



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DE UN SOLO
NUCLEÓTIDO RS2431697 Y RS2910164 EN LA FUNCIÓN DEL
MICRORNA MIR-146A EN INDIVIDUOS SANOS.”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
LUIS REYES AGUILAR**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

VOCAL: PROFESOR: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SECRETARIO: PROFESOR: CECILIA CONTRERAS CUBAS

1er. SUPLENTE: PROFESOR: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

2º SUPLENTE: PROFESOR: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
MEDICINA GENOMICA (INMEGEN)**

ASESOR DEL TEMA: CECILIA CONTRERAS CUBAS _____

SUSTENTANTE: LUIS REYES AGUILAR _____

RESUMEN

El estudio de variantes genéticas, como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphisms*) ha permitido estudiar la susceptibilidad de las diferentes poblaciones para el desarrollo de enfermedades complejas. Los miRSNPs, SNPs localizados en genes de microRNAs (miRNAs), pueden afectar la funcionalidad de éstos, teniendo efectos sobre los diversos mecanismos y procesos celulares en los cuales intervienen. Los miRSNPs se han asociado a diversas enfermedades, principalmente las autoinmunidades, cardiovasculares y cáncer. Uno de los miRNAs de interés es el miR-146a, el cual es un regulador clave de la respuesta inmune innata. El miRSNP rs2910164 (G/C) se localiza dentro de la secuencia del precursor de miR-146a y el rs2431697 (C/T) en la región promotora de este miRNA. Por su localización, ambos miRSNPs podrían tener implicaciones funcionales y regulatorias en la respuesta inmune, por lo que su estudio podría brindar información valiosa.

Con base en lo anterior, el presente proyecto tuvo como objetivo evaluar el efecto de los SNPs rs2431697 y rs2910164 en individuos sanos y su correlación con el proceso de maduración y la función de miR-146a. Para ello, se obtuvieron los genotipos de los SNPs rs2431697 y rs2910164 en un grupo de 50 voluntarios sanos utilizando el método de sonda TaqMan y se determinó la expresión relativa de los diferentes intermediarios en la maduración de miR-146a, así como dos de sus ARNm blancos IRAK1 y TRAF6 (qPCR). Se realizó una correlación genotipo-expresión de los estadios de maduración de miR-146 y de sus ARNm blancos.

Los resultados obtenidos indican que la presencia del alelo C del SNP rs2910164 disminuye la expresión de la forma precursora y madura de miR-146a, mientras que el alelo menor T del SNP rs2431697 ocasiona una disminución en todos los estadios de maduración de miR-146a e incluso en miR-3142.

Por otra parte, el análisis del ARNm TRAF6 con los SNPs rs2910164 y rs2431697 mostró que la presencia del alelo de menor frecuencia para ambos SNPs correlaciona con un aumento en la expresión de dicho mensajero. A su vez, se encontró que individuos heterocigotos para el SNP rs2910164 presentan un

aumento en la expresión de IRAK1, mientras que los homocigotos para el alelo C disminuyen los niveles de dicho mensajero, esta disminución se observa de igual manera en los individuos portadores del alelo T del SNP rs2431697.

Los resultados obtenidos sugieren que los alelos menores de ambos miRSNPs disminuyen la expresión de miR-146, lo cual a su vez ocasiona una desregulación en sus ARNm blancos IRAK1 y TRAF6. Debido a que este miRNA es un regulador clave de la vía de IFN-I podría causar un efecto en la regulación en la inmunidad innata.

Abreviaturas

ABCB1: Transportador tipo casete de unión a ATP (por sus siglas en inglés: *ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1*)

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

Ago2: Proteína Argonauta 2

AR: Artritis Reumatoide

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

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín Trifosfato

CAD: Enfermedad Arterial Coronaria (por sus siglas en inglés: *Coronary Artery Disease*)

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

CDp: Célula dendrítica plasmacitoide

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*)

ETS-1: Factor de Transcripción ETS, proto-oncogén 1 (por sus siglas en inglés: *ETS proto-oncogen 1, transcription Factor*)

FCGR3: Receptor del Fragmento Fc de IgG 3A (por sus siglas en inglés: *Fc Fragment Of IgG Receptor IIIa*)

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

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

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

IFN-I: Interferón tipo I

IFNAR: Receptor de Interferón α/β (por sus siglas en inglés: *interferón- α/β receptor*)

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IRAK1: Receptor Asociado a la Cinasa 1 (por sus siglas en inglés: *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase*)

IRF5: Factor Regulador de Interferón 5 (por sus siglas en inglés: *Interferon Regulator Factor 5*)

ISRE: Elemento de Respuesta Estimulado por IFN (por sus siglas en inglés: *interferón-stimulated response element*)

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LESp: Lupus Eritematoso Sistémico pediátrico

LMNB1: Lamina tipo B1 (por sus siglas en inglés: *B-type lamin*)

MAF: Frecuencia del alelo menor (por sus siglas en inglés: *Minor Allele Frequency*)

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

miRNA: microRNA

miRNA*: microRNA estrella

miR-SNPs: SNPs en genes de microRNAs

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

NF-κB: 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*)

NUMB: Proteína adaptadora endocítica NUMB

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

PACT: Proteína quinasa activada por ds-ARN mediadora de interferón (por sus siglas en inglés: *Protein Activator Of Interferon Induced Protein Kinase EIF2AK2*)

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

PTTG1: Proteína pituitaria transformadora de tumor 1 (por sus siglas en inglés: *Pituitary Tumor-Transforming 1*)

qPCR: PCR Cuantitativa o en Tiempo Real (por sus siglas en inglés: *quantitative Polymerase Chain Reaction*)

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

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

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Por sus siglas en inglés: *Restriction Fragments Length Polymorphism*)

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

ROS: Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés: *Reactive Oxygen Species*)

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

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

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

STAT1: Transductor de Señal y Activador de Transcripción 1 (por sus siglas en inglés: *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*)

STR: Pequeñas repeticiones en bloque (Por sus siglas en inglés: *Short Tandem Repeats*)

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

Tm: Temperatura Media

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

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*)

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

VNTR: Variable número de repeticiones en bloque (Por sus siglas en inglés: *Variable Number of Tandem Repeats*)

XPO5: Exportina 5

Índice

I. Marco Teórico.....	10
I.1 Variantes genéticas.....	10
I.1.I Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).....	13
I.2 microRNAs (miRNA).....	16
I.2.I Biogénesis.....	17
I.2.II SNPs en microRNAs (miRSNPs).....	18
I.3 miR-146a.....	20
I.3.I miR-SNPs en miR-146a	23
I.4 rs2910164.....	24
I.5 rs2431697.....	27
II. Justificación.....	29
III. Objetivos.....	29
III.1 Objetivo general.....	29
III.2 Objetivos específicos.....	29
IV. Materiales y Métodos.....	30
V. Resultados.....	34
V.1 Genotipificación de los SNPs rs2910164 y rs2431697.....	34
V.2 Análisis de correlación genotipo-expresión.....	36
V.2.1 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2910164 y miR-146a.....	36
V.2.2 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2910164 y TRAF6/IRAK1.....	37
V.2.3 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2431697 y miR-146a.....	38
V.2.4 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2431697 y TRAF6/IRAK1.....	40
VI. Discusión.....	41

VII. Conclusiones.....	45
Referencias.....	47

I. Marco Teórico

I.1 Variantes genéticas

Los estudios de marcadores de ADN proporcionan conocimiento acerca de la composición genética de los individuos, permitiendo profundizar en materia de salud. En la actualidad, con el establecimiento de nuevas tecnologías como la secuenciación del genoma completo, se han reportado nuevas variantes genéticas que permiten conocer más acerca de la susceptibilidad genética, así como de la estructura del genoma, no solamente de cada individuo, sino de las poblaciones. Además, éstas nos proporcionan información relevante acerca de procesos evolutivos, lo que generalmente se refleja en una alta diversidad genotípica y fenotípica. En particular, esta diversidad contribuye a los procesos adaptativos de las distintas especies ante los cambios en el ambiente. [3]

Las variantes genéticas se clasifican en estructurales y variantes de un solo nucleótido. [4] Las estructurales se refieren a todas aquellas secuencias que difieren entre los individuos que no son de un solo nucleótido, [4] estas incluyen inserciones-deleciones (indels), sustituciones en tándem, inversiones de secuencia, número variable de repeticiones en tándem (VNTR, por sus siglas en inglés: *Variable Number of Tandem Repeats*), repeticiones pequeñas en tándem (STR, por sus siglas en inglés: *Short Tandem Repeats*) y número variable de copias (CNV, por sus siglas en inglés: *Copy Number Variation*).

