas pro-inflamatorias, entre otros) que en conjunto pueden ocasionar inflamación y el reconocimiento de los antígenos propios por células presentadoras de antígenos. Las células especializadas se encargan de fagocitar el material expulsado, sin embargo, en LES sucede un procesamiento erróneo en la fagocitosis/apoptosis, lo que ocasiona la acumulación de restos celulares “debris” favoreciendo el reconocimiento de estos auto-antígenos y la formación de auto-anticuerpos ^{23,24} (Figura 2).

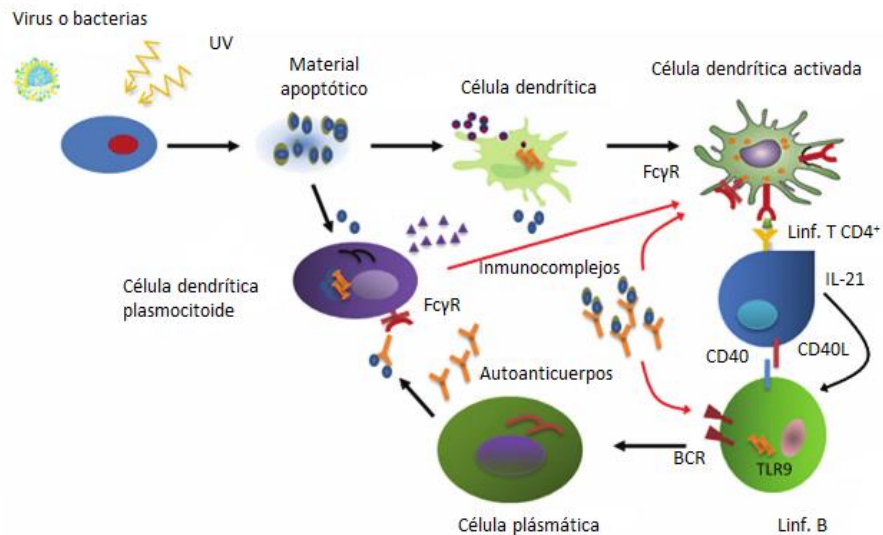


Figura 2. Modelo hipotético de la patogénesis del LES. La apoptosis es provocada por la exposición a radiación UV o alguna infección (viral o bacteriana). El material apoptótico es liberado al medio extracelular y es reconocido por las células dendríticas plasmocitoides (CDPs), las cuales producen IFN-I (triángulos morados) que participa en la maduración de las células dendríticas (CDs). Las CDs activadas reconocen los inmunocomplejos formados por los auto-anticuerpos y presentan los auto-antígenos a los linfocitos T CD4⁺, lo que a su vez lleva a la activación de los linfocitos B y finalmente a la producción de auto-anticuerpos. Tomada y modificada de Bertias, G., *et al.* Ann. Rheumatic Dis. 69, (2010). ⁴.

Estos cambios en la respuesta inmune innata contribuyen al daño sistémico, desencadenando la liberación de citocinas inflamatorias, así como la activación anormal de linfocitos T y B. De esta manera, la actividad citotóxica deficiente de los linfocitos T y la disminución en la producción de

interleucina 2 (IL-2), incrementan el riesgo a desarrollar infecciones ¹⁷. Existe también una sobre-expresión del IFN-I y cambios en la cascada de señalización de esta vía en pacientes con LES ²⁵.

I.3. La genética del LES.

Aunado a los factores ambientales y hormonales, el factor genético del LES se encuentra estrechamente relacionado con su etiopatogenia. Se ha reportado que la concordancia de LES en gemelos monocigóticos es del 24 al 35%, comparado con un 2 a 5% en gemelos heterocigotos ^{26,27}. Además, estudios de agregación familiar muestran que del 10 al 12% de pacientes con LES tienen un primer o segundo grado de relación comparado con el 1% en controles, y que los hermanos de pacientes con LES tienen un riesgo relativamente alto para la enfermedad, con un cociente de riesgo entre hermanos (λ s) de 5.3 a 29 ²⁸. También se ha observado que existen grupos étnicos que son más susceptibles al desarrollo de LES, presentando mayor actividad de la enfermedad, mortalidad, así como una mayor prevalencia de características diagnósticas. Entre los grupos étnicos más susceptibles se encuentran los asiáticos, africanos y latinos ^{14,29}. Se ha observado que en los pacientes africanos y latinos existe mayor probabilidad de daño sistémico y que los niveles de auto-anticuerpos son más elevados ³⁰.

Se ha reportado un número importante de variantes genéticas asociadas a la susceptibilidad a LES ²⁵. Algunos estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés: Genome Wide Association Studies) y de gen candidato en LES, han reportado genes asociados en procesos de la respuesta inmune innata y adquirida ¹. Estos genes que se han categorizado en cuatro grupos: 1) genes que afectan la activación de linfocitos, en particular de los linfocitos B; 2) genes que participan en la respuesta inmune innata, entre los cuales destaca NF-kB y la señalización de IFN-I; 3) genes que participan en el daño en tejido renal, y, 4) genes que participan en la remoción de desechos apoptóticos, cromatina y complejos inmunes ³¹. También se han estudiado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés: Single Nucleotide Polymorphism), variantes en el número de copias (CNVs, por sus siglas en inglés: Copy Number Variations), amplificaciones, inserciones y deleciones asociados a esta enfermedad ³¹⁻³³.

En la población asiática se reportó asociación de CNVs en genes relacionados con las clonas Th17, como lo son *IL-17F*, *IL-21* e *IL-22* (OR=3.67, 12.24 y 6.48, respectivamente), observándose un incremento en su expresión en comparación con sujetos controles ³⁴. En la población mexicana, en pacientes con LES se encontraron CNVs en *TLR7*, presentándose un incremento en su expresión en las mujeres (OR=6.61) en comparación a los hombres, lo que demuestra que esta variante se encuentra asociado en mayor medida al sexo femenino ³⁵.

También se ha reportado la asociación con LES de SNPs localizados en genes del complejo de histocompatibilidad de clase II (*HLA-II*), integrina alfa M (*ITGAM*), en la señalización de linfocitos T y B (*STAT4*, *PTPN22*, *BANK1*, *BLK*, *TNFSF13B*), en la cascada del complemento y en otras vías implicadas en la inmunidad como inflamación o quimioatracción (Tabla 2)^{36,37}.

Tabla 2. Variantes genéticas asociadas a LES. Tomada y modificada de ³⁶.

Afectaciones	Genes asociados a SNPs
Piel	<i>ITGAM</i> rs1143679 <i>FCGR2A</i> rs1801274 <i>IL-6 174 G/C</i> <i>VDR</i> rs1168268
Serositis	<i>TRAF3IP2</i> rs33980500, rs13190932 y rs13196377 <i>PTPN2</i> rs2542151
Riñón	<i>HLADR2</i> , <i>HLADR3</i> rs2187668 <i>STAT4</i> rs7574865, rs11889341, rs7568275 y rs7582694 <i>ITGAM</i> rs1143683, rs1143679 <i>IRF5</i> rs2004640, rs2079197 y rs10488631 <i>IRF7</i> rs4963128 <i>TNFS4</i> rs2205960 <i>DNAse IQ222R</i>
Desórdenes neurológicos	<i>TREX1</i> rs922075, rs6776700, rs6442123, rs2242150 y rs11797
Características hematológicas	<i>IL-21</i> rs907715 <i>STK17A</i> haplotipo TAGTC
Desórdenes inmunológicos	Anti-dsDNA <i>HLADR2</i> , <i>HLADR3</i> rs2187668 <i>STAT4</i> rs7574865, rs7582694 <i>ITGAM</i> rs1143679, rs9888739 <i>IRF5</i> rs10488631 SSA/SSB <i>ITGAM</i> rs1143679

IRF7 rs4963128
HCP5 rs3099855
HLADR3 rs2187668
RNP
ITGAM rs1143679
Sm
ITGAM rs7574865

SSA: anticuerpos anti-Ro SSB: anticuerpos anti-La RNP: anticuerpos anti-ribonucleoproteína

Resulta interesante que un número importante de genes de la vía del IFN-I como *STAT4*, *TLR7*, *TLR9*, *IRF5*, *IRF7*, *IRF8* e *IRAK1* también se han asociado con LES en distintas poblaciones³¹. En la población mexicana se estudió, tanto en población mestiza como indígena, el haplotipo de riesgo TCA localizado en *IRF5*^{35,38}. Este haplotipo se encuentra conformado por los SNPs rs2004640, rs2070197 y rs10954213, y presenta una mayor frecuencia alélica en individuos mestizos e indígenas mazatecos en comparación con población europea, así como una asociación mayor a LES en comparación con controles sanos (OR= 10.46; P: 4.4x10⁻¹⁶)³⁹. Aún más, se presenta una mayor frecuencia de homocigotos del haplotipo de riesgo en pacientes mexicanos en comparación con pacientes europeos, lo cual sugiere que el aporte del genoma amerindio contribuye a la susceptibilidad a LES y la alta frecuencia del haplotipo de riesgo³⁹.

I.4. La vía del interferón tipo I (IFN-I).

Los IFN-I son una familia de citocinas con una estructura relacionada, las cuales se clasifican en cinco clases (IFN- α , β , ω , ϵ y κ) de acuerdo a su capacidad de interferir con la actividad viral en medios de cultivo, así como a su papel inmunoregulador⁴⁰. Los IFN-I juegan un papel importante en la maduración y activación de las células dendríticas plasmocitoides (CDPs), lo que lleva a un incremento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II (CMH I y II), quimiocinas y sus receptores, así como moléculas co-activadoras. Además, participan en el desarrollo de los linfocitos vírgenes en las clonas Th1, en las células citotóxicas, y en la activación de linfocitos B⁴⁰.

La producción de IFN- I comienza con el reconocimiento de patógenos tales como virus, bacterias o ácidos nucleicos microbiales, los cuales son reconocidos por receptores de patrones de reconocimiento (*PRRs*, por sus siglas en inglés: Pattern Recognition Receptors), receptores tipo Toll (*TLR*, por sus siglas en inglés: Toll-Like Receptor) y receptores inducibles por ácido retinoico

(*RLR*, por sus siglas en inglés: Retinoic acid-inducible gene-I-like receptor). Estas citocinas son producidas principalmente por las CDPs, las cuales expresan *TLR7* y *TLR9* en sus membranas endosomales. El factor de diferenciación mieloide 88 (*MyD88*) participa en el primer paso de la cadena de activación, interactuando con el factor asociado al receptor de factor de necrosis tumoral 6 (*TRAF6*) y el receptor de interleucina tipo cinasa (*IRAK*) 1 y 4. Estos eventos desencadenan la fosforilación del factor regulador de IFN (*IRF*)-3, 5 y 7, permitiendo su traslocación al núcleo para la transcripción de los genes de IFN-I⁴⁰ (Figura 3).

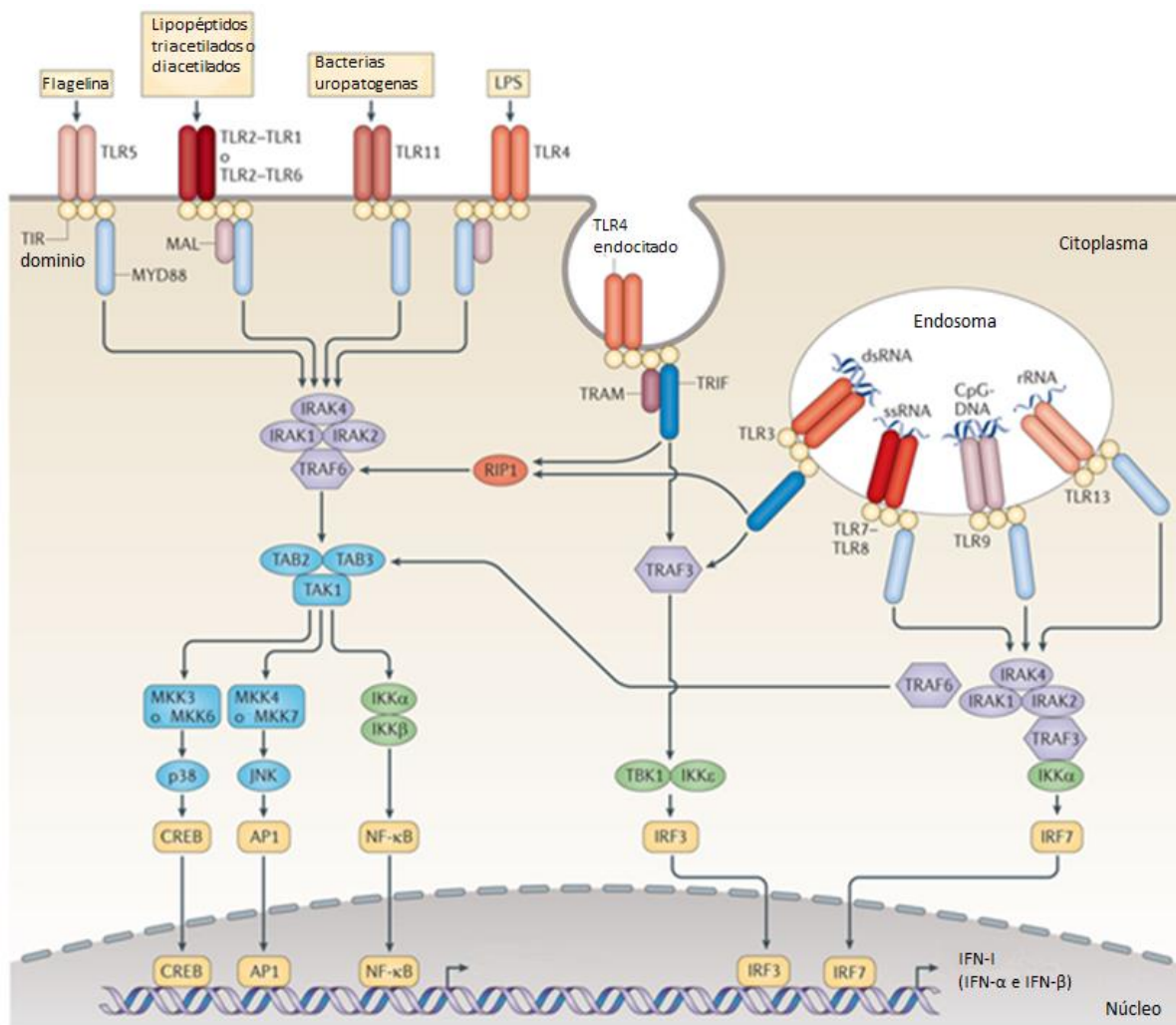


Figura 3. Vía del Interferón tipo-I (IFN-I). A) Se lleva a cabo el reconocimiento de ssRNA y dsDNA a través de los TLRs endosomales (TLR 7 y TLR 9), los cuales ocasionan la activación de *MyD88*, que a su vez interactúa con *TRAF6* e *IRAK* 1,4, fosforilando finalmente a *IRF3*, 5 y 7 (dependiendo del tipo celular que realice la activación), para traslocarse a núcleo e inducir la transcripción de genes inducibles por IFN-I. Tomada y modificada de O'Neill, L. A, *et al.* Nat. Rev. Immunol. 13, (2013).⁴¹.

Una vez que se ha liberado IFN-I, este se une posteriormente a receptores localizados en la superficie de la membrana celular para iniciar una cascada de señalización mediante los dominios Janus cinasa (JAK, por sus siglas en inglés: Janus Kinase), los cuales se encuentran próximos al receptor de IFN-I. Estos dominios se transfosforilan para activarse, tienen un cambio estructural de ligando cuyo resultado es la fosforilación del transductor de la señal y activador de la transcripción (STAT, por sus siglas en inglés: Signal Transducer and Activator of Transcription), lo que le permite trasladarse al núcleo para que se lleve a cabo la transcripción de los genes inducibles por IFN-I⁴².

De manera interesante, se han encontrado niveles elevados de IFN-I en suero de pacientes con LES, en particular de IFN- α , cuyo fenotipo puede ser heredable (en un 48%) en familias con LES al encontrarse en mayor porcentaje en individuos relacionados en primer grado⁴³. Además, los niveles de expresión de IFN- α correlacionan con un cuadro clínico más grave, como es el caso de la NL.

Los genes que confieren susceptibilidad a enfermedades complejas han sido ampliamente estudiados, y en el caso de LES se han investigado aquellos que participan en el sistema inmune. Cabe mencionar que los genes que codifican para RNAs pequeños, como los microRNAs, también se han estudiado debido a que regulan de forma directa o indirecta al sistema inmune⁴⁴. Por este motivo, es de suma importancia conocer su participación en la patogenia del LES.

I.5. Los microRNAs.

Los microRNAs (miRNAs) son genes que transcriben para RNAs pequeños no codificantes de 21-24 nucleótidos de longitud que regulan de manera post-transcripcional a los RNA mensajeros (mRNAs)⁴⁵. Se ha reportado que alrededor del 30% de los genes codificantes para proteínas son regulados por estas moléculas⁴⁶. Por lo general, los miRNAs llevan a la represión de la traducción del mRNA blanco a través del reconocimiento parcial de la región semilla del miRNA (del nucleótido 2-8) con la región 3' no traducida (3'-UTR, por sus siglas en inglés: Untranslated Region) del mRNA⁴⁷. Este reconocimiento se lleva a cabo mediante la interacción de bases tipo Watson-Crick^{48,49}.

I.5.1. La biogénesis de los miRNAs.

La síntesis o biogénesis de los miRNAs puede ser muy variada. Por un lado, existe la vía canónica, la cual se lleva a cabo en la mayoría de los mamíferos⁵⁰. Sin embargo, existen otras vías que pueden

generar miRNAs, entre las que se encuentran la vía de los mirtrons, relacionada ampliamente con el splicing, así como otros casos que no dependen de Dicer o son independientes de Drosha y DGCR8^{48,51}.

Los genes que codifican miRNAs están localizados en varios contextos genómicos, ya sea que se encuentren localizados en los intrones o exones de otros genes o como genes independientes⁴⁸. Los genes de miRNAs se transcriben en el núcleo por la actividad de la RNA Polimerasa II (Pol II), dando lugar al miRNA primario (pri-miRNA), el cual adquiere una estructura tallo-asa, se poliadenila y presenta características propias de la transcripción de la Pol II⁵⁰. También se ha reportado que algunos genes de miRNAs son transcritos por la RNA Pol III, y que esta es mediada por los factores de transcripción como Myc o p53⁵². Posteriormente el pri-miRNA es procesado en el núcleo por el complejo microprocesador, formado por la RNasa III Drosha y la proteína DGCR8 (por sus siglas en inglés: Di George Critical Region 8), el cual escinde parte del tallo, produciéndose así una estructura el tallo-asa de aproximadamente 65 nucleótidos de longitud que corresponde al precursor de miRNA (pre-miRNA)⁴⁸. El pre-miRNA se exporta al citoplasma a través del complejo formado por Exportina 5 (XPO5) y la proteína nuclear de unión a GTP (RAN-GTP). Una vez que se forma este complejo de poro nuclear, el GTP es hidrolizado, como resultado se desensambla el complejo y es liberado el pre-miRNA al citoplasma⁴⁸. Posteriormente, el pre-miRNA es procesado por la RNasa III Dicer, la cual forma un complejo con TRBP (por sus siglas en inglés: Tar RNA Binding Protein) y PACT (por sus siglas en inglés: Protein Activator of PKR). Dicer realiza un corte en el asa del miRNA generando un dúplex de aproximadamente 22 nucleótidos, con dos nucleótidos que sobresalen en el extremo 3'. El dúplex está formado por la hebra guía, la cual contiene la secuencia específica del microRNA, y por la hebra pasajera (también conocido como miRNA*). Por lo general el miRNA* es degradado una vez que es ensamblado el complejo RISC (por sus siglas en inglés: RNA Induced Silence Complex), debido a la unión del miRNA maduro con la proteína Argonauta 2 (Ago2). Después, el dúplex se une a Ago2 formando el complejo RISC, en donde el miRNA maduro reconoce al mRNA blanco (Figura 4). Cabe mencionar que se ha reportado que algunas secuencias de los miRNAs* tienen un papel funcional, y tienen una expresión abundante, lo cual ocasiona que las proporciones miRNA/miRNA* se vean modificadas^{53,54}.

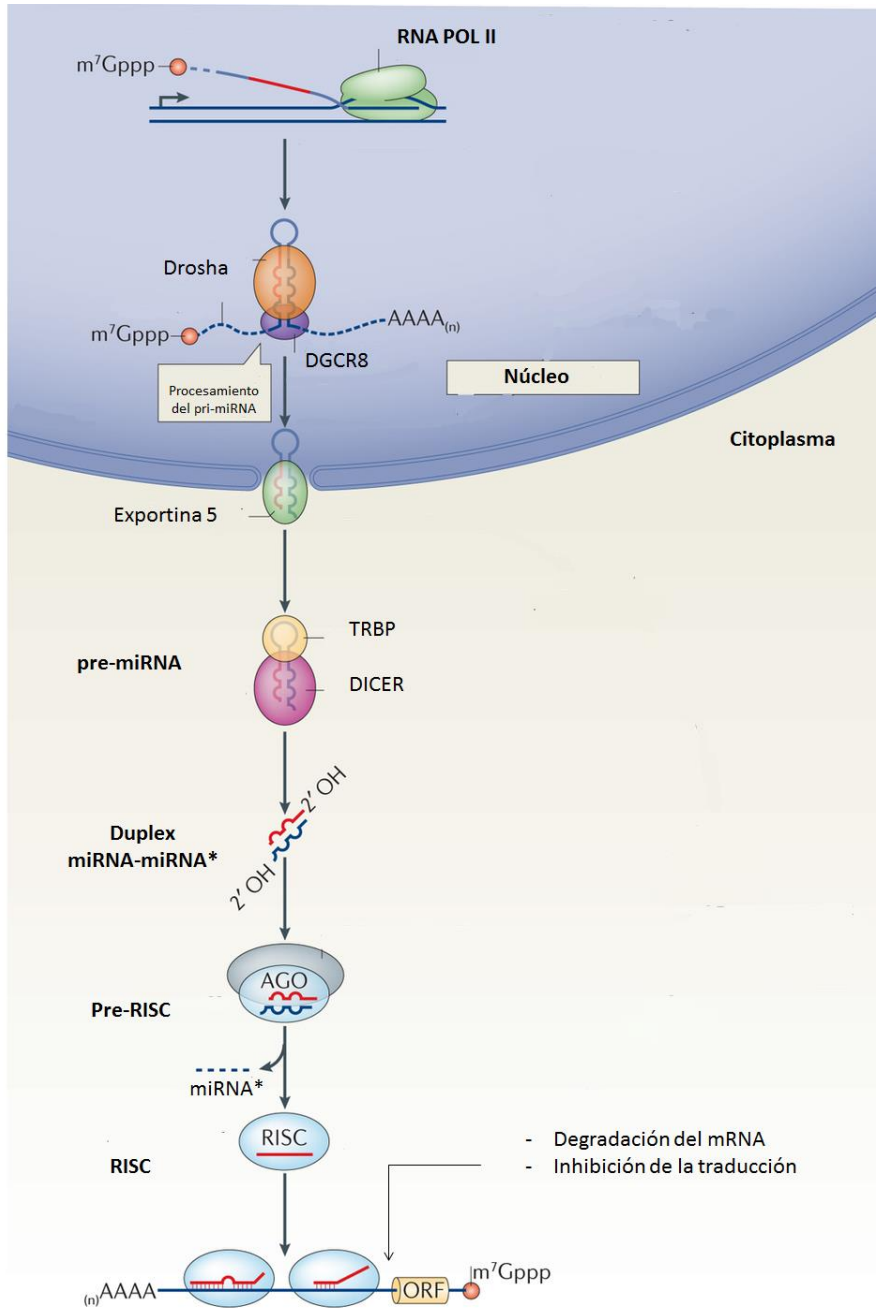


Figura 4. Biogénesis de los miRNAs. La RNA polimerasa Pol II transcribe el gen del miRNA para formar una estructura tallo-asa (el pri-miRNA), el cual es escindido por el microprocesador conformado por Drosha y DGCR8 para formar el pre-miRNA. Este último es transportado al citoplasma mediante el complejo de transporte Exportina 5-RAN-GTP para ser procesado por TRBP y Dicer, enzimas que realizan un corte al asa formando un miRNA dúplex (miRNA-miRNA*) que contiene la secuencia madura, la cual se une a la proteína Ago2 para reconocer al mRNA blanco y realizar así su función.

Tomada y modificada de Ameres, S. L. *et al.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, (2013).⁵⁵.

I.5.2. Los polimorfismos de un solo nucleótido en genes de miRNAs.

Se han reportado polimorfismos en los genes que codifican para miRNAs, conocidos como miR-polimorfismos o miR-SNPs. Los miR-SNPs se pueden localizar en distintos sitios: en la región codificante de los transcritos de los pre- y pri-miRNAs, en las secuencias codificantes de miRNAs maduros, en el sitio de reconocimiento de los miRNAs, y por último, en proteínas implicadas en la biogénesis (Drosha, DGCR8, Dicer y Ago2). También se han reportado miR-SNPs localizados en la región promotora de los genes de miRNAs, los cuales ocasionan la disminución o aumento de la transcripción de estos. En el caso que se localice en el pri y pre-miRNA, el miR-SNP puede ocasionar la disminución o incremento de estas formas involucrando directamente al procesamiento hasta la forma madura, la exportación y la interacción con las proteínas de la vía ⁵⁶. Lo anterior se ejemplifica en la figura 5, en la cual dos miR-SNPs localizados en miR-15 y miR-16, así como en miR-196a-2*, han sido asociados a dos tipos de cáncer.

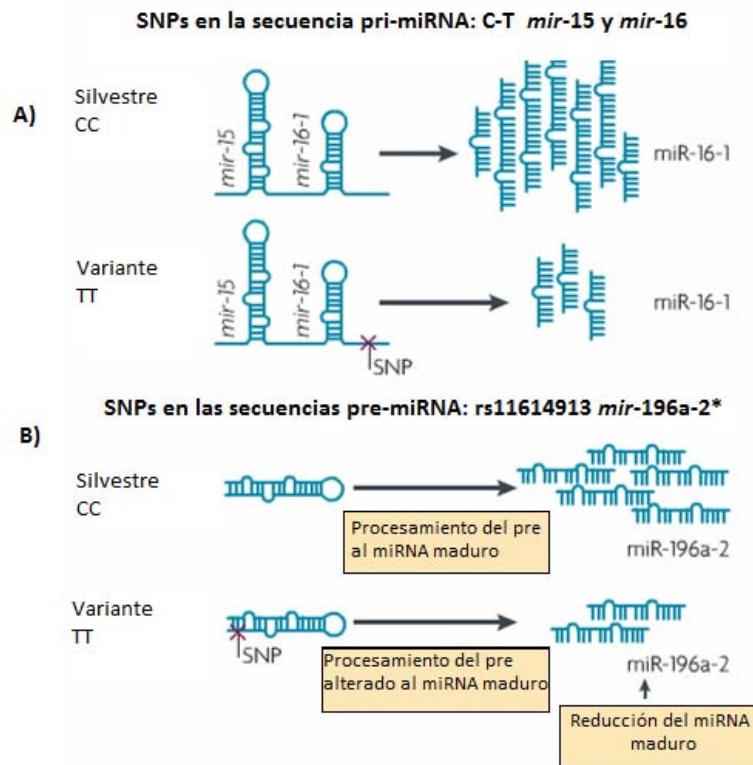


Figura 5. Esquema representativo de miR-SNPs en secuencias del pri y pre-miRNA. A) En la secuencia del pri-miRNA el alelo mayor C en miR-16-1 lleva a una producción constante de su forma madura; en presencia del alelo menor T hay una reducción en la síntesis en la forma madura, que se correlaciona con leucemia linfocítica crónica. B) El pre-miRNA de miR-196a-2 tiene un procesamiento constante a su forma madura al tener el alelo mayor C, pero al presentar el

alelo menor T se presenta una reducción significativa de su forma madura, este miR-SNP se ha asociado a cáncer gástrico, pulmonar y de mama. Tomada y modificada de Ryan, B., Robles, A. *et al.* Nat Rev Cancer (2010) ⁵⁷

Los SNPs localizados en los 3'UTR de mRNAs, en específico en el sitio de unión al miRNA, pueden afectar la expresión de los mRNAs blanco, lo cual a su vez se puede relacionar con la susceptibilidad a desarrollar enfermedades o la resistencia a medicamentos ⁵⁶. Un solo miR-SNP puede tener efecto en la expresión de varios genes en una vía de señalización, en la regulación del metabolismo, ciclo celular o diferenciación de células troncales, entre otros ^{56,58}.