Algunas de estas variantes genéticas implican cambios cromosómicos que repercuten en la estructura de estos. Un ejemplo son los indels que ocurren cuando un segmento cromosómico está ausente o es insertado, lo cual modifica la secuencia, mientras que en las sustituciones en tándem se presentan cuando una secuencia de nucleótidos difiere entre 2 individuos. También se observan inversiones, en las cuales se cambia el sentido de la secuencia del ADN. Estas variantes genéticas se ejemplifican en la (Figura 1).

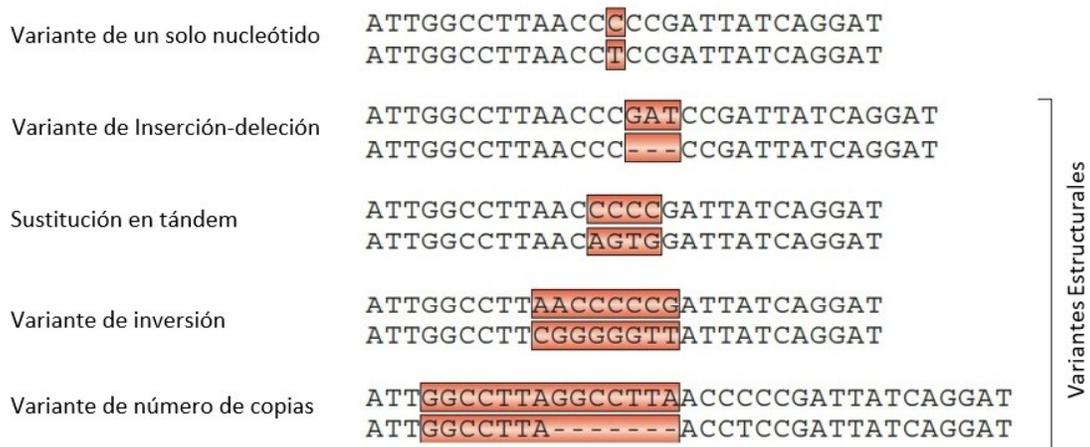


Figura 1. Clases de variantes genéticas en humanos. El esquema muestra los diversos tipos de variantes genéticas. Se ejemplifican los polimorfismos de un solo nucleótido y las variantes estructurales como lo son: inversiones, inserciones, deleciones, sustituciones y variación en el número de copias. Tomada y modificada de [4].

Las variantes estructurales en los cromosomas conllevan, por lo general a fenotipos severos, entre los que se puede mencionar la asociación entre lupus eritematoso sistémico (LES) y la variación en el número de copias del componente C4 del complemento [5] o la duplicación en tándem de LMNB1 que causa leucodistrofia autosómica recesiva.[11] Una variante de inversión notable es la que se encuentra en la región 17q21.31, la cual se presenta con una frecuencia del 21% en individuos europeos, pero es rara en las poblaciones africana (6%) y asiática (1%)[12]. Este polimorfismo se encuentra bajo selección positiva en los individuos europeos y está asociado a los eventos que ocasionan síndrome de Koolen de Vries, el cual es una de las principales causas de retraso mental en la población europea [47]. Finalmente, con referencia a los indels encontramos la enfermedad de Tay-Sachs que resulta de mutaciones en el gen codificante de la subunidad α de la β -hexosaminidasa A, la cual es una enzima compuesta de los polipéptidos α y β ; se han reportado 11 diferentes deleciones y 2 pequeñas inserciones, lo que ocasiona cambios en la actividad de la enzima en distintos grados [13].

Por su parte, las variantes genéticas que implican variaciones en las repeticiones de nucleótidos se utilizan generalmente como marcadores genéticos. Estos

permiten determinar patrones específicos en individuos, como son las secuencias microsátélites. Por su parte, los VNTRs se reportaron inicialmente mediante RFLPs (Por sus siglas en inglés: *Restriction Fragments Length Polymorphism*) [5], sin embargo, son altamente polimórficos y su heterocigosidad también es alta en algunas poblaciones debido a la gran variedad de número de copias que puede presentar este bloque de repeticiones de una secuencia de ADN.

Los STRs o microsátelites son pequeños segmentos de 2 o más pares de bases que se repiten por bloques en un segmento de ADN. Estos loci de micro satélites se encuentran presentes en más de 100,000 regiones que cubren la mayoría del genoma.

Finalmente, los CNVs ocurren cuando difiere el número de copias de una región en particular del genoma. Normalmente, se cuenta con dos copias de cada región autosómica, una por cromosoma, pero debido a una delección o duplicación de ciertas regiones genómicas observamos un incremento o decremento del número de copias.

Estas variantes genéticas han contribuido enormemente a diversos campos de las ciencias forenses o médicas. Por mencionar algunos ejemplos, se encuentra el uso de los patrones generados por RFLPs que muestran segregación mendeliana codominante lo que permite distinguir entre los dos alelos parentales para conocer el origen de un loci en particular en nuestro genoma. Debido a que pueden identificar un locus altamente polimórfico en el genoma, los VNTRs se utilizan en estudios forenses, en el monitoreo de receptores de trasplantes de médula, en la detección de una pérdida parcial o completa de un cromosoma; los STRs son utilizados para análisis de ligamiento de enfermedades recesivas con una baja incidencia y las CNVs suelen modificar la expresión de los genes si se encuentran en la unidad funcional del gen, ya sea que falten copias o estén duplicadas. Algunas CNVs se han asociado a enfermedades como lo es la CNV del gen *FCGR3* con glomerulonefritis o del gen *FCGR3B* con autoinmunidades sistémicas. [5]

Por otra parte, los cambios de un solo nucleótido como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) son las variantes genéticas con mayor prevalencia entre los individuos, por lo que son utilizados en la actualidad para estudios de poblaciones, así como de asociación a distintas enfermedades complejas.

I.1.1 Polimorfismos de un solo nucleótido

Como se ha mencionado, los SNPs son las variantes genéticas más frecuentes. Se pueden clasificar como comunes o raras, las primeras se presentan en al menos 1% de la población, mientras que las raras tienen un porcentaje menor a 1%. Cada SNP representa un cambio en un solo nucleótido donde en la mayoría de los casos hay dos alelos alternativos en una posición determinada, es decir, son bialélicos. Sin embargo, se han reportado una cantidad notable de SNPs que no cumplen esta generalización y son tri-alélicos o incluso tetra-alélicos. Un ejemplo de SNP tri-alélico es la variante G2677T/A del gen *ABCB1*, la cual se ha correlacionado con la disminución de la expresión de la glicoproteína-P, la cual es un transportador dependiente de ATP cuyos niveles de expresión son de suma importancia para determinar la farmacocinética de un gran número de sustratos, entre los cuales se incluyen varios tratamientos contra el cáncer ^[14].