I.5.3. La expresión de miRNAs en LES.

Se ha reportado que los miRNAs tienen una función determinante en el control del sistema inmune, desde la regulación de vías de señalización hasta su desarrollo y en la respuesta inmune ⁴⁴. En pacientes con LES se ha observado una expresión diferencial de algunos miRNAs (Tabla 3) ⁵⁹⁻⁶⁶.

Tabla 3. Expresión diferencial de miRNAs en pacientes con LES en diferentes tipos celulares.

miRNAs	Niveles de expresión	Tipo celular	Efecto	mRNA Blanco
miR-148a y miR-21		Linfocitos T CD4 ⁺	Hipometilación de DNA ⁵⁹ . Supresión deficiente por	DNMT1
miR-155		CMNS, Tregs.	parte de las Tregs, incremento en la señalización en la vía del IFN-I ⁶⁰⁻⁶² .	IRAK-M, TAB 2, CD62L
miR-31	Sobre-expresado	Tregs.	Disminución de las clonas Tregs ⁶³ . Correlación del SLEDAI con los niveles de	FOXP3
miR-21, miR-25 y miR-106b		Linfocitos T y B	expresión. Fenotipo aberrante en Linfocitos T ⁶² .	PDCD4

miR-146a		CMNs	Incremento de la respuesta en la vía del IFN-I ⁶⁴ .	IRF5, TRAF6, IRAK1, STAT1
miR-125a	Sub-expresado	Linfocitos T	Aumento de la citocina inflamatoria RANTES ⁶⁵ .	KFL13
hsa-miR-17-5p, hsa-miR-196a, hsa-miR-383, hsa-miR-409-3p		Desconocido	Desconocido ⁶⁶ .	Desconocido

En un estudio realizado por Tang y colegas, se reportaron 42 miRNAs diferencialmente expresados en muestras de células mononucleares (CMNs) de pacientes, comparando con individuos sanos; de estos, siete miRNAs se encuentran sub-expresados, entre los cuales destaca miR-146a como el miRNA que presenta los niveles más bajos de expresión en plasma⁶⁴. Cabe mencionar que estos niveles correlacionan de manera importante con el cuadro clínico de la enfermedad.

I.5.3.1. miR-146a en LES.

Se ha reportado que miR-146a es regulado por el factor nuclear κ B (NF- κ B) en la línea celular de monocitos THP-1, y que este miRNA regula de manera directa a los transcritos de *TRAF6*, *IRAK1*, *STAT-1* e *IRF5*, proteínas importantes en la vía del IFN-I⁶⁷. Este miRNA juega un papel importante en la inmunidad innata, debido a su respuesta ante diversos estímulos como lo son los lipopolisacáridos (LPS), imiquimod-R837, CpG-A/ODN2216 e IFN-I⁶⁴. Por esta razón, se ha considerado a la expresión diferencial de miR-146a como factor etiológico en el desarrollo de LES. Además, esta sub-expresión correlaciona con los niveles elevados de estas proteínas en pacientes con LES (Figura 6).

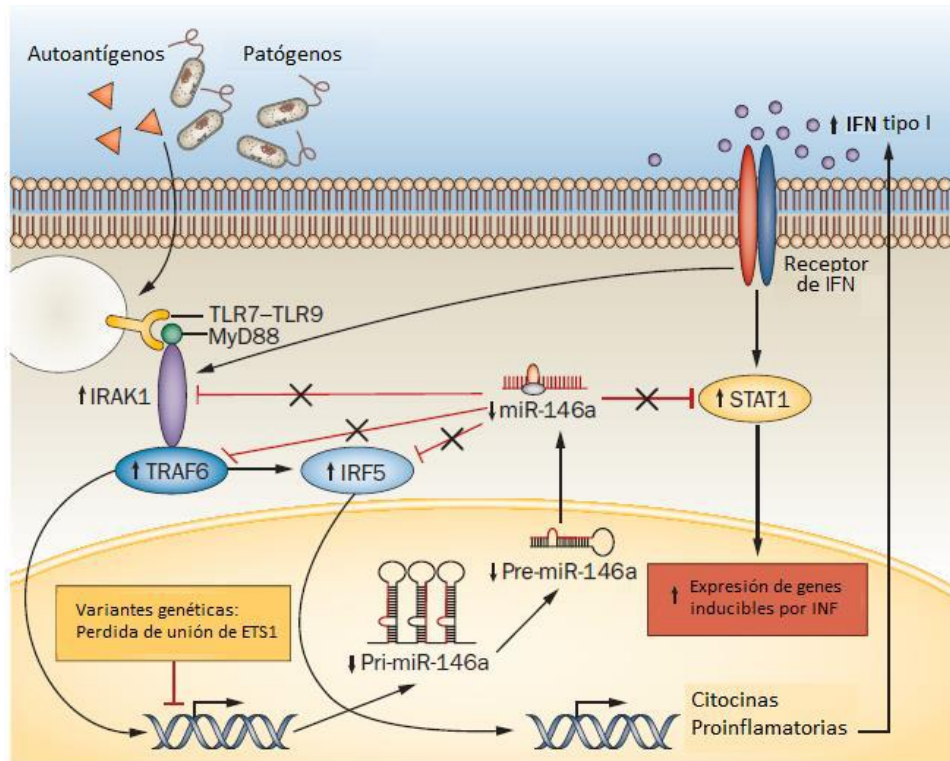


Figura 6. Regulación de la vía de IFN-I por miR-146a en LES. La sub-expresión de miR-146a en pacientes con LES lleva al aumento de los niveles de los transcritos de *IRAK1*, *TRAF6*, *IRF5* y *STAT1*. Este incremento ocasiona, a su vez, una sobre-producción de citocinas pro-inflamaoriaas que favorecen un incremento en la producción de IFN-I. Tomada y modificada de Shen, N., *et al.* Nat Rev Rheumatol 8, (2012) ⁶⁸.

La relevancia de la sub-expresión de miR-146a en pacientes con LES radica en que este miRNA es un regulador maestro de la vía de IFN-I. El genoma humano contiene dos genes de *miR-146* (*miR-146a* y *miR-146b*) localizados en los cromosomas 5 y 10, respectivamente. Estas isoformas difieren solamente en 2 nucleótidos localizados fuera de la región semilla ⁶⁷⁻⁷⁰.

También se ha reportado que miR-146a participa en la respuesta inmune adaptativa, ya que los linfocitos vírgenes presentan niveles bajos de este miRNA, mientras que en los linfocitos de memoria su expresión es mayor ⁷¹. La expresión de miR-146a se induce a través de la activación de linfocitos T y se ha observado que la expresión del miRNA tiene un papel anti-apoptótico, además de regular los niveles de IL-2 en los linfocitos activados ^{69,71}. Algunos miRNAs se han asociado como biomarcadores para NL como miR-200c y miR-146a; este último se ha encontrado como el miRNA con los niveles de expresión más elevados en orina y en tejido renal (principalmente en glomérulos), además de asociarse a inflamación renal y fibrosis, lo cual puede sugerir una participación importante de este miRNA en el desarrollo de NL ^{72,73}.

I.5.3.2. Polimorfismos de un solo nucleótido en miR-146a y LES.

Se han estudiado algunos miR-SNPs localizados en miR-146a en diferentes poblaciones, tanto para conocer si existe susceptibilidad a LES como para conocer si éstos tienen algún efecto en la expresión del miRNA. En la figura 7 se muestra un esquema con algunos SNPs localizados en el gen de *miR-146a* y en regiones aledañas a éste.

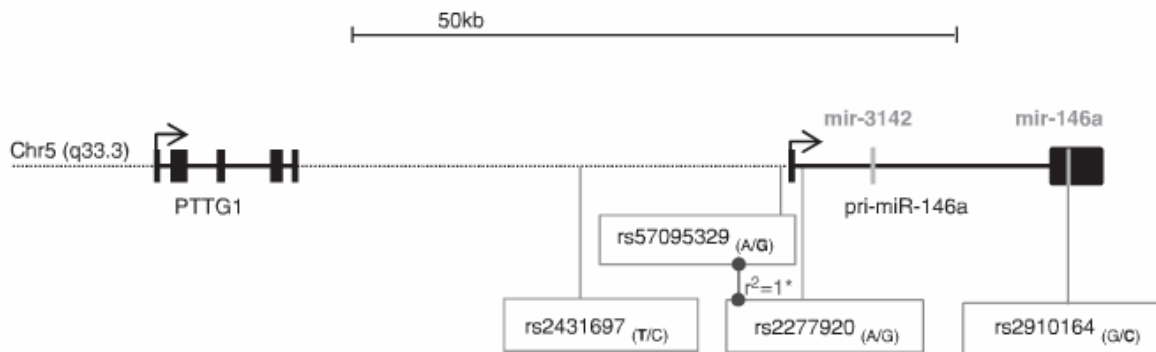


Figura 7. SNPs localizados en miR-146a y regiones aledañas. Se muestran algunos de los SNPs estudiados en esta región. Las barras en color negro representan a los exones, mientras que la línea punteada corresponde a la región intergénica. También se muestran dos miRNAs maduros compartiendo misma localización (miR-146a y miR-3142). El asterisco (*) implica que ambos SNPs se encuentran en disequilibrio de ligamiento (DL). Tomada y modificada de Löfgren, S. E. et al. Genes Immun. 13, (2012). ⁷⁴

En una cohorte asiática, Luo y colegas reportaron al SNP rs57095329, localizado en la región promotora de miR-146a, asociado a LES (OR=1.29), siendo el alelo de riesgo G el que correlaciona con la disminución de la expresión del miRNA. Este mismo SNP fue estudiado en población europea, en la que no se encontró asociación con LES ^{74,75}.

El rs2910164 es un SNP localizado en la región codificante del pre-miR-146a, del cual no se encontró asociación con LES en población China ⁷⁶. En lo que respecta a la población mexicana, existen pocos estudios relacionados con SNPs localizados en miR-146a. El SNP rs2910164 se encontró asociado con asma en mujeres (OR=0.694), pero no en pacientes con LESp y artritis reumatoide. Cabe mencionar que aún no se ha correlacionado la presencia de este SNP con los niveles de expresión del miRNA ⁷⁷. Por otro lado, el SNP rs2910164 no se encontró asociado con LESp ni con NL ⁷⁸.

Otro SNP localizado en miR-146a es el rs2431697, que comprende el cambio de una citosina por una timina. Se localiza en la región promotora de miR-146a, en la región intergénica entre los genes *PPTG1* y *miR-146a* (Figura 7). Este SNP se ha asociado a eventos cardiovasculares adversos en pacientes con fibrilación atrial (HR= 1.59), en donde los homocigotos para el alelo menor T

presentan mayor susceptibilidad a estos padecimientos, y la presencia del alelo (T) correlaciona con la disminución de la expresión de miR-146a⁷⁹. En LES, este SNP se ha asociado como alelo de protección en población china de Han Beijing (OR= 0.69), mientras que en las poblaciones china y europea se ha reportado como alelo de susceptibilidad a LES (OR= 1.461 y 1.23, respectivamente)^{74,80,81}. En un meta-análisis en población china se encontró asociación de este SNP con LES (OR=1.266) y se observó una correlación entre la presencia del alelo menor T y la presencia de auto-anticuerpos ds-DNA y anti-Sm⁸¹. En individuos sanos de la población europea, se encontró que en los homocigotos para el alelo menor T existe una disminución de la expresión de miR-146a^{74,82}. En la tabla 4 se presenta un resumen de los estudios de asociación de este SNP.

Tabla 4. Estudios de asociación del SNP rs2431697. Alelo de riesgo T.

Población	Enfermedad	Asociación	OR 95% IC	Referencia
Española (Europea)	Eventos adversos cardiovasculares (ACE)	Biomarcador para ACE Correlación con la baja expresión de miR-146a Asociado a LES	HR*: 1.59	79
Europea	LES	Correlación con la baja expresión de miR-146a	1.23	74
China	LES	Asociación a LES	1.461 1.262**	81
China	LES	Asociación a LES	1.29	76
China	LES	Asociación a LES.	0.69	80

*HR: Hazard ratio/cociente de riesgo (relación de riesgos de tasas de riesgo) **Valor de OR de meta-análisis

Poblaciones como la latinoamericana son más susceptibles al desarrollo de LES, además de correlacionar con un cuadro clínico más severo de la enfermedad. En el caso de la población mexicana al tener un componente amerindio y español debido al mestizaje, se desconoce la participación de estos en enfermedades como el LES, entonces al estudiar la genética de esta población, en particular en pacientes pediátricos puede ayudar a comprender más acerca de la enfermedad. El SNP rs2431697 se ha asociado a LES en población europea y asiática, sin embargo, no ha sido aún estudiado en mexicanos, por lo tanto se desconoce su contribución al desarrollo de LESp y si tiene algún efecto en la expresión de miR-146a, al ser este miRNA el que se encuentra con mayores niveles de subexpresión en LES.