Para que un cambio de nucleótido se considere un SNP, es necesario que el alelo de menor frecuencia (MAF, por sus siglas en inglés: *Minor Allele Frequency*) sea mayor al 1%, si se presenta en menos de 1% de la población se considera una variante rara.

Los SNP se presentan en el genoma uno cada 300 nucleótidos en promedio, lo cual significa que hay alrededor de unos 11 millones de SNPs en el genoma humano ^[6]. Se encuentran distribuidos a todo lo largo del genoma, localizándose en regiones promotoras, en intrones o exones. Sin embargo, dado que menos del 5% del genoma codifica para proteínas, la mayoría de los SNPs están en secuencias no codificantes. El efecto principal de los SNPs varía de acuerdo a la región en la que se localice, si el SNP se localiza en la región codificante de un gen se considera como sinónimo si el cambio de nucleótido no implica cambio de

aminoácido. Sin embargo, pese a codificar a la misma proteína este cambio podría afectar la estabilidad del ARN mensajero (ARNm). Un SNP no sinónimo se considera cuando el cambio de nucleótido ocasiona un cambio en un aminoácido. Dependiendo la posición en la que se encuentre este aminoácido será el efecto que ocasionará en la estructura y función de la proteína. Como último caso esta variante podría generar una mutación sin sentido en la cual la secuencia genera un codón de paro, ocasionando la formación de proteínas truncas o con pérdida de función. Los SNPs que se localizan en regiones intergénicas, pueden afectar sitios reguladores de la expresión de genes contiguos, en ocasiones teniendo un efecto con los niveles de expresión. Cabe resaltar que los SNPs se localizan también en genes no-codificantes, produciendo diferentes efectos en la expresión y función de los transcritos de éstos (Figura 2).

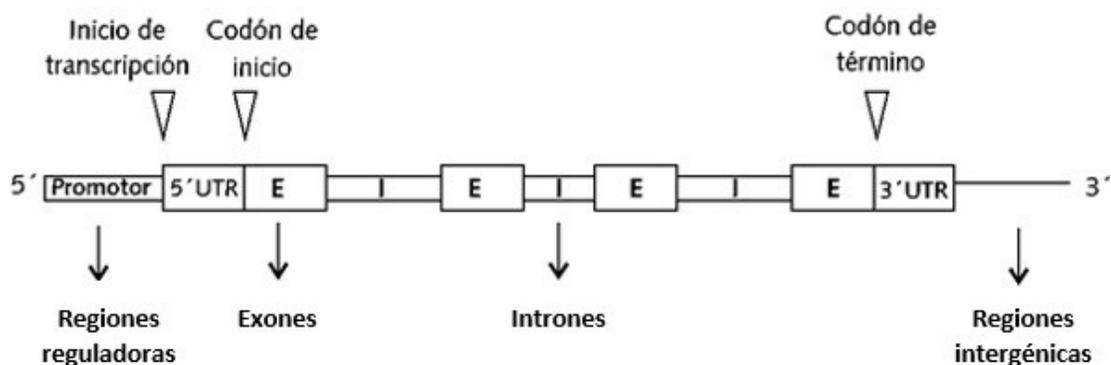


Figura 2. Esquema de la localización de SNPs. En la imagen se aprecian las 4 localizaciones fundamentales en las cuales podemos encontrar SNPs, en regiones reguladoras, intergénicas, intrónicas y exónicas. En estas últimas, dependiendo su efecto pueden ser no sinónimos, sinónimos o sin sentido. Tomada y modificada de [35].

Los SNPs son marcadores biológicos que permiten identificar genes asociados a diversas enfermedades. El abordaje de estudio de los SNPs puede ser a través de genes candidato, los cuales se seleccionan ya sea por su posición dentro del genoma o si se localizan en la región codificante para alguna proteína de interés que pueda tener alguna función directa o indirecta en la enfermedad de estudio [7]. Lo anterior se puede corroborar evaluando los efectos funcionales que tenga

la variante sobre la proteína. Estos estudios han aportado información valiosa en sobre la arquitectura genética en patologías complejas, ya sea mediante asociación génica o selección de blancos y biomarcadores para fármacos.

Con la obtención de genotipos, ya sean pocos o miles de SNPs, se realizan generalmente estudios de asociación, en los cuales se determina mediante pruebas estadísticas si existe un riesgo a padecer una enfermedad al ser portador de ciertas variantes. Normalmente estos estudios utilizan un diseño de caso-control donde las frecuencias alélicas y genotípicas en un sitio de interés se comparan entre las poblaciones de pacientes y controles. Si se obtiene una mayor frecuencia de la variante en los pacientes se considera que esta se encuentra asociada a un mayor riesgo de contraer la enfermedad, ya sea porque afecta un gen de importancia en la enfermedad o porque es un marcador en una región génica involucrada en la enfermedad ^[9]. Estos estudios son de suma importancia en la prevención, predicción y tratamiento de las enfermedades en cuestión.

Una metodología de años recientes es el análisis de estudios de asociación amplio de genoma (GWAS, por las siglas en inglés: *Genome-Wide Association Studies*). Esta metodología evalúa una gran cantidad de SNPs realizando una asociación de estos a un rasgo o una enfermedad. Se pueden llegar a evaluar a la vez miles SNPs, lo que permite obtener información acerca de cuáles variantes confieren riesgo de presentar dicho rasgo o enfermedad. Para realizar este análisis se puede utilizar información como frecuencias genotípicas, desequilibrio de ligamiento y las tasas de recombinación. En la actualidad, existen bases de datos como el HapMap (por sus siglas en inglés: *Haplotype Map*) o el proyecto de 1000 genomas, las cuales han recopilado las variantes genéticas estudiadas hasta hoy en día en diversas poblaciones, describiendo variantes específicas para una población y sus bloques en desequilibrio de ligamiento. ^[8]

Otra aplicación de los SNPs es como marcadores evolutivos, mediante el reconocimiento de variantes conservadas en individuos que nos indican la historia, migración, expansión y adaptación de la población humana. Esto se ha

podido realizar debido al avance tecnológico en el desarrollo de nuevas técnicas que permiten identificar millones de SNPs en un solo experimento como lo es el GWAS.

Actualmente, se cuenta con estudios de caso-control que se han realizado en distintas poblaciones. El meta-análisis multivariable, permite la conjunción de varios resultados, lo cual genera un grupo de resultados para cada efecto y busca una correlación entre éstos, los cuales pueden ser dentro del mismo estudio o entre estudios diferentes. [10]

Más allá de la manera en la cual se aborde su estudio, la localización y función del SNP es fundamental, dado que de ello depende el efecto que pueda tener y así su relevancia biológica. Los SNPs que se encuentran en regiones intergénicas cobran relevancia dado que en estas regiones se encuentran genes no codificantes que generan ARNs pequeños los cuales son reguladores de una gran cantidad de genes y en los que el efecto de estos SNPs no sólo afectaría su procesamiento, sino también su función.

I.2 microRNAs (miRNAs)

En la actualidad se han descrito varios RNAs pequeños no-codificantes, dentro de los que destacan los microRNAs (miRNAs) cuya longitud es de aproximadamente 19-22 nucleótidos y su principal función es la regulación postranscripcional de los ARNm.

Los primeros miRNAs reportados fueron lin-4 en 1993, y posteriormente let-7, ambos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* [1]. Hasta hoy en día se han descrito 1800 precursores y más de 2500 miRNA maduros en humanos [46]. Los miRNAs participan en todos los procesos celulares, desde diferenciación, desarrollo, metabolismo, proliferación, muerte celular, respuesta inmune innata y adaptativa e incluso procesos como los tumorigenesis, entre otros. [2]

La mayoría de los genes que codifican para los miRNAs se encuentran en regiones intergénicas, aunque algunos han sido descritos en regiones intrónicas, los cuales se conocen como mirtrons. Los miRNAs intergénicos tienen su propia región

promotora, por lo tanto, son transcritos como unidades autónomas por las ARN polimerasas II o III. Una gran proporción de estos miRNAs intergénicos se encuentran *en tandem*, por lo que se transcriben como una unidad policistrónica. Por otra parte, los mirtrons se transcriben bajo el promotor del gen codificante en el cual se localizan, y su procesamiento depende a su vez del proceso de splicing. [1]

I.2.1 Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs inicia con su transcripción en el núcleo por parte de la ARN polimerasa II, llevándose a cabo las modificaciones postranscripcionales como lo son el “*capping*” en el extremo 5'-UTR (por sus siglas en inglés: *Untranslated Region*) o la poliadenilación en el 3'-UTR. El transcrito adquiere una estructura talloasa que se conoce como el miRNA primario (pri-miRNA). Posteriormente, el pri-miRNA es procesado por el complejo enzimático conocido como Microprocesador, formado por las enzimas Drosha y DGCR8; este complejo realiza un corte en los extremos del tallo generando un extremo 5' fosfato y el 3' con dos nucleótidos sobresalientes. De esta manera se genera un ARN de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud que se conoce como el precursor del miRNA (pre-miRNA). Este es transportado hacia el exterior del núcleo mediante la proteína nuclear relacionada a ras de unión a GTP (RAN-GTP) y la exportina 5 (XPO5), las cuales forman un poro en la membrana del núcleo a través del cual el pre-miRNA sale al citoplasma.

Una vez que el pre-miRNA se encuentra en el citoplasma, es procesado por la enzima RNasa III Dicer en complejo con las proteínas TRBP (por sus siglas en inglés: *Tar RNA Binding Protein*) y PACT (Proteína activadora de PKR), generando un corte en el asa de la estructura, formando así un duplex de ARN de aproximadamente 22 nucleótidos, conformado por una hebra guía, el miRNA maduro, y otra hebra denominada miRNA* (Figura. 3).

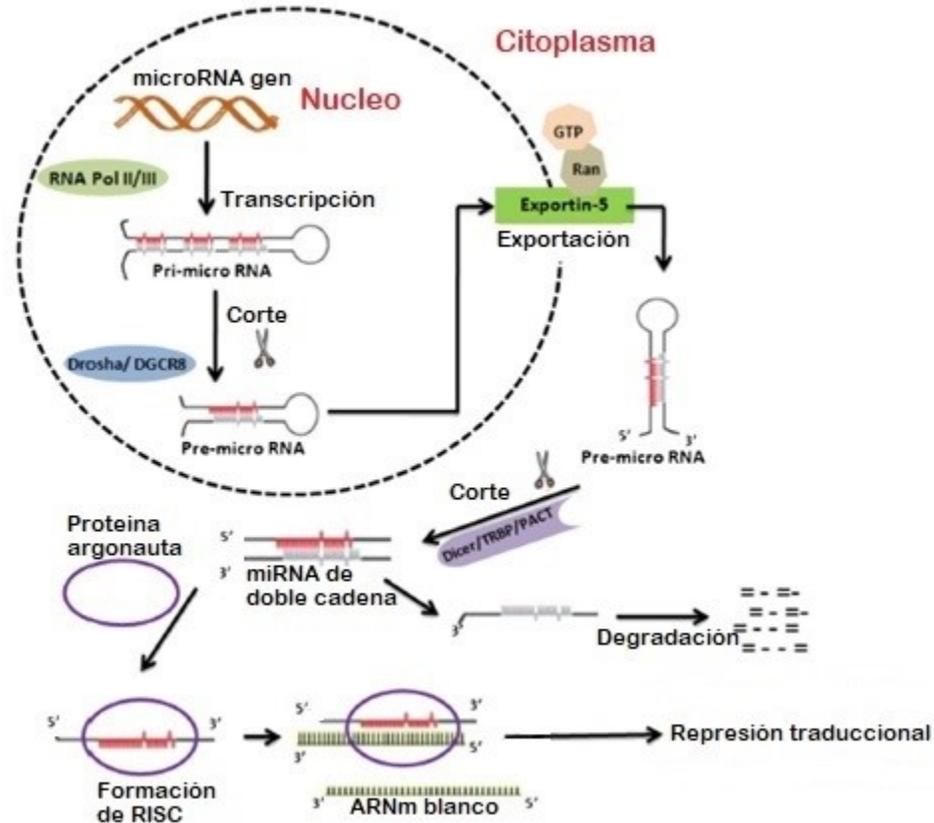


Figura 3. Esquema de la biogénesis de los miRNAs. La transcripción de los miRNAs comienza en el núcleo generándose el pri-miRNA y posteriormente se da su procesamiento para generar el pre-miRNA para su exportación al citoplasma. En el citoplasma se genera el miRNA maduro, el cual se une después al complejo RISC en donde se lleva a cabo el reconocimiento del ARNm blanco, inhibiendo su traducción. Tomada y modificada de [1].

El miR* es generalmente degradado, mientras que el miRNA maduro se une a la proteína Argonata 2 (Ago2), formando el complejo RISC (por sus siglas en inglés: *RNA Induced Silencing Complex*), el cual se une al ARNm blanco por complementariedad de bases con el miRNA, ocasionando así la represión traduccional del ARNm.

I.2.II SNPs en miRNAs (miRSNPs)

Dependiendo de su localización, los miRSNPs afectan tanto el procesamiento como la función de los miRNAs. Estos polimorfismos se localizan: a) en la región promotora, b) en la región que forma parte de los intermediarios en el proceso de maduración de los miRNA, desde la forma primaria hasta el maduro e incluso la

región semilla del mismo, c) en las proteínas implicadas en el procesamiento de los miRNAs (Drosha, Dicer, RISC y Exportina5), d) en la región 3'-UTR del ARNm blanco impidiendo su unión con el miRNA (Figura 4).