II Justificación

El miR-146a juega un papel sustancial en la regulación de la vía de IFN-I. Existe una disminución considerable de la expresión de este miRNA en pacientes con LES, por lo que se ha sugerido su participación en la patogenia de esta enfermedad. Los miR-SNPs han sido implicados en la susceptibilidad a diversas enfermedades, por lo que su estudio en LES es importante. El SNP rs2431697 se localiza en la región promotora de miR-146a, lo que podría influir en la expresión de este miRNA. Por lo anterior, el estudio del rs2431697 en la población mexicana con LESp podría contribuir a conocer más acerca del efecto de este miR-SNP en el desarrollo de este padecimiento.

III. Hipótesis

La presencia del alelo menor (T) del SNP rs2431697, localizado en la región promotora de *miR-146a*, conlleva a una expresión diferencial del miRNA en pacientes con LESp.

IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

- Evaluar al alelo menor (T) del SNP rs2431697 con algún efecto en la expresión de *miR-146a* y sus formas precursoras en pacientes con LESp.

IV.2 Objetivos particulares

- Establecer asociación del SNP rs2431697 con LESp y NL.
- Correlacionar los genotipos del polimorfismo rs2431697 y la expresión del miRNA miR-146a y sus formas precursoras (pri-miR-146a, pre-miR-146a, miR-146a*), así como de miR-3142, localizado en la misma región.
- Determinar la correlación con la expresión de miR-146a y sus formas precursoras (pri-miR-146a, pre-miR-146a, miR-146a*) en presencia del alelo menor (T) del SNP, así como de miR-3142 en pacientes con LESp que presentan NL.

V Metodología

- Población de estudio.

En el presente estudio se incluyeron pacientes con LESp, provenientes del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Instituto Nacional de Pediatría. Cada paciente fue evaluado por un médico reumatólogo o inmunólogo quién llenó la hoja de captación de datos, una vez obtenido el consentimiento informado de los participantes. De igual manera, se incluyeron muestras de familiares de algunos pacientes (padre y madre) para completar tríos. Para los controles se incluyeron a individuos mayores de 18 años que no refirieron alguna enfermedad autoinmune o crónica; se contó también con la carta consentimiento informado de los controles. El estudio contó con la autorización de los comités de ética, bioseguridad e investigación de las instituciones participantes.

- Criterios de inclusión.

Se incluyeron pacientes mexicanos con LESp diagnosticados antes de los 16 años de edad, que cumplieran con al menos 4 de los 11 criterios de la clasificación establecida por la ACR³, y cuyos tutores aceptaran firmar la carta de consentimiento informado v. Como controles se incluyeron individuos sanos, sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (mediante la aplicación de un cuestionario). Los datos tanto de pacientes como de controles fueron corregidos por ancestría determinada con marcadores informativos de ancestría (AIMS, por sus siglas en inglés: Ancestry Informative Markers⁸³). Tanto para los casos como para los controles, se tomó como criterio de

inclusión que las dos últimas generaciones hubieran nacido en México y que no refirieran antecedentes extranjeros.

- Criterios de exclusión.

Pacientes con antecedentes a cualquier otra enfermedad crónica concomitante y que recibieran alguna transfusión en los últimos tres meses. También si los participantes decidieran salir del estudio.

- Extracción de DNA.

La extracción de DNA se llevó a cabo a partir de 5 mL de sangre periférica, empleando el estuche comercial Puregene Blood Core Kit C (Qiagen). En breve, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para extraer el plasma, y posteriormente se agregó solución amortiguadora RBC (por sus siglas en inglés: Red Blood Cell) y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se agregó solución amortiguadora de lisis celular para la obtención del DNA. Después, se precipitaron las proteínas utilizando la solución PPS (por sus siglas en inglés: Protein Precipitation Solution) y se centrifugó la muestra a 3500 rpm durante 5 minutos, y se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA. Se agregó isopropanol en una relación 1:1 y se homogenizó por inversión; una vez realizado esto, se centrifugó 3500 rpm durante 15 minutos para obtener el pellet del DNA. El botón fue lavado con etanol al 70% y se realizó una última centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos. Se dejó secar el DNA a temperatura ambiente para después hidratarlo con 300 μ l de solución amortiguadora TE. Por último, se determinó la concentración del DNA en el espectrofotómetro Nano Drop (ND-1000). Se consideraron valores de absorbancia 260/280 dentro de 1.7 y 1.9.

- Extracción de RNA de sangre periférica.

A partir de 5 mL de sangre periférica se obtuvieron las CMNs por gradiente de densidad utilizando Lymphoprep (Stemcell Technologies). La muestra con Lymphoprep se centrifugó a 1500 rpm sin freno durante 20 minutos. Posteriormente, las CMNs se pasaron a un tubo nuevo y se realizó el conteo de CMNs en la cámara de Neubauer, utilizando el colorante azul tripano para determinar la viabilidad celular y determinar el número de células obtenidas. Se procedió a la extracción de RNA por el método de TRIzol (Life Technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. En breve, se adicionó cloroformo en una proporción 1:1, luego se mezcló y se centrifugó para separar las fases orgánica y acuosa. A esta última, se le añadió isopropanol para su precipitación y posteriormente se procedió al lavado del botón con etanol. Por último, se dejó secar el botón a temperatura ambiente y se rehidrató con H₂O libre de nucleasas. Finalmente, se cuantificó en el

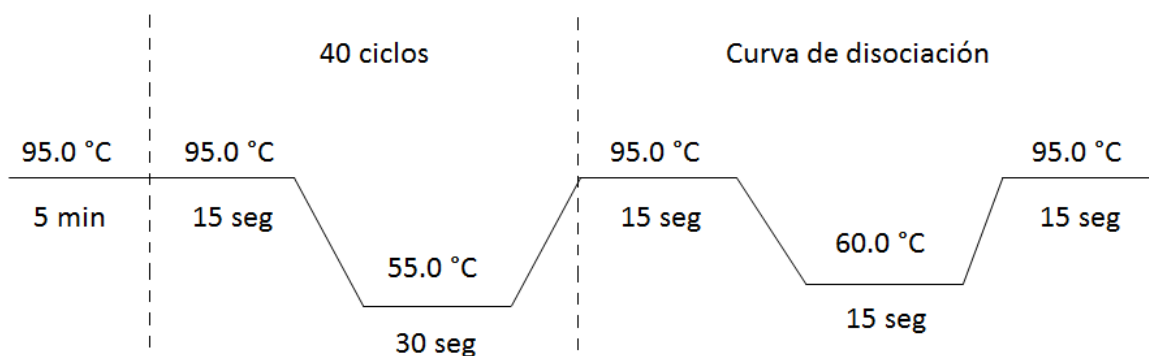
equipo Nano Drop (ND-1000) por espectrometría UV. Se consideraron los valores de absorbancia en una buena extracción de: 1.9-2.0 para A260/280 nm.

- RT-PCR de miRNAs.

Se utilizaron 200 ng de RNA total para síntesis de cDNA de miRNAs con el estuche comercial Mir-X miRNA First-Strand Synthesis (Clontech Laboratories), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para una reacción se utilizó buffer mRQ Buffer (2x), RNA (200 ng) y la enzima mRQ Enzyme, Polimerasa Poli-A. Se incubó a 37°C durante 60 min.

- PCR tiempo real (qPCR).

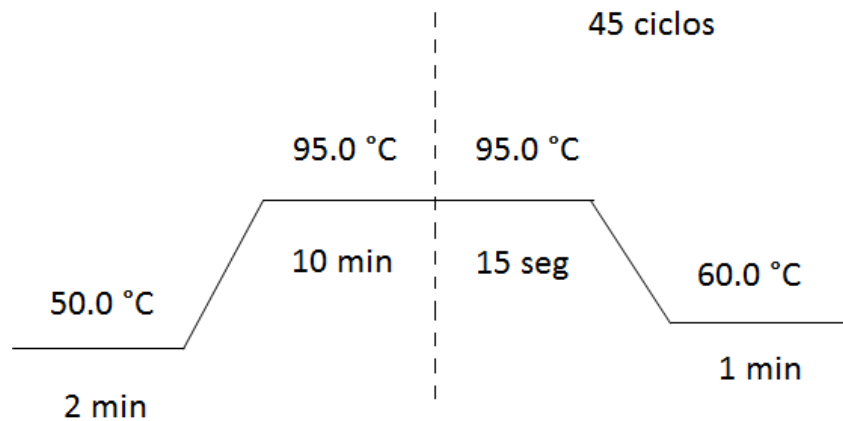
Para realizar las reacciones de qPCR, se utilizó el SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific). Para cada reacción se utilizó: Master Mix SYBR Green 2X, mRQ 3' primer universal (Rv) (10µM), un primer específico para cada miRNA (Fwd) (10 µM) y el cDNA de miRNAs de las muestras de pacientes con LESp. Los primers utilizados fueron los siguientes: miR-146a Fw (5'- TGA GAA CTG AAT TCC ATG GGT T-3), pre-miR-146a Fw (5'-CCG ATG TGT ATC CTC AGC TT-3') y pre-miR-146a Rv (5'-ACG ATG ACA GAG ATA TCC CA-3'), pri-miR-146a Fw (5'-TTA GGA GCT CGC TGG CTG GGA CA-3) y pri-miR-146a Rv (5'-CAG GAT CTA CTC TCT CCA GGT CCT CA-3), miR-146a* Fw (5'-CCT CTG AAA TTC AGT TCT TCA G-3') y miR-3142 Fw (5'-AAG GCC TTT CTG AAC CTT CAG A-3). Se utilizó el RNA pequeño U6 como gen de referencia, utilizando los primers que contiene el estuche comercial Mir-X miRNA First-Strand Synthesis (Clontech Laboratories). Se utilizaron los termocicladores Quant Studium y ViiA 7 (Applied Biosystems) empleando el siguiente programa de termociclaje:



Los niveles de expresión relativa se calcularon utilizando la metodología $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁸⁴. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

- Genotipificación.

El ensayo de discriminación alélica del SNP rs2431697 (C_26693319_10) se realizó empleando la metodología de sonda TaqMan® para genotipificación (Applied Biosystems). Para una reacción se utilizaron: 25 ng de DNA genómico, TaqMan Universal PCR Master Mix (2x) y la sonda correspondiente SNP Genotyping Assay (40x). Se utilizó el termociclador ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystem) con el siguiente programa de termociclaje:



- Análisis estadístico.

Para el análisis de la asociación caso-control se utilizó el programa informático gPLINK^{85,86}, usando una regresión lineal logística, con un intervalo de confianza (IC) del 95%. Se realizaron las correcciones por la prueba de Bonferroni, por género y por ancestría utilizando AIMS previamente descritos para la población mexicana⁸³. El análisis de desequilibrio de transmisión (TDT, por sus siglas en inglés: Transmission Disequilibrium Test) se realizó con el programa Haploview⁸⁷. El análisis estadístico de los datos de expresión se llevó a cabo con la prueba t de Student, utilizando el programa GraphPad Prism 6.01⁸⁸. Se consideraron los valores significativos con $P < 0.05$.

- Predicción de sitios de unión a factores de transcripción.

Para la predicción de los sitios de unión a factores de transcripción (FTs) cercanos a la ubicación del SNP rs2431697, se utilizó la herramienta informática PROMO⁸⁹. Además, se empleó la base de datos ENCODE con la finalidad de buscar otros factores de transcripción en la misma región⁹⁰.

VI Resultados

VI.1. Las frecuencias alélicas y genotípicas del rs2431697 en población mexicana y su comparación con otras poblaciones continentales.

Se realizó la genotipificación del polimorfismo rs2431697 en 343 pacientes y 436 controles, mediante el ensayo de discriminación alélica por sonda TaqMan, obteniendo un “call rate” mayor al 95%. Se calcularon los valores de las frecuencias alélicas para cada uno de los alelos mayor (C) y menor (T), así como las frecuencias genotípicas (CC, CT y TT) para el total de individuos controles (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs2431697 en la población mexicana y en distintas poblaciones continentales.

Frecuencias alélicas y genotípicas rs2431697						
Frecuencias (%)						
	Controles	MEX*	AFR*	AS*	EUR*	IBS
Alelo						
C	52	51	46	11	46	51
T	48	49	53	89	54	49
Genotipo						
CC	27	27	23	2	20	26
CT	51	48	47	18	52	50
TT	22	25	29	80	28	24

MEX: individuos con ascendencia mexicana de Los Ángeles, California, USA. **AFR:** individuos africanos Yoruba de Ibadan, Nigeria. **AS:** individuos asiáticos de la población Han de Beijing, China. **EUR:** individuos con ascendencia europea del norte y este de Utha, USA. **IBS:** individuos ibérico españoles. *Obtenidos de la base de datos 1000 genomas⁹¹.

En la población mexicana se observó una frecuencia del 48% para el alelo menor T y del 52% para el alelo mayor C. Se encontró un mayor porcentaje (27%) de homocigotos CC en comparación con los homocigotos para el alelo menor TT (22%). Se comprobó que este SNP se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg.

Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas del rs2431697 en la población mexicana con las reportadas en otras poblaciones continentales de la base de datos 1000 genomas, se encontró que la frecuencia del alelo T es menor (48%) en comparación con la de otras poblaciones, destacando la población asiática que tienen la más alta frecuencia (89%), seguida de la población europea y africana (54 y 53%, respectivamente). Al comparar los genotipos, se observa que en las poblaciones europea, africana y mexicana los heterocigotos CT presentan una frecuencia cercana al 50%, seguida del 25% para cada uno de los genotipos homocigotos.

VI.2. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs2431697 en controles y en pacientes con LESp.

Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los controles y los pacientes con LESp, se observó que en los pacientes el alelo más frecuente es el alelo menor T (52%), mientras que en los controles es el alelo mayor C (52%), de tal manera que las frecuencias alélicas se encontraron invertidas para casos y controles. En las frecuencias genotípicas no se observaron diferencias entre los casos y los controles (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs2431697 en LES en controles y pacientes con LESp.

Frecuencias alélicas y genotípicas rs2431697				
	Frecuencias (%)		Frecuencias (%)	
	MEX		EUR⁷⁴	
	Controles	Casos	Controles	Casos
Alelo	N=436	N=343	N=1453	N=1324
C	52	48	43	38
T	48	52	57	62
Genotipo				
CC	27	24	17	14
CT	51	49	52	48
TT	22	27	31	38

MEX: población mexicana utilizada en este estudio. **EUR:** población con ascendencia europea procedente de 7 países: Argentina, Bélgica, Alemania, Hungría, Italia, Portugal y Suecia⁷⁴.

Al comparar las frecuencias obtenidas con las previamente reportadas en una población compuesta de individuos con ascendencia europea provenientes de 7 países diferentes, se observó que tanto en la población mexicana como en la europea el porcentaje del alelo menor T está incrementado en los casos comparados a los controles (Tabla 6). En cuanto a las frecuencias de los genotipos, tanto en la población mexicana como en la europea, la frecuencia de homocigotos TT fue mayor en los casos en comparación con los controles (27% vs 22% y 38% vs 31%, respectivamente).

VI.3. Estudio de asociación caso-control en pacientes con LESp.

Para el análisis de asociación caso-control, se corrigieron los datos por ancestría y por género. Como se mencionó anteriormente, la población mexicana es heterogénea debido al mestizaje entre europeos y amerindios, por lo que se utilizaron AIMS previamente reportados. De igual manera, debido a que existe una mayor frecuencia de LES en mujeres, se decidió corregir los datos por género. Se utilizó un intervalo de confianza (IC) del 95% y se consideraron como estadísticamente significativos aquellos valores con una $P < 0.05$ (Tabla 7).

Tabla 7. Estudio caso-control para el SNP rs2431697 en la población mexicana.

LESp	OR (IC 95%)	P*
Sin corrección	1.176 (0.9621-1.437)	0.1135
Corrección por ancestría	1.13 (0.9134-1.399)	0.2597
Corrección por género	1.187 (0.9686-1.454)	0.09843

Se muestran los valores obtenidos de P y OR (IC 95%) para los análisis: sin corrección, con corrección por ancestría utilizando AIMS y con corrección por género. *P*: valor de *p* de la regresión logística. *OR*: Razón de momios (*Odds Ratio*). *CI*: Intervalo de confianza. *Corregido por Bonferroni.

Los resultados obtenidos muestran que el rs2431697 no se encuentra asociado a LESp, ya que los valores obtenidos de P no fueron significativos en ninguno de los casos, aún corrigiendo por ancestría y género.

VI.4. Estudio de asociación con nefritis lúpica (NL) en pacientes con LESp.

Por otro lado, se llevó a cabo el análisis de asociación del rs2431697 con NL, realizando también una corrección por ancestría y por género. No se encontró asociación con NL (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación del SNP rs2431697 con NL.

NL	OR (IC 95%)	P*
Sin corrección	1.106 (0.7858-1.558)	0.5626
Corrección por ancestría	1.098 (0.7715-1.562)	0.604
Corrección por género	1.09 (0.7728-1.538)	0.6224

Se muestran los valores obtenidos de P y OR (IC 95%) para los análisis: sin corrección y con corrección por ancestría utilizando AIMS, además de una corrección por género. P: valor de p de la regresión logística. OR: Razón de momios (Odds Ratio). CI: Intervalo de confianza. *Corregido por Bonferroni.

VI.5. Estudio de desequilibrio de transmisión (TDT) del SNP rs2431697.

Con el fin de conocer si en LESp existe una contribución de alguno de los alelos al riesgo de la enfermedad, se realizó el análisis de TDT en 191 tríos. Se encontró que el alelo menor T se sobretransmite de padres a hijos, con una frecuencia de transmisión del 99% comparado con una frecuencia de no-transmisión del 78%, aunque las diferencias no fueron significativas estadísticamente ($P < 0.05$) (Tabla 9).

Tabla 9. Estudio de desequilibrio de transmisión (TDT) para LESp.

SNP	Alelo sobre-transmitido	T:U	P
rs2431697	T	99:78	0.1145

P: valor de p del ensayo X^2 . T:U: Frecuencias de transmisión: frecuencias de no transmisión

VI.6. Correlación genotipo-expresión de miR-146a en pacientes con LESp.

Se llevó a cabo la correlación genotipo-expresión con el fin de conocer si el polimorfismo rs2431697 localizado en la región promotora de miR-146a afecta la expresión de éste.

Los ensayos de expresión se llevaron a cabo en un total de 35 pacientes con LESp. Se realizó la qPCR para las siguientes formas de miR-146a: pri-miR146a, pre-miR-146a, miR-146a y miR-146a* y miR-3142, el cual se encuentra localizado en esta región (Figura 7). Se muestran los datos obtenidos en la figura 8.

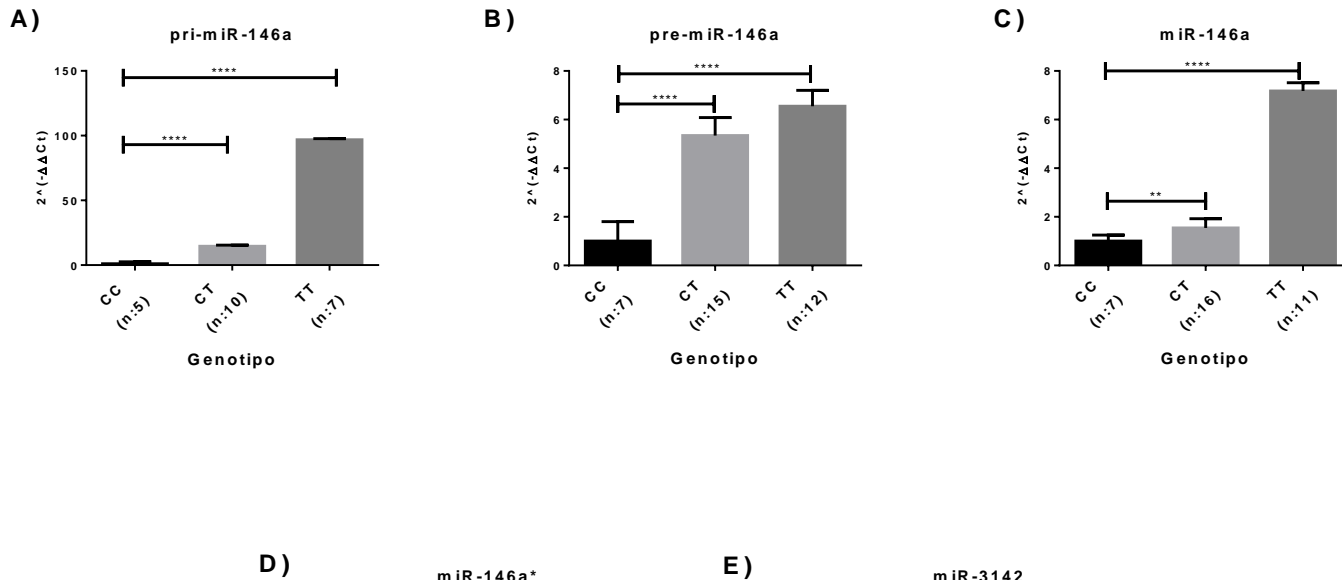


Figura 8. Correlación genotipo-expresión para el SNP rs2431697. En cada una de las gráficas se muestra el valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cada una de las formas de miR-146a, así como el número de individuos empleados para cada condición. A) Correlación genotipo-expresión de pri-miR-146a. B) Correlación genotipo-expresión de pre-miR-146a. C) Correlación genotipo-expresión de miR-146a maduro. D) Correlación genotipo-expresión de miR-146a*. E) Correlación genotipo-expresión de miR-3142. ** denotan un valor de $P < 0.010$ y **** un valor de $P < 0.0001$.

Se tomó como calibrador o genotipo control al homocigoto del alelo mayor (CC) para realizar la comparación en los niveles de expresión de las diferentes formas de los miRNAs. El pri-miR-146a se encontró sobre-expresado en los homocigotos TT con un valor de P significativo (<0.0001), mientras que en los heterocigotos CT se observó una expresión 15 veces mayor en comparación con los homocigotos CC, con un valor estadísticamente significativo $P<0.0001$ (Figura 8.A).

En el caso del precursor (Figura 8.B), se observó una tendencia similar a la forma primaria, ya que la expresión en el heterocigoto CT es cuatro veces mayor en comparación con los homocigotos CC, con un valor significativo de P (<0.0001). En cuanto al homocigoto TT, éste se encuentra expresado 5 veces más en comparación con el homocigoto CC con un valor significativo ($P<0.0001$).

Para la forma madura de miR-146a (Figura 8.C), se encuentra el mismo efecto en el homocigoto TT, el cual se encuentra expresado 5 veces más que el homocigoto CC con un valor estadísticamente significativo ($P<0.0001$). En el heterocigoto CT se encuentra 0.5 veces más expresado que en el homocigoto CC, con un valor de P significativo (0.0023). Al evaluar la expresión miR-146a* en los diferentes genotipos (Figura 8.D), se obtienen resultados similares a los de las formas primaria y precursora de miR-146a (Figuras 8.A y B, respectivamente). En los heterocigotos CT miR-146a* se encuentra más expresado en comparación con los homocigotos CC ($P<0.0001$). En cuanto a los homocigotos TT su expresión es 26 veces mayor cuando se comparan con el calibrador con un valor de P significativo (<0.0001).

Por último, también se evaluó la expresión del miRNA maduro miR-3142, que se localiza aledaño a la región del pri-miR-146a (Figura 7). En los homocigotos TT se encontró este miRNA expresado 20 veces más en comparación con el homocigoto CC ($P<0.0001$); en el caso de los heterocigotos CT se encontró una expresión 4 veces mayor al compararlo con el calibrador con un valor de $P<0.0001$ (Figura 8. E).

VI.6.1. Efecto del SNP rs2431697 en la transcripción de miR-146a en pacientes con LESp

Con el fin de evaluar el efecto del SNP rs2431697 en la transcripción de las diferentes formas de miR-146a, se realizó una predicción de sitios de reconocimiento de factores de transcripción (FTs) mediante el uso de las herramientas bio-informáticas PROMO y ENCODE (Figura 9).

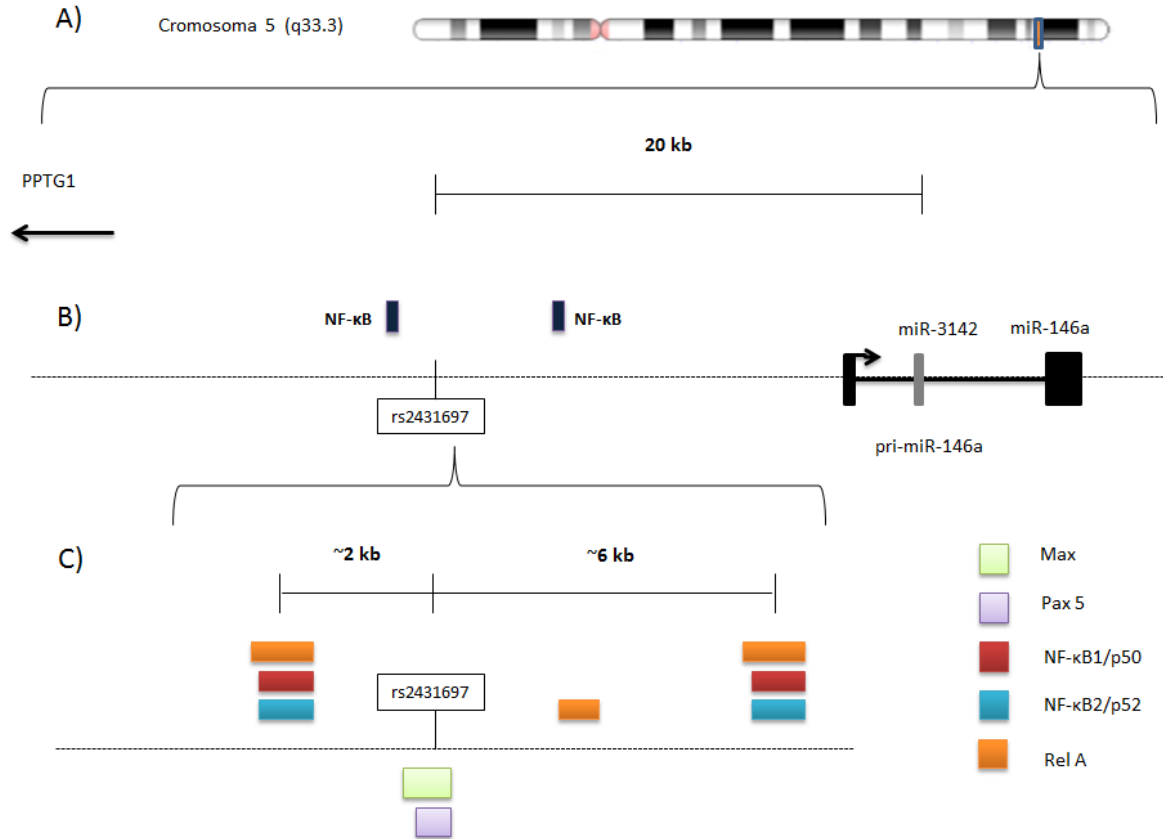


Figura 9. Esquema representativo de la predicción de sitios de unión a FTs en la región promotora de *miR-146a*. Se muestra la región entre el SNP rs2431697 y *miR-146a*. A) Cromosoma 5, banda q33.3. B) Sitios de unión al factor NF-κB. C) Los sitios potenciales de unión a FTs se muestran en cajas de color: Rel A (naranja), NF-κB1/p50 (rojo), NF-κB2/p52 (azul), Max (verde) y Pax 5 (púrpura). La línea punteada representa la región intergénica, mientras que los rectángulos negro y gris a los exones.