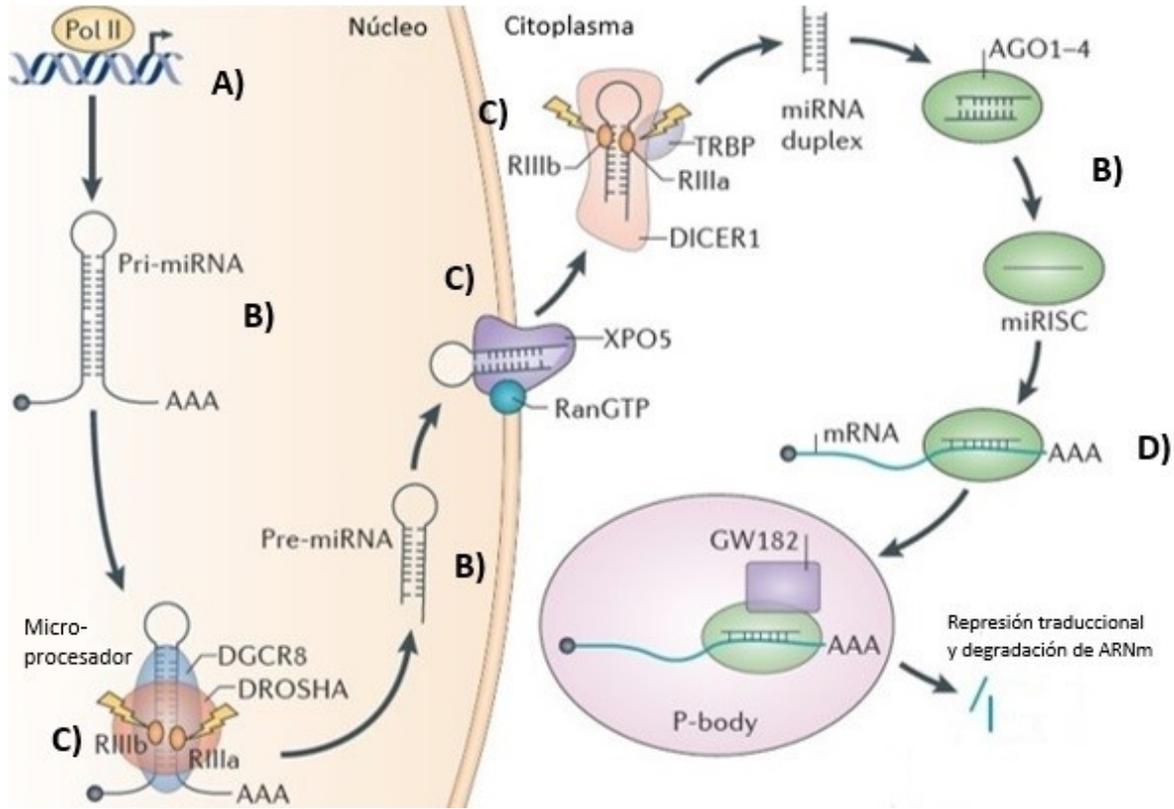


Figura 4. Localización de los miRSNPs. En la imagen se muestran los distintos sitios en los cuales se localizan los miRSNPs, ya sea en el promotor, proteínas implicadas en la vía, en el mensajero blanco o en las secuencias de cada uno de los intermediarios en la maduración del miRNA. Tomada y modificada de [45].

Así, la presencia de un polimorfismo en la región promotora ya sea del miRNA en cuestión o de las proteínas que lo procesan (DGCR8, Drosha, Dicer) alteraría los niveles de expresión de estos. A su vez, la presencia de un SNP dentro de la secuencia de cualquiera de los intermediarios en la maduración podría afectar su procesamiento, alterando los sitios de reconocimiento de la proteína de corte o de exportación ocasionando un defecto en el proceso, o en otro posible caso, impidiendo su unión al complejo RISC. Si el polimorfismo se encuentra dentro de la secuencia del miRNA maduro o en el sitio de reconocimiento de miRNAs en el ARNm, se tendría un efecto directo en la función del miRNA, dado que se vería

afectada la complementariedad de bases para unirse al sitio de reconocimiento del ARNm blanco, y por lo tanto la interacción de miRNA-ARNm se vería alterada.

Por lo anterior, es importante evaluar el efecto de los miRSNPs en el procesamiento y función de los miRNAs, tal como miR-146a, uno de los miRNAs reguladores clave de la respuesta inmune innata.

I.3 miR-146a

Este miRNA fue descrito por primera vez en 2006 por Taganov, el cual mostró su comportamiento ante la estimulación con lipopolisacáridos y con ello demostrando su papel en la regulación de la inflamación [16]. El gen de este miRNA se encuentra en la posición q33.3 del cromosoma 5, su transcrito primario tiene una longitud de aproximadamente 99 nucleótidos y el miRNA maduro de 22 nucleótidos.

El miR-146a participa en la regulación postranscripcional de genes de la respuesta inmune; está implicado en la regulación negativa de vías de señalización como la vía mediada por TLRs (por sus siglas en inglés: *Toll Like Receptors*), en la maduración y selección de linfocitos B y T, en la producción de citocinas pro-inflamatorias, y como supresor de tumores. Puede ser inducido por la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas (NF- κ B, por sus siglas en inglés: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells*). Entre los ARNm blancos de este miRNA se encuentran TNF, IL-1B, TRAF6, IRF5, IRAK1, STAT1 y el factor H del complemento. TRAF6 participa en la producción de IFN-I iniciada por el reconocimiento de patógenos por los TLR 7/8 y TLR9 que se encuentran en membranas endosomales. En un inicio TRAF6 interactúa con el factor de diferenciación mielodide (MyD88) que junto con IRAK1 y 4 fosforilan a los factores reguladores de IFN (IRF3, 5 y 7), con lo cual pueden translocarse al núcleo para inducir la transcripción de genes de IFN-I. Una vez liberado, IFN-I se une a su receptor membranal IFNAR (por sus siglas en inglés: *Interferon- α/β Receptor*) lo que induce la formación del heterotrímero compuesto por STAT1,2 e IRF9. Este complejo se une al elemento de respuesta estimulado por IFN, ISRE (por sus siglas en inglés: *Interferon-Stimulated Response Element*) que activa la transcripción de los genes inducibles por IFN. Dado que los principales

ARNm blanco son los mensajeros de proteínas implicadas en la vía de IFN-I, miR-146a es un importante regulador de ésta y por consecuencia de los procesos celulares en los cuales interviene, como son la maduración de células dendríticas plasmacitoides (CDPs), el desarrollo de linfocitos vírgenes, la activación de linfocitos B y sobre todo en la respuesta inmune a infecciones virales [44] [27] [49].

Debido a la importancia de estos ARNm blancos se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto que tiene el funcionamiento de miR-146a en diversas enfermedades sobre todo las autoinmunes, cáncer o procesos inflamatorios (Tabla1).

Tabla 1. Estudios recientes de la expresión en miR-146a. En la tabla se muestran algunos estudios realizados sobre la expresión de este miRNA en diversas enfermedades, así como correlaciones con mensajeros que son blanco de miR-146a.

Estudio	Patología	Expresión y/o función de miR-146a	Población de estudio	Referencia
Expresión de miR-146a en orina	LES	Niveles elevados de miRNA en orina	Pacientes con LES de Hong Kong	[17]
Correlación expresión-niveles de citocinas	Artritis reumatoide	Correlación positiva entre miR-146a y TNF- α	Pacientes de China	[20]
Correlación expresión miRNA-expresión mensajero blanco	Carcinoma oral de células escamosas	miR-146a regulador negativo de IRAK1, TRAF6 y NUMB	Pacientes de Taiwan	[21]
Ensayo de expresión	Artritis reumatoide	Mayor expresión de miR-146a en pacientes comparado con controles	Pacientes y controles de Egipto	[26]
Ensayo de expresión	Nefritis lúpica	Expresión disminuida de miR-146a y aumentada de TRAF6	Pacientes y controles de China	[27]

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

I.3.1 miR-SNPs en miR-146a

Se han reportado algunos SNPs localizados en *MIR-146a* o en regiones cercanas a este, dentro de los cuales se encuentran los SNPs rs2910164 y rs2431697, localizados en la región codificante para el precursor y la región promotora, respectivamente (Figura 5).

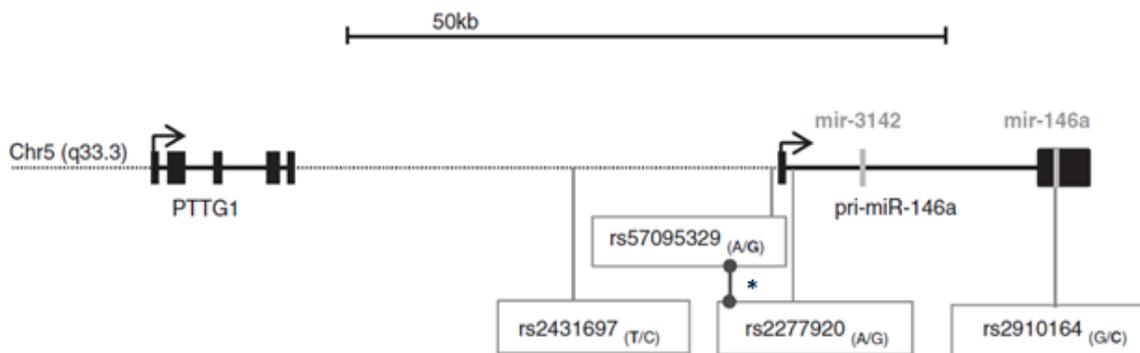


Figura 5. Localización de los SNPs de la región *PTTG1-MIR-146a*. Se muestra la localización compartida de *MIR-146a* y *MIR-3142*, las barras negras indican los exones y la línea punteada la región intergénica. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. El asterisco denota que los SNPs unidos por la línea, están en desequilibrio de ligamiento. (Tomada y modificada de [16]).

Cabe resaltar que dentro de la secuencia de *miR-146a* se encuentra otro miRNA, miR-3142, el cual no ha sido estudiado a profundidad y aún se desconoce su función. Debido a su localización, es altamente probable que la expresión y el procesamiento de este miRNA dependan de la transcripción de *MIR-146a*.

El estudio de estos miRNAs se ha enfocado principalmente a estudios de asociación a diferentes patologías, como enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y en diversos tipos de cáncer.

Debido a que miR-146a regula principalmente a ARNm blanco de proteínas que son clave para la respuesta inmune innata, se han realizado estudios con enfermedades autoinmunes como lo son artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), asma, síndrome de Sjögren; en enfermedades cardiovasculares como la

enfermedad arterial coronaria e incluso en diversos tipos de cáncer como carcinoma de células escamosas, gástrico, cervical, de tiroides, entre otros.

Se han realizado diversos estudios de asociación, en especial del SNP rs2910164, en enfermedades autoinmunes como LES y AR. De manera interesante, se ha observado que la asociación, principalmente en estudios de caso-control, de estos SNPs varía dependiendo la población de estudio, observándose diferencias incluso en poblaciones de una misma región o dentro del mismo país. Un ejemplo son los estudios de asociación del SNP rs2910164 a enfermedades autoinmunes en poblaciones europeas y asiáticas, en donde no se ha encontrado asociado a LES u otras enfermedades autoinmunes, sin embargo, en otras poblaciones se asocia a cierto grupo o género, como lo muestra un estudio en mujeres mexicanas en donde se asocia a asma ^[29]. Esta diferencia se ha observado incluso en estudios de meta-análisis ^[30] ^[28] ^[42]. Aun cuando los estudios de asociación proporcionan información relevante del efecto genético que tienen estos SNPs, son aún escasos los que se enfocan en evaluar el efecto funcional de los miRSNPs en la expresión y regulación mediada por miR-146a. Analizar el efecto de los SNPs rs2910164 y rs2431697 permitirá conocer la relevancia biológica que tienen sobre la regulación mediada por miR-146a.

I.4 rs2910164

El polimorfismo rs2910164 consiste en una sustitución de guanina por citosina, lo que causa una pérdida de estabilidad en el tallo de la forma precursora de miR-146a (Figura 6).

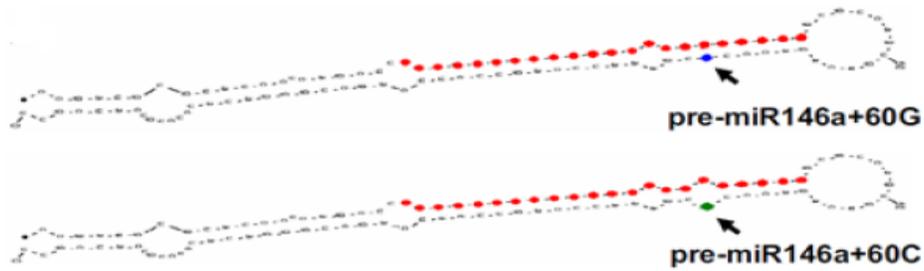


Figura 6. Esquema de la localización y efecto del SNP rs2910164. En la imagen se muestra la localización del SNP en la estructura de pri-miR-146a, señalado con un punto azul el alelo G y en verde el alelo C. Marcado con puntos rojos se encuentra la secuencia del miRNA maduro. Tomada de [27].

El efecto de este polimorfismo puede ocasionar además variaciones en el proceso de maduración como una disminución en el procesamiento del miRNA maduro, y por lo tanto tener un efecto en la regulación de su ARNm blanco como son IRAK1, TRAF6, STAT1, e IRF5, lo cual a su vez influye directamente en la producción de citocinas/quimiocinas proinflamatorias.

En el laboratorio se ha estudiado previamente el miRSNP rs2910164 para conocer si se encuentra asociado a LES, AR y asma en la población mexicana utilizando una cohorte de sujetos pediátricos, encontrando asociación a asma solamente en mujeres, pero no así para LES o AR. [29] Sin embargo, en otros estudios realizados con diversas poblaciones caucásicas y asiáticas este polimorfismo no se encontró asociado a LES, incluyendo en las poblaciones china, mexicana o europeas combinadas a través de diferentes meta-análisis. [16] [29]

Con respecto a estudios que evalúan el efecto del polimorfismo con la expresión, función o relación a patologías de pre-miR-146a y miR-146a, se ha observado que los genotipos relacionados a ciertas condiciones varían. Por ejemplo, en enfermedad arterial coronaria individuos con el genotipo CC se relacionan con niveles elevados de miR-146a en individuos sudafricanos, por otro lado individuos de Turquía con el genotipo GG se encuentran relacionados a un mayor riesgo de padecer aterosclerosis (Tabla 2).

Tabla2. Estudios recientes sobre el SNP rs2910164. En la tabla se muestra una recopilación de los estudios asociados al SNP rs2910164, en los cuales se aprecia la enfermedad asociada, el genotipo y la población de estudio.

Estudio	Patología	Efecto del genotipo o alelo	Población de estudio	Referencia
Correlación genotipo-expresión	CAD	Individuos con genotipo CC presentan niveles elevados de miR-146 ^a	Pacientes con CAD nativos de Sudáfrica	[19]
Estudio de asociación	Asma	Genotipos G/G y G/C asociados a hiperrespuesta bronquial a metacolina	Pacientes con asma de Corea del Sur	[22]
Estudio de asociación	AT	Genotipo GG y alelo G asociado a riesgo para AT	Pacientes de Turquía	[23]
Estudio de asociación	Cáncer gástrico	Genotipos GG/GC asociados a riesgo	Pacientes de China	[24]
Correlación genotipo-expresión	Cáncer gástrico	Aumento en la expresión de UHRF1 con el genotipo CC	Pacientes con cáncer gástrico de Irán	[18]

CAD: Enfermedad Arterial Coronaria, AT: Ateroesclerosis

En un estudio previo se observó que en pacientes con LES pediátrico (LESp) mexicanos, la presencia del alelo C aumenta los niveles de la forma madura y precursora de miR-146a, siendo mayor el aumento en individuos heterocigotos ^[27].

Sin embargo, aún no se ha evaluado el efecto del polimorfismo en la expresión y función de miR-146a en individuos sanos portadores de este SNP.

I.5 rs2431697

Por otro lado, el rs2431697 consiste en una sustitución de una citosina por una timina. Este polimorfismo se localiza en la región promotora de *MIR-146a*, en la región intergénica entre el gen *PTTG1* y *MIR-146a* (Figura 5).

Este polimorfismo se ha asociado principalmente a LES. En un meta-análisis se obtuvo una razón de momios de riesgo (OR= 1.26) para LES, mientras que para otras enfermedades autoinmunes su efecto no fue significativo [30]. En otro estudio realizado por Lögfren y colegas [16] este polimorfismo se asoció a LES en población europea, mientras que en un meta-análisis posterior se replicó este resultado y además se encontró que la presencia del alelo T incrementa la susceptibilidad a LES [28]. Otro estudio en población China, indica que la presencia del alelo T incrementa el riesgo para enfermedad arterial coronaria (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios realizados sobre el SNP rs2431697. En la tabla se muestran estudios relevantes realizados para este polimorfismo.