Se encontraron dos sitios potenciales de unión para el FT NF-κB. El primero se encuentra 2 kb río arriba de la región del SNP, mientras que el segundo se localiza aproximadamente a 6 kb río abajo del miR-SNP (Figura 9.B). Al realizar un acercamiento a esta región, se muestra los sitios de unión de tres subunidades de las cinco que conforman al FT NF-κB: Rel A, NF-κB1/p50 y NF-κB2/p52, las cuales comparten el mismo sitio de unión (Figura 9C). Se encontraron también dos sitios de unión a los FTs Max y Pax 5, en el sitio donde se localiza el SNP (Figura 9).

Se realizó una exploración general de la región donde se encuentra el rs2431697, en la que se encontraron marcas epigenéticas entre las cuales están: la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1), la cual se encuentra enriquecida en esta zona, la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) que está prácticamente ausente en el sitio del SNP y la acetilación de la lisina 27 en la histona 3 (H2K27ac), además de un sitio de hipersensibilidad a DNAsa I (Figura 10).

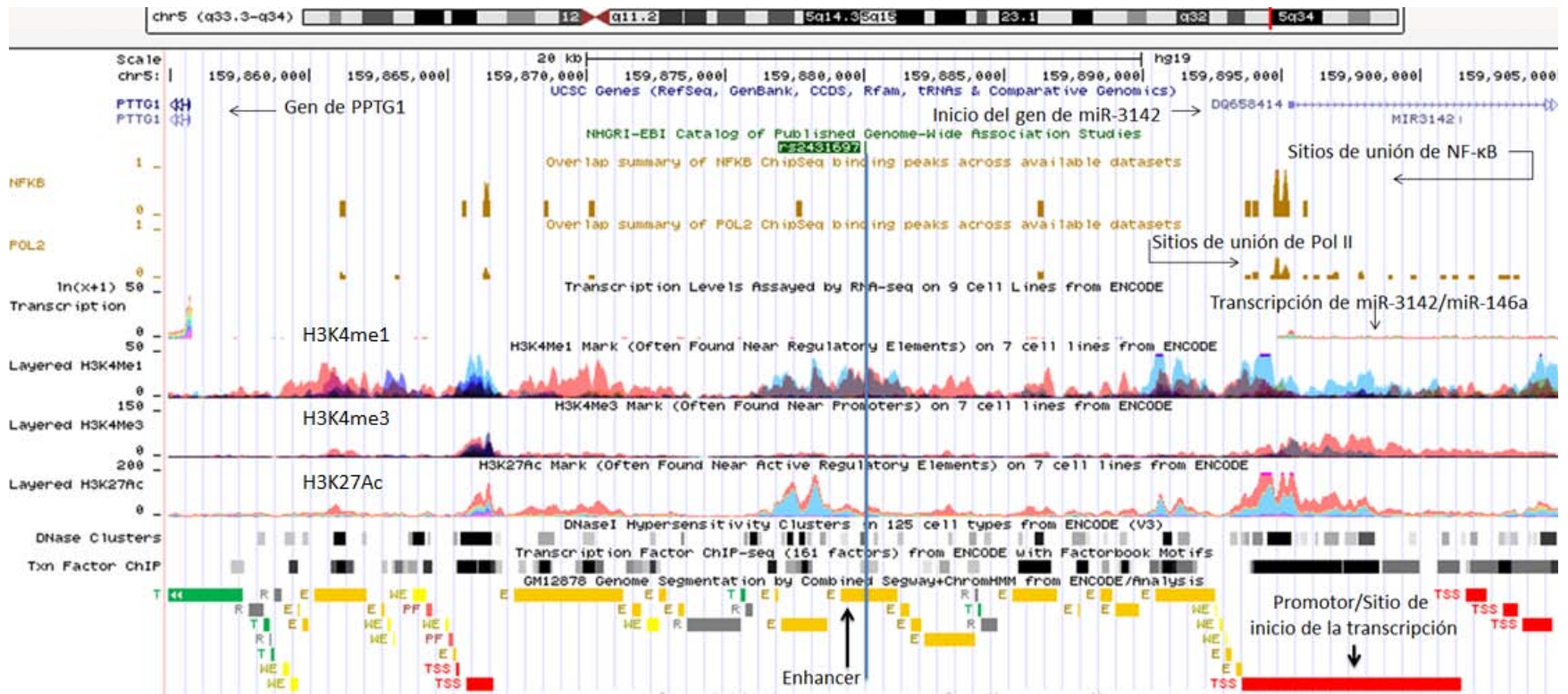


Figura 10. Ampliación de la región del rs2431697 de la base de datos ENCODE. Esquema representativo de la región del rs2431697 el cual se encuentra señalado con la línea azul. Este miR-SNP se encuentra en una región que presenta varias marcas H3K4me1, H3K27ac y en menor medida H3K4me3. Además, se encuentra en un sitio potencial de enhancer (rectángulo color amarillo) señalado en la figura. El promotor y el sitio de inicio de la transcripción (TSS) se encuentran señalados río abajo del rs2431697 (rectángulo de color rojo). Su posición coincide con los sitios de unión de la Pol II y el inicio de la transcripción de miR-3142 y miR-146a señalados en la parte superior. Tomada y modificada de

90.

De manera interesante, en la base de datos ENCODE se encontró un potencial enhancer que coincide con la ubicación del miR-SNP aquí estudiado, mientras que el promotor y sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés: Transcription Start Site) se encuentran río abajo de éste; esto concuerda con los niveles de transcripción y sitios de unión de Pol II que se reportan en esta misma base de datos (Figura 10). Lo anterior sugiere que el rs2431697 puede no encontrarse en la región promotora, sino en un sitio potencial de enhancer (Figura 11. A). Con base en lo anterior, se propone un modelo para explicar el incremento de la transcripción de todas las formas de miR-146a en la figura 11, en el cual se plantea la transcripción de este miRNA mediada por el FT NF- κ B.

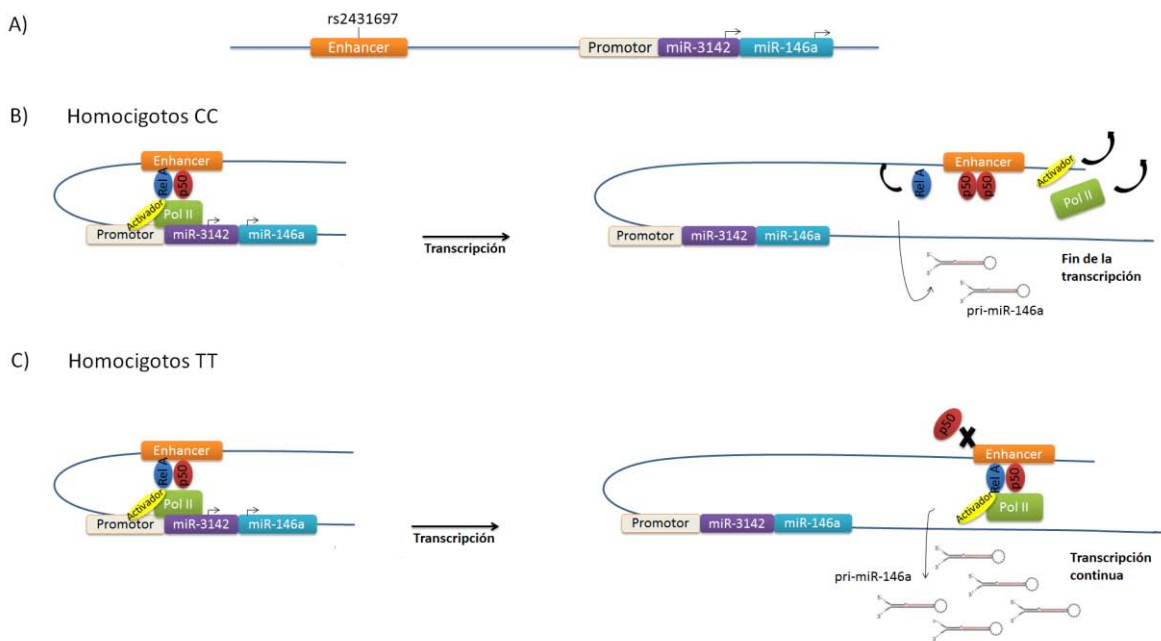


Figura 11. Modelo del efecto de los alelos del rs2431697 (C/T) en miR-146a y miR3142. A) Representación de la región genómica en la que se localiza el rs2431697 en el sitio potencial de enhancer, el promotor y los genes de miR-3142 y miR-146a. B) Modelo hipotético de lo que sucedería en individuos homocigotos CC, en los que se formaría el complejo de transcripción dependiente de NF- κ B (Rel A y p50), la transcripción de ambos genes continuaría hasta el sitio de término, en el cual se separa el complejo de transcripción por represión de los homodímeros p50, produciendo niveles normales del pri-miR-146a y las consecuentes formas del miRNA. C) Modelo hipotético de lo que sucedería en individuos homocigotos TT en los que se forma el complejo de transcripción dependiente de NF- κ B (Rel A y p50), sin embargo, la transcripción no es reprimida por efecto del alelo T, lo que ocasiona un incremento en las formas de pri-miR-146a y todas las demás formas. Rectángulo de color verde: RNA Pol II (Pol II); óvalo azul (Rel A); óvalo rojo (p50) y óvalo amarillo (activadores).

El proceso inicial es llevado a cabo cuando se forma un asa entre la región promotora y el enhancer, para que de esta manera se una la maquinaria de transcripción, incluyendo Pol II, los activadores y

las subunidades Rel A y p50 de NF- κ B. Una vez formado este complejo, la transcripción comienza para los genes de miR-3142 y miR-146a hasta el sitio de término, donde se unirá otra subunidad de p50 para separar el complejo transcripcional. Esto es lo que sucedería en los individuos homocigotos CC, produciendo la forma primaria de manera normal (Figura 11.B). Esta propuesta concuerda con lo observado en la figura 8, los niveles de transcripción son normales para todas las formas de miR-146a, además de miR-3142. Este proceso es diferente para los homocigotos TT, en los que el proceso de iniciación y de elongación es el mismo, sin embargo, al ubicarse el complejo de transcripción en el sitio de término el complejo no es separado por influencia del alelo menor T, por lo tanto la transcripción no puede ser regulada, esto ocasiona un aumento en la forma primaria (Figura 11.C). Además es una forma de explicar el incremento en la transcripción para los individuos homocigotos TT en todas las formas de miR-146a y miR-3142. En los que respecta a los heterocigotos (CT), aunque no se encuentra esquematizado en el modelo, lo que se espera es que tenga un efecto semejante al de los homocigotos TT, no puede ser regulada la transcripción por influencia del alelo T, ocasionando un aumento en la expresión de ambos miRNAs.

VI.7. Correlación de la expresión de miR-146a con NL en pacientes con LESP.

Se correlacionaron también los niveles de expresión de miR-146a con la presencia y ausencia de NL (Figura 10).

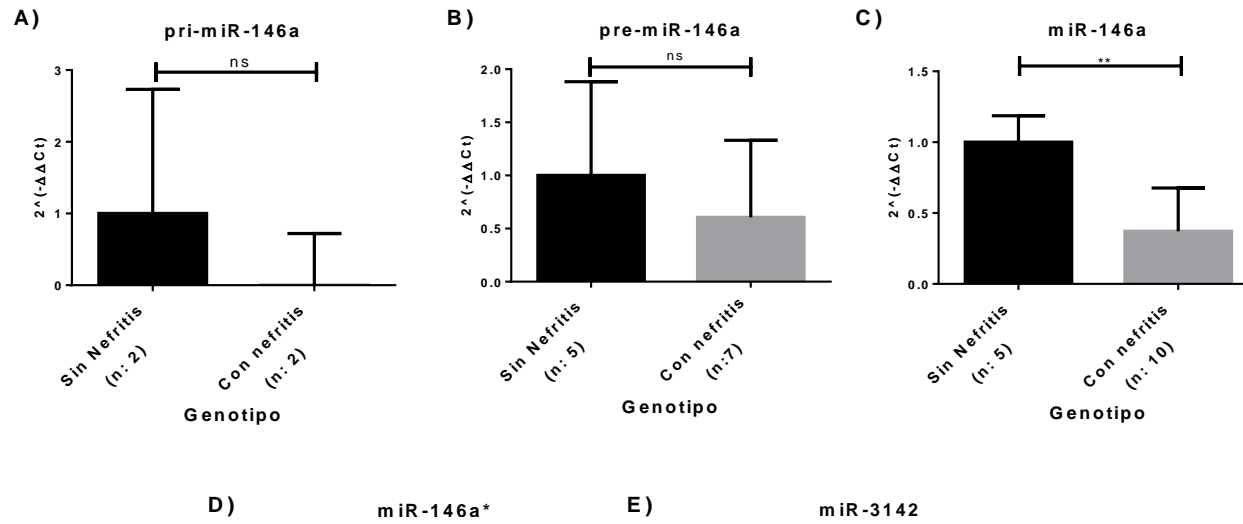


Figura 12. Correlación de la expresión de las formas de miR-146a con NL. Los valores de expresión fueron calculados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se muestra el número de muestras utilizadas para cada condición. A) Correlación de la expresión de pri-miR-146a con NL. B) Correlación de la expresión de pre-miR-146a con NL. C) Correlación de la expresión de miR-146a maduro con NL. D) Correlación de la expresión de miR-146a* con NL. E) Correlación de la expresión de miR-3142 con NL. ** denotan un valor de $P < 0.0011$ y ns= no significativo.

Para la forma primaria de miR-146a (Figura 12.A), los niveles de expresión se encontraron disminuidos en los pacientes con NL en comparación con aquellos que no presentan daño renal, sin embargo, no es estadísticamente significativo ($P=0.05306$). En el caso del precursor, se observó una tendencia en la disminución en la expresión, pero tampoco fue significativa (Figura 12.B). Solamente la disminución de la forma madura del miRNA en los pacientes que presentan NL fue significativa ($P<0.0011$) (Figura 12.C).

Para el caso de miR-146a* (Figura 12.D), no se logró realizar un análisis estadístico debido al número pequeño de muestra, pero se puede observar que en los pacientes con NL se encuentra una tendencia a menor expresión. Para el miRNA maduro miR-3142 (Figura 12.E), se encontró en los pacientes con NL una tendencia a expresión menor pero no es estadísticamente significativo ($P<0.0873$) al comparar con los pacientes que no presentan NL.

VII Discusión

Aunque se han realizado estudios de asociación del miR-SNP rs2431697 con LES en diferentes poblaciones, esta es la primera vez que se realiza en la población mexicana con LESp. Al comparar la frecuencia del alelo menor T en la población mexicana con la reportada en la base de datos de 1000 genomas para otras poblaciones como la europea, africana y asiática, se observó que este alelo se encuentra menos frecuente en la población de estudio, y esto coincide con lo reportado en la población española (IBS) de la base de 1000 genomas (Tabla 4)^{82,91}.

Al realizar la comparación de frecuencias alélicas y genotípicas entre pacientes con LESp y controles, se observó que en los pacientes con LESp el alelo menor T se encuentra ligeramente más frecuente en comparación con los controles. Este comportamiento es similar al previamente reportado en población con ascendencia europea⁷⁴. Sin embargo, al realizar el estudio de asociación caso-control, no se encontró asociación con LESp (Tabla 6). Cabe mencionar que en estudios de caso-control en las poblaciones europeas y asiáticas, el SNP rs2431697 si se encontró asociado a LES, por lo que se sugiere que la no asociación de este miR-SNP puede ser algún efecto del tamaño de muestra o una característica propia de la población mexicana. La prevalencia de LES difiere de acuerdo a la ancestría de las poblaciones, lo cual aunado a la heterogeneidad genética, puede verse reflejado en una mayor o menor susceptibilidad a esta enfermedad. Por esta razón, se realizó la estratificación por origen étnico, empleando AIMS previamente establecidos para la población mexicana⁸³. En el caso particular de la población mexicana, el componente amerindio

podría tener algún efecto en esta región intergénica, ya que en estudios previos se observó que en los descendientes de europeos, el alelo T confiere un mayor riesgo para LES⁸¹.

Por otra parte, la NL es una de las complicaciones más frecuentes en LESp y una de las que comprometen más la vida del individuo. Al realizar el estudio de caso-control de este SNP con NL tampoco se observó asociación (Tabla 7). Estos resultados sugieren que este polimorfismo no tiene efecto en NL, a diferencia de otros que se han asociado directamente con el daño renal³¹. Los estudios de ligamiento aportan información relevante acerca de heradabilidad de las enfermedades, por lo que el estudio de la transmisión de ciertos alelos de padres a hijos podría aportar mayor conocimiento acerca del aporte genético que ocurre en LES. En el análisis de TDT, se observó que el alelo menor T se sobretransmite en mayor frecuencia aunque no de manera significativa (Tabla 9). Esto indica que a pesar de que el alelo T es transmitido en la mayoría de los casos de los padres a los hijos no existe una asociación directa a LES.

Además de estudiar la asociación del rs2431697 con LESp, se realizó la correlación entre los genotipos de este polimorfismo y la expresión de todas las formas de miR-146a, desde el pri-miRNA hasta la forma madura, y de miR-3142. Como se mencionó anteriormente, miR-146a se encuentra sub-expresado en pacientes con LES, por lo que el estudiar el miR-SNP rs2431697 que se localiza en la región promotora de éste, podría tener alguna implicación en la expresión diferencial en pacientes con LESp⁶⁸.

En algunas enfermedades tales como Alzheimer, esquizofrenia y cáncer, se ha reportado la disminución de la expresión de miR-146a en aquellos individuos que son portadores del alelo T⁹²⁻⁹⁴. Al realizar la correlación genotipo-expresión de las formas de miR-146a (pri-miR-146a, pre-miR-146a, miR-146a* y miR-146a) en pacientes con LESp, se observó un aumento de la expresión en los homocigotos TT y en los heterocigos CT para todas las formas de miR-146a y miR-3142, en comparación con los homocigotos CC. En un estudio previo, en el cual se correlacionó el genotipo con la expresión del pri-miR-146a y miR-146a en individuos adultos sanos de nacionalidad Sueca, se observó que los niveles de expresión de éstos son menores en los homocigotos TT en comparación con los homocigotos del alelo C⁷⁴. Esto mismo se reportó en individuos sanos de ascendencia española, observando una disminución de la expresión de miR-146a en portadores del alelo T⁷⁹. De acuerdo con lo anterior, el efecto del alelo menor T en la expresión de miR-146a en pacientes con LESp podría deberse al efecto de la edad, ya que en la muestra evaluada en este estudio se trata de individuos pediátricos, de los cuales no se han reportado estudios previos. Se ha observado que los factores hormonales participan en la regulación de los miRNAs, principalmente en LES, en donde se ha reportado que los estrógenos regulan la biogénesis de los miRNAs,

alterando el procesamiento del pri-miRNA por Drosha-DGCR8, el pre-miRNA mediante Dicer, así como la expresión de XPO-5 y Ago-2^{22,95}. Este efecto se ha observado en ratones y esto podría correlacionar la incidencia en los pacientes^{24, 83}. De acuerdo a lo anterior, no se puede descartar que el efecto que se observa en la transcripción del miRNA pueda estar relacionado con la edad y el efecto hormonal que existe en los adultos y que en pacientes con LESp no existe. De igual manera, el origen étnico de la población evaluada podría tener algún efecto en la expresión del miRNA y sus diferentes formas. Cabe mencionar que en el presente estudio se logró detectar la expresión de miR-3142, el cual no había sido detectado en el estudio de individuos suecos⁷⁴. Finalmente, en el presente estudio no se evaluó la correlación genotipo-expresión en individuos sanos, por lo que no podemos descartar que el efecto que se observa sea propio de la enfermedad. Por esta razón se considera importante evaluar el efecto del genotipo en la expresión del miRNA en individuos controles mexicanos.

Por otro lado, de acuerdo a la base de datos ENCODE, existe la posibilidad de que este miR-SNP no se encuentre en la región promotora, sino en un sitio potencial de enhancer debido a las marcas específicas y elementos que se encuentran en esta región, mientras que las marcas de promotores se encuentran prácticamente ausentes (Figura 10)⁹⁶⁻⁹⁸. Se ha observado que los loci de riesgo en regiones no codificantes se encuentran involucrados en la regulación transcripcional y en los elementos regulatorios cis (CREs, por sus siglas en inglés: Cis-Regulatory Elements), como promotores y enhancers, que en conjunto pueden afectar la expresión del gen (eSNP, por sus siglas en inglés: expression SNP)^{92,99}. Además, los loci con características de enhancers están enriquecidos en variantes genéticas, las cuales se ha observado que pueden afectar los sitios de unión a FTs e inducir un efecto alelo específico en la expresión del gen¹⁰⁰. De acuerdo con lo anterior, la diferencia en la expresión de miR-146a en pacientes con LESp podría deberse al efecto del SNP en la región de enhancer como se propone en el modelo de la figura 11. En los homocigotos TT y heterocigotos CT, el complejo de transcripción no puede ser separado al llegar al término de la transcripción, debido a que el alelo menor T podría tener mayor afinidad a una de las sub-unidades de NF- κ B, lo cual impide la unión de otra sub-unidad p50 o p52 para formar homodímeros, y de esta manera no se lleve a cabo la transcripción. Se ha reportado que estas sub-unidades en forma de homodímeros ejercen una actividad represora en la transcripción dependiente de NF- κ B, ya sea uniéndose a sitios específicos de los dímeros activos de este FT o reclutando deacetilasas al promotor, como la histona deacetilasa 1 (HDAC1)¹⁰¹⁻¹⁰³. De hecho, este efecto se ha observado en las variantes de riesgo que se localizan en enhancers, las cuales incrementan la actividad transcripcional en el promotor. Un ejemplo es el rs4648068 en NF- κ B1, que al estar presente el alelo de riesgo G, se incrementa la transcripción llevando a la sobre-expresión de la

proteína p50 en líneas celulares de cáncer gástrico y linfocitos T. Lo anterior, se explica debido a que el FT C/EBP β tiene una mayor afinidad al unirse con el alelo G, aumentando la actividad transcripcional de NF- κ B1¹⁰⁴. Además, se ha reportado que la localización de algunos haplotipos en regiones de enhancers incrementa la transcripción en el promotor del gen implicado en la reparación de DNA, MGMT (MGMT, por sus siglas en inglés: O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Por otro lado, se ha observado el efecto contrario de algunos SNPs cuyos alelos de riesgo pueden disminuir la afinidad en el sitio de unión a FTs en regiones promotoras y de enhancers. Este es el caso del rs57095329 que se localiza en la región promotora de miR-146a, cuyo alelo de riesgo G reduce la afinidad de la unión del FT Ets-1 con la región promotora en pacientes con LES, lo que podría provocar la disminución de la expresión de este miRNA⁷⁵. Otro ejemplo es la variante 1:g.98515539A>T, localizada en una región de enhancer, la cual disminuye la expresión de miR-137/miR-2682 debido a la unión débil del FT YY1 con el alelo de riesgo en células de neuroblastoma^{75, 107}. Por lo tanto, se propone que el alelo menor del miR-SNP rs2431697, podría tener alguna implicación en los niveles de expresión del miRNA. Sin embargo, no descartamos el efecto de otros SNPs aledaños a la región de estudio. Un efecto similar se ha observado en ratones de edad avanzada, en los cuales la unión aberrante de NF- κ B al promotor de miR-146a conlleva a una expresión anormal de este miRNA¹⁰⁸.

Asimismo, con el análisis de predicción de sitios de unión a FTs se encontraron, en la región en la que se localiza el SNP, otros sitios de reconocimiento a Pax 5 y Max. De manera interesante, ambos FTs se encuentran expresados principalmente en linfocitos B y linfoblastoides⁹¹. En particular, Pax 5 es importante en estos tipos celulares, por su actividad en las primeras etapas de diferenciación celular y regular la activación de algunos genes que participan en la señalización de linfocitos B, la adhesión, la migración y la presentación de antígenos¹⁰⁹⁻¹¹¹. Con base en lo anterior, el miR-SNP podría impedir la unión de Pax 5 a esta región, asociando esto a lo que descrito en la población china, en donde se encontró asociación del alelo menor T con la producción de auto-anticuerpos ds-DNA, y de esta manera Pax 5 no podría regular la producción de auto-anticuerpos⁸¹. Por su parte, Max es un FT que puede formar homodímeros, los cuales tienen capacidad represora, además puede formar heterodímeros con otras proteínas, entre ellas c-Myc, proteína que puede actuar en proliferación, diferenciación y apoptosis, pero no es posible que ejerza su función sin Max¹¹².

Debido a que una de las complicaciones más frecuentes en pacientes con LESp es la NL, se decidió también evaluar si existe alguna correlación de la presencia de ésta con la expresión de los miRNAs anteriormente evaluados. Al realizar la correlación de la expresión de miR-146a con NL, se observó una disminución en todas las formas de este miRNA, sin embargo, sólo la forma madura presentó

diferencias significativas (Figura 12.C). Para el miRNA miR-3142, también se observó una disminución en la expresión notable, pero no fue significativa. La disminución de la expresión de miR-146a corresponde con lo previamente descrito por Tang y colaboradores, que observaron que en pacientes con lupus activo, y por lo tanto con NL, existía dicha disminución⁶⁴. De acuerdo con lo anterior, se sugiere que el aumento del miR-146a podría ser un marcador de la gravedad de LES y, en específico de NL. Estos resultados son relevantes, ya que se ha observado que el incremento de IFN- α aumenta la maduración y el efecto citotóxico de los linfocitos T CD8⁺, los cuales están estrechamente relacionados con el aumento de perforinas y granzimas en enfermedades autoinmunes ocasionando daño en tejidos¹¹³. Lo anterior concuerda con el hecho que en pacientes con NL clase IV se ha reportado un aumento de este tipo celular y una relación con el daño renal¹¹⁴. Cabe mencionar que nuestras muestras de pacientes pediátricos con NL en su mayoría tienen esta misma clasificación, lo cual en conjunto sugiere que podría ser uno de los varios efectos desencadenantes por los bajos niveles de miR-146a.