Estudio	Patología	Asociación	Población de estudio	Referencia
Meta-análisis	LES	Asociación a un incremento de riesgo a LES (OR=1.26)	Varias poblaciones	[30]
Meta-análisis	LES	Asociación a LES (OR=1.24)	Varias poblaciones	[28]
Correlación	LES	Alelo de riesgo T correlaciona con baja regulación de miR-146 ^a	Europea	[16]
Estudio de asociación	CAD	Alelo de riesgo T aumenta riesgo para CAD	China	[31]
Meta-análisis	LES	Asociación a un riesgo incrementado a LES (OR=1.461)	China central	[34]

CAD: Enfermedad Arterial Coronaria, LES: Lupus Eritematoso Sistémico

Referente a estudios de correlación para este SNP, no se han encontrado antecedentes recientes, sin embargo, en el laboratorio ha sido evaluado en pacientes con LESp mediante un estudio de asociación en el cual no se ha asociado a la enfermedad. A su vez se realizó un estudio de correlación genotipo-expresión que indica que la presencia del alelo T ocasiona un aumento en la expresión de todos los estadios de maduración de miR-146a, obteniendo los mayores niveles en los individuos homocigotos con genotipo TT y finalmente mostrando que este polimorfismo se encuentra en un enhancer y no en una región promotora debido a las marcas específicas y elementos que fueron encontrados en esa región genómica

mediante una predicción de sitios de unión a factores de transcripción realizada con las herramientas bioinformáticas ENCODE y PROMO ^[44]. Teniendo estos antecedentes sería preciso evaluar el efecto del SNP en miR-146a en individuos sanos.

II. Justificación

El estudio de variantes genéticas en genes reguladores como son los miRNAs proporciona no solamente información valiosa acerca de la susceptibilidad genética, sino que también acerca de un posible cambio en la función del miRNA y sus formas precursoras, así como de la regulación de sus ARNm blancos.

El miRNA miR-146a es un regulador maestro de la respuesta inmune innata, por lo que el estudio de los SNPs rs2910164 y rs2431697, localizados en la secuencia del pre-miR-146a y en la región promotora de miR-146a, respectivamente, podrían jugar un papel relevante en el procesamiento y función de este miRNA.

Ambos SNPs no se asocian a LESp en la población mexicana, sin embargo, aún no se ha evaluado el efecto funcional de estos polimorfismos en individuos sanos para conocer si tiene algún efecto en la respuesta inmune.

III. Objetivos

III.1 Objetivo general

- Evaluar la correlación de los SNP rs2910164 y rs2431697 localizados en el gen MIR-146a con la expresión, el proceso de maduración y la función de este miRNA.

III.2 Objetivos específicos

- Genotipificar los polimorfismos rs2910164 y rs2431697 y calcular las frecuencias alélicas y genotípicas en individuos sanos.
- Evaluar la expresión de pri-miR-146a, pre-miR-146a, miR-146a, miR-146a*, miR-3142 y de los ARNm blancos IRAK1 y TRAF6.

- Correlacionar el genotipo de cada uno de los SNPs con la expresión del miRNA y sus distintas formas, así como de IRAK1 y TRAF6, para evaluar el efecto de las variantes en la función de miR-146a.

IV. Materiales y Métodos

➤ Población de estudio

En este estudio se incluyeron personas voluntarias, a las cuales se les aplicó un cuestionario para evaluar su estado de salud. Se cuenta con el consentimiento informado de todos los participantes. El estudio contó con la autorización de los comités de ética, bioseguridad e investigación de la institución.

- Criterios de inclusión

Se incluyeron individuos sanos mayores de 18 años, que las últimas dos generaciones de su familia hubieran nacido en México y que aceptarán firmar el consentimiento informado.

- Criterios de exclusión

Individuos que presenten o refieran antecedentes de enfermedades autoinmunes, crónico concomitante o que estuvieran bajo algún tratamiento hormonal (mediante la aplicación de un cuestionario).

- Criterios de eliminación

Se consideró cuando la muestra no contara con la calidad deseada de ácidos nucleicos, que fuera insuficiente o la ocurrencia de problemas técnicos. También se consideró cuando el voluntario decidiera salir del estudio.

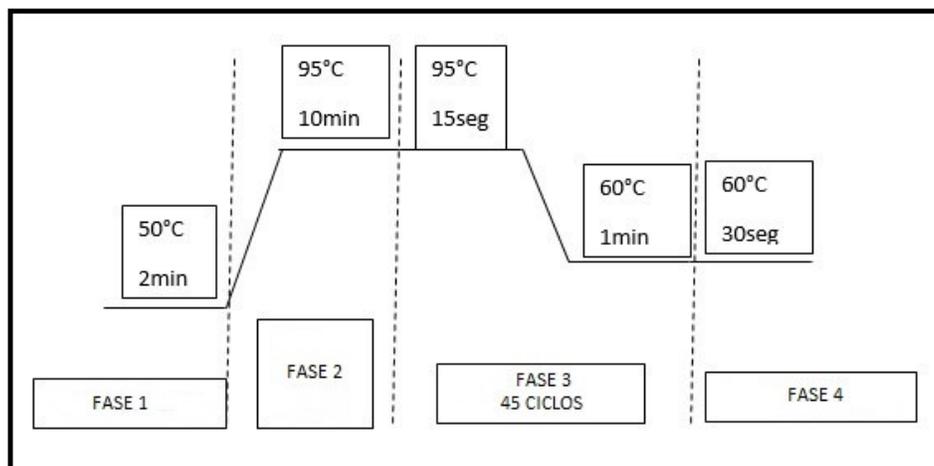
➤ Extracción de ADN

Se llevó a cabo a partir de 5mL de sangre periférica empleando el estuche comercial Puregen Blood Core Kit C (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. En breve, se adicionó solución de lisis de glóbulos rojos a la muestra y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se agregó solución de lisis de células blancas. Posteriormente se adicionó solución de precipitación de

proteínas y se centrifugó a 3500 rpm durante 7 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo y se adicionó isopropanol en una relación 1:1, se agitó por inversión y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos para obtener el botón de ADN. El botón se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se dejó secando el botón de ADN toda la noche y posteriormente se resuspendió en 400µL de amortiguador de hidratación. Finalmente, se determinó su concentración utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000). Se consideraron valores de absorbancia 260/280 dentro de 1.7 y 1.9.

➤ Genotipificación

Para la genotipificación se utilizaron para cada reacción 25ng de ADN genómico, 2.5ul de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0.125ul de la sonda TaqMan para genotipificación (40X) correspondiente para los SNP estudiados rs2431697 (C__26693319_10) y rs2910164 (C__15946974_10) (Thermo Fisher Scientific) y 0.375ul de agua libre de nucleasas. Este ensayo se realizó en el equipo QuantStudio3 (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa.



➤ **Extracción de ARN**

A partir de 5mL de sangre periférica, se obtuvieron las células mononucleares (CMN) por gradiente de densidad utilizando ficoll (Stemcell Technologies), para ello se agregaron 6mL de ficoll a un tubo de 15mL, al cual se le añadió sangre diluida 1:3 con PBS 1x, finalmente se centrifugó la muestra a 1500 rpm durante 20 minutos sin freno. Se recuperó el anillo de células formado y se lavó con PBS 1x, se centrifugaron las células a 1500rpm, 10minutos para formar un pellet, se desechó el sobrenadante y se agregó 1mL TRIzol (Thermo Scientific). Se adicionaron 200µL de cloroformo, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se agregaron 700µL de isopropanol para la precipitación del ARN y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1mL de etanol y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón para su posterior rehidratación en 20µL de agua libre de nucleasas y su cuantificación en Nanodrop (ND-1000). Se consideraron valores de absorbancia 260/280 dentro de 1.9-2.0.