VIII Conclusiones

- El SNP rs2431697 no se encuentra asociado a LESp ni a NL, en población mexicana.
- La presencia del alelo menor T correlaciona con el incremento de la transcripción en todas las formas de miR-146a y de miR-3142, posiblemente evitando desensamblaje del complejo de transcripción.
- De acuerdo a la base de datos ENCODE, el miR-SNP rs2431697 se localiza en un sitio de enhancer, en lugar de la región promotora.
- Se encontraron sitios tentativos de unión a los FT Pax 5 y Max en la posición del SNP rs2431697, por lo que el alelo T puede impedir que los FT se unan al sitio.
- La disminución en la expresión de miR-146a correlaciona con la presencia de NL en pacientes con LESp.

IX Referencias

1. Velázquez-Cruz, R. *et al.* Lupus eritematoso sistémico (LES): genómica de la enfermedad. *Gaceta Médica de México* 371–80
2. Bertias, G., Cervera, R. & Boumpas, D. in (BMJ Group, 2012).
3. Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **40**, 1725 (1997).
4. Bertias, G., Salmon, J. & Boumpas, D. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Ann. Rheumatic Dis.* **69**, 1603–11 (2010).
5. Yung, S. & Chan, T. M. Mechanisms of Kidney Injury in Lupus Nephritis - the Role of Anti-dsDNA Antibodies. *Front Immunol* **6**, 475 (2015).
6. Amarilyo, G. & La Cava, A. miRNA in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* **144**, 26–31 (2012).
7. Habibi, S, Saleem, MA & Ramanan, AV. Juvenile systemic lupus erythematosus: review of clinical features and management. *Indian pediatrics* (2011). doi:DOI: 10.1007/s13312-011-0143-5
8. Tucker *et al.* Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII). *Lupus* **17**, 314–322 (2008).
9. Hiraki, L. T. *et al.* Ethnic differences in pediatric systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* **36**, 2539–46 (2009).
10. Pluchinotta, F. R. *et al.* Distinctive clinical features of pediatric systemic lupus erythematosus in three different age classes. *Lupus* **16**, 550–5 (2007).
11. Morgan, T., Watson, L., McCann, L. & Beresford, M. Children and adolescents with SLE: not just little adults. *Lupus* **22**, 1309–19 (2013).
12. Malattia, C. & Martini, A. Paediatric-onset systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **27**, 351–62 (2013).
13. Hui-Yuen, J. S. *et al.* Early versus later onset childhood-onset systemic lupus erythematosus: Clinical features, treatment and outcome. *Lupus* **20**, 952–9 (2011).
14. Levy, D. & Kamphuis, S. Systemic Lupus Erythematosus in Children and Adolescents. *Pediatric Clinics of North America* **59**, 345364 (2012).
15. Aggarwal, A. & Srivastava, P. Childhood onset systemic lupus erythematosus: how is it different from adult SLE? *Int J Rheum Dis* **18**, 182–91 (2015).

16. Mina, R. & Brunner, H. I. Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 218 (2013).
17. Rahman, A. & Isenberg, D. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* (2008). doi:10.1056/NEJMra071297
18. Tsokos, G. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* **365**, 2110–2121 (2011).
19. Walker, S. E. Estrogen and autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **40**, 60–5 (2011).
20. Kassi, E & Moutsatsou, P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. *BioMed Research International* **2010**, (2010).
21. Sekigawa, I. *et al.* A new hypothesis of the possible mechanisms of gender differences in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* **28**, 419–23 (2010).
22. Klinge, C. M. Estrogen regulation of microRNA expression. *Current genomics* **10**, 169 (2009).
23. Podolska, MJ & Biermann, M. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *Journal of ...* (2015). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4548750/>>
24. Mok, C. & Lau, C. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathology* **56**, 481–490 (2003).
25. Dai, R. & Ahmed, S. A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* **157**, 163–79 (2011).
26. Deafen, D. *et al.* A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* (1992). doi:10.1002/art.1780350310
27. Block, S. A brief history of twins. *Lupus* **15**, 61–4 (2006).
28. Alarcón-Segovia, D & Alarcón-Riquelme, ME. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis & ...* (2005). doi:10.1002/art.20999
29. González, L., Toloza, S., McGwin, G. & Alarcón, G. Ethnicity in systemic lupus erythematosus (SLE): its influence on susceptibility and outcomes. *Lupus* **22**, 1214–24 (2013).
30. Alarcón *et al.* Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. *Lupus* **8**, (1999).
31. Mohan, C. & Putterman, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* (2015). doi:10.1038/nrneph.2015.33

32. Kozyrev, S. V. *et al.* Structural insertion/deletion variation in IRF5 is associated with a risk haplotype and defines the precise IRF5 isoforms expressed in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **56**, 1234–41 (2007).
33. Kim, J.-H. H. *et al.* Deletion variants of RABGAP1L, 10q21.3, and C4 are associated with the risk of systemic lupus erythematosus in Korean women. *Arthritis Rheum.* **65**, 1055–63 (2013).
34. Yu, B. *et al.* Copy number variations of interleukin-17F, interleukin-21, and interleukin-22 are associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* **63**, 3487–3492 (2011).
35. Garcia-Ortiz, H. *et al.* Association of TLR7 copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Ann Rheum Dis* **69**, 1861–1865 (2010).
36. Ceccarelli, F. *et al.* Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype. *J Immunol Res* **2015**, 1–11 (2015).
37. Harley, I. T., Kaufman, K. M., Langefeld, C. D., Harley, J. B. & Kelly, J. A. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 285–90 (2009).
38. Abelson, AK, Delgado-Vega, AM & Kozyrev, SV. STAT4 Associates with SLE through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Annals of the ...* (2008). at <<https://ard.bmj.com/content/early/2008/11/19/ard.2008.097642>>
39. Reddy, M. V. *et al.* Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum. Genet.* **121**, 721–7 (2007).
40. Rönnblom, L. The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups. J. Med. Sci.* **116**, 227–37 (2011).
41. O’Neill, L. A., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–60 (2013).
42. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–45 (2014).
43. Niewold, T. B. Interferon alpha as a primary pathogenic factor in human lupus. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**, 887–92 (2011).
44. Xiao, C. & Rajewsky, K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell* **136**, (2009).
45. Finnegan, E. & Pasquinelli, A. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 51–68 (2012).
46. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* **9**, 102–114 (2008).

47. Faller, M. & Guo, F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 663–7 (2008).
48. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–24 (2014).
49. Peterson, S. *et al.* Common features of microRNA target prediction tools. *Front. Genet.* **5**, (2014).
50. Jung, S, Keller, S, Gregory, RI & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* (2009). doi:10.1038/ncb0309-228
51. Westholm, J. O. & Lai, E. C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **93**, 1897–904 (2011).
52. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610 (2010).
53. Okamura, K. *et al.* The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 354–363 (2008).
54. Guo, L. & Lu, Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule. *PloS one* **5**, e11387 (2010).
55. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–88 (2013).
56. Mishra, P. J. & Bertino, J. R. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* **10**, 399–416 (2009).
57. Ryan, B., Robles, A. & Harris, C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* (2010). doi:10.1038/nrc2867
58. Mishra, P., Mishra, P., Banerjee, D. & Bertino, J. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* **7**, 853–8 (2008).
59. Pan, W. *et al.* MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J. Immunol.* **184**, 6773–81 (2010).
60. Divekar, A. A., Dubey, S., Gangalum, P. R. & Singh, R. R. Dicer insufficiency and microRNA-155 overexpression in lupus regulatory T cells: an apparent paradox in the setting of an inflammatory milieu. *J. Immunol.* **186**, 924–30 (2011).
61. Leng, R.-X., Pan, H.-F., Qin, W.-Z., Chen, G.-M. & Ye, D.-Q. Role of microRNA-155 in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 141–7 (2011).

62. Stagakis, E. *et al.* Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Ann Rheum Dis* **70**, 1496–1506 (2011).
63. Rouas, R. *et al.* Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1608–18 (2009).
64. Tang, Y. *et al.* MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* **60**, 1065–75 (2009).
65. Zhao, X. *et al.* MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* **62**, 3425–3435 (2010).
66. Dai, Y. *et al.* Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* **16**, 939–946 (2007).
67. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. J. & Baltimore, D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12481–6 (2006).
68. Shen, N., Liang, D., Tang, Y., de Vries, N. & Tak, P.-P. P. MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 701–9 (2012).
69. Labbaye, C. & Testa, U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol* **5**, 13 (2012).
70. Thomson, J. M. *et al.* Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* **20**, 2202–7 (2006).
71. Curtale, G. *et al.* An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood* **115**, 265–73 (2010).
72. Perez-Hernandez, J, Forner, MJ, Pinto, C & Chaves, FJ. Increased Urinary Exosomal MicroRNAs in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *PloS one* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0138618
73. JIANXIN *et al.* Glomerular and tubulointerstitial miR-638, miR-198 and miR-146a expression in lupus nephritis. *Nephrology* **17**, (2012).
74. Löfgren, S. E. *et al.* Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immun.* **13**, 268–74 (2012).
75. Luo, X. *et al.* A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* **7**, e1002128 (2011).

76. Ji, J. D., Cha, E. S. & Lee, W. J. Association of miR-146a polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus* **23**, 1023–30 (2014).
77. Jiménez-Morales, S. *et al.* MiR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Tissue Antigens* **80**, 317–21 (2012).
78. Tlatelapa-Osorio, S. Asociación de polimorfismos de un solo nucleótido localizado en miR-146a en pacientes con lupus eritematoso sistémico pediátrico. *71* (2015).
79. Roldán, V. *et al.* Prognostic role of MIR146A polymorphisms for cardiovascular events in atrial fibrillation. *Thromb. Haemost.* **112**, 781–8 (2014).
80. Sheng, Y. J. *et al.* Association analyses confirm five susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 85 (2015).
81. Tang, Z.-M. M. *et al.* Association between rs2431697 T allele on 5q33.3 and systemic lupus erythematosus: case-control study and meta-analysis. *Clin. Rheumatol.* **34**, 1893–902 (2015).
82. Harley, J. B. *et al.* Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat. Genet.* **40**, 204–10 (2008).
83. Kosoy, R. *et al.* Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat* **30**, 69–78 (2009).
84. Livak, KJ & Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* (2001). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629>>
85. Purcell, S. *et al.* PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am J Hum Genetics* **81**, (2007).
86. Purcell, S. PLINK v 2.0. <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>
87. Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–5 (2005).
88. t-Student Analysis fue realizado utilizando GraphPad Prism version 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com”.
89. Messeguer, X. *et al.* PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **18**, 333–4 (2002).
90. ENCODE consortium. ENCODE at UCSC. (2012).
91. ISGR: The International Genome Sample Resource. 1000 Genomes.
92. Roussos, P. *et al.* A role for noncoding variation in schizophrenia. *Cell Rep* **9**, 1417–29 (2014).

93. Zhang, B., Wang, A., Xia, C., Lin, Q. & Chen, C. A single nucleotide polymorphism in primary-microRNA-146a reduces the expression of mature microRNA-146a in patients with Alzheimer's disease and is associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Med Rep* **12**, 4037–42 (2015).
94. Jazdzewski, K. *et al.* Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7269–74 (2008).
95. Khan, D., Dai, R. & Ahmed, S. Sex differences and estrogen regulation of miRNAs in lupus, a prototypical autoimmune disease. *Cell. Immunol.* **294**, 70–79 (2015).
96. Hon, G. C., Hawkins, R. D. & Ren, B. Predictive chromatin signatures in the mammalian genome. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R195–201 (2009).
97. Calo, E. & Wysocka, J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* **49**, 825–37 (2013).
98. Lenhard, B., Sandelin, A. & Carninci, P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genetics* **13**, 233–45 (2012).
99. Macintyre, G., Yepes, A., Ong, C. & Verspoor, K. Associating disease-related genetic variants in intergenic regions to the genes they impact. *PeerJ* **2**, (2014).
100. Corradin, O. & Scacheri, P. Enhancer variants: evaluating functions in common disease. *Genome Medicine* **6**, 85 (2014).
101. Zhong, H., May, M. J., Jimi, E. & Ghosh, S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* **9**, 625–36 (2002).
102. Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a000034 (2009).
103. Pereira, S. & Oakley, F. Nuclear factor- κ B1: Regulation and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1425–1430 (2008).
104. Chen, Y. *et al.* The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* **15**, 21 (2015).
105. Xu, M. *et al.* Influence of promoter/enhancer region haplotypes on MGMT transcriptional regulation: a potential biomarker for human sensitivity to alkylating agents. *Carcinogenesis* **35**, 564–71 (2014).
106. Krześniak, M., Butkiewicz, D., Samojedny, A., Chorazy, M. & Rusin, M. Polymorphisms in TDG and MGMT genes - epidemiological and functional study in lung cancer patients from Poland. *Ann. Hum. Genet.* **68**, 300–12 (2004).

107. Duan, J. *et al.* A rare functional noncoding variant at the GWAS-implicated MIR137/MIR2682 locus might confer risk to schizophrenia and bipolar disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 744–53 (2014).
108. Jiang, M. *et al.* Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages. *Aging Cell* **11**, 29–40 (2012).
109. Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H. & Busslinger, M. *Chapter 5 Pax5 A Master Regulator of B Cell Development and Leukemogenesis. Adv Immunol* **111**, 179–206 (2011).
110. Schebesta, A. *et al.* Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* **27**, 49–63 (2007).
111. Nutt, S., Hodgkin, P., Tarlinton, D. & Corcoran, L. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* **15**, 160–71 (2015).
112. Baudino, TA & Cleveland, JL. The Max network gone mad. *Molecular and cellular biology* (2001). doi:10.1128/MCB.21.3.691-702.2001
113. Singh, S. & Saxena, R. Lupus nephritis. *The American journal of the medical sciences* **337**, 451–460 (2009).
114. Couzi, L. *et al.* Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheumatism* **56**, 2362–2370 (2007).