➤ **Síntesis de ADN complementario (cDNA)**

➤ **RT-PCR para miRNAs**

Para la síntesis de cDNA se utilizó el estuche comercial miR-X (Clontech), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para cada reacción se utilizaron: 200ng de ARN, 1.25uL enzima y 6.25uL del buffer correspondiente. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (AB, Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: 60min a 37°C y posteriormente 5min a 85°C. La reacción se llevó a un volumen final de 100uL con agua libre de nucleasas.

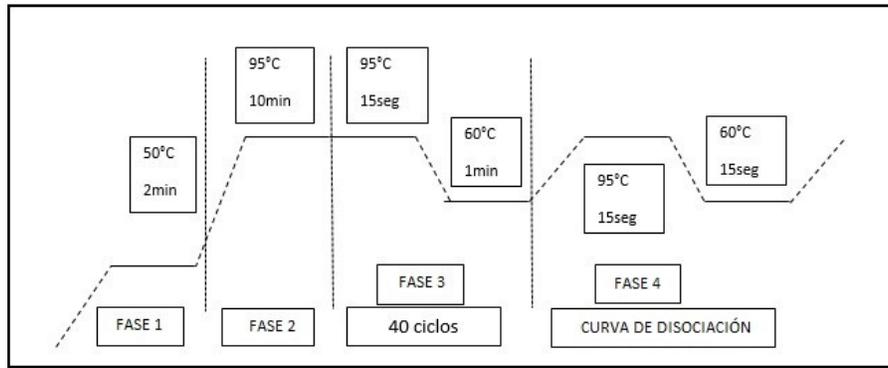
➤ **RT-PCR para ARN mensajeros (ARNm)**

Para la síntesis de cDNA de mRNAs se utilizó el estuche comercial Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se utilizaron: 500ng de ARN (3.35ul), 1ul de 10X RT Buffer, 2.2ul de MgCl₂, 2ul de dNTPs, 1ul de OligodT, 0.2ul de RNase inhibitor y 0.25ul de enzima Reverse Transcriptase. Para llevar a cabo la reacción se utilizó un

termociclador (AB, Applied Biosystems), utilizando el siguiente programa: 25°C por 10min, 48°C por 30min y 95°C por 5 min.

➤ **PCR en tiempo real (qPCR).**

Los ensayos del PCR en tiempo real (qPCR) se realizaron utilizando SYBR Green 2x qPCR MasterMix (Thermo Scientific). Se utilizaron 2 tipos de cDNA ya sea perteneciente a miRNAs o a ARNm dependiendo el ensayo de expresión que se realizó: evaluar los diferentes estadios de maduración del miRNA o los ARNm blancos del miRNA. Los oligonucleótidos utilizados para la expresión de los diferentes estadios de maduración de miR-146a son 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). Como gen de referencia se utilizó el ARN pequeño U6, utilizando los oligonucleótidos que contiene el estuche comercial Mir-X miRNA First-Strand Synthesis (Clontech Laboratories). Por otra parte, los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de expresión de mensajeros se muestran a continuación: IRAK1 Fw (5'-TGG ACT TTG CTG GCT ACT GTG CTC-3') e IRAK1 Rv (5'-GCT GGG GCT GTC CTG ATG TAG AAA-3'), TRAF6 Fw (5'-CCA GCG TCC CTT CCA AAA A-3') y TRAF6 Rv (5'- ATT AGG CAT CTG TTC TCT GA-3'). Se utilizaron 120ng de cDNA para la expresión de miRNAs y 500ng para la expresión de ARNm. Cada muestra se realizó por triplicado. Todos los ensayos se llevaron a cabo en el termociclador QuantStudio3 (Applied Biosystems) utilizando el siguiente programa de termociclaje:



➤ **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis ANOVA de 1 vía no paramétrica para comparar entre los distintos resultados obtenidos de la correlación genotipo-expresión y con ello saber si la diferencia entre los grupos es significativa o no. Se utilizó el programa GraphPad Prism 7 ^[48], se consideró que los resultados eran significativos si el valor de $P < 0.05$.

V. Resultados

V.1 Genotipificación de los SNPs rs2910164 y rs2431697

Se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas para ambos polimorfismos rs291064 y 2431697. Para el polimorfismo rs2910164 se obtuvo una mayor frecuencia de individuos homocigotos para el alelo mayor GG (58%), mientras que se obtuvo una frecuencia del genotipo GC de 37% y de 0.5% para el genotipo CC. Esta distribución concuerda con la distribución de las frecuencias obtenida previamente en estudios anteriores realizados en el laboratorio en una muestra de 414 individuos controles. A su vez las frecuencias alélicas muestran una frecuencia en la población de 0.77 para el alelo G y 0.23 para C (Figura7).

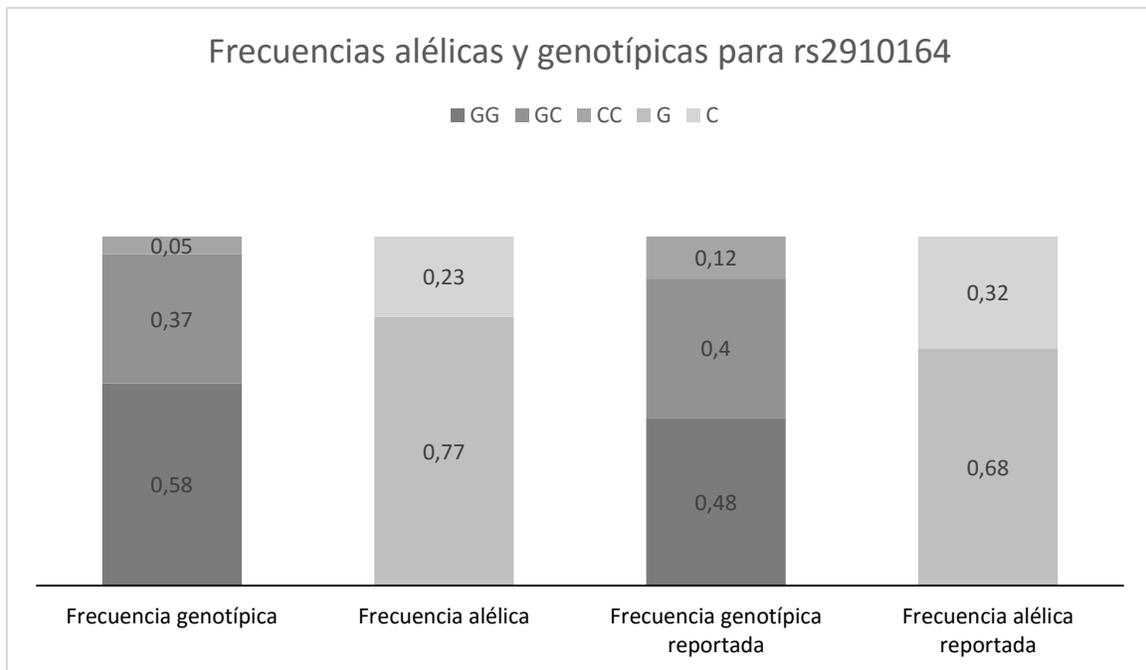


Figura 7. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo rs2910164. Valores de frecuencias obtenidas de nuestra población de estudio, donde tenemos un total de 41 individuos controles estudiados. Por otra parte, la población del estudio previo es de 414 individuos [27].

Con respecto al SNP rs2431697, se obtuvieron las siguientes frecuencias genotípicas: homocigotos CC de 41%, heterocigotos CT 49% y homocigotos TT 10%. Esta distribución genotípica concuerda en proporciones con la reportada al igual que el anterior SNP con un estudio previo realizado en el laboratorio en una muestra de 436 individuos controles. Por otra parte, las frecuencias alélicas fueron de 66% para el alelo mayor C y de 34% para el alelo menor T (Figura 8).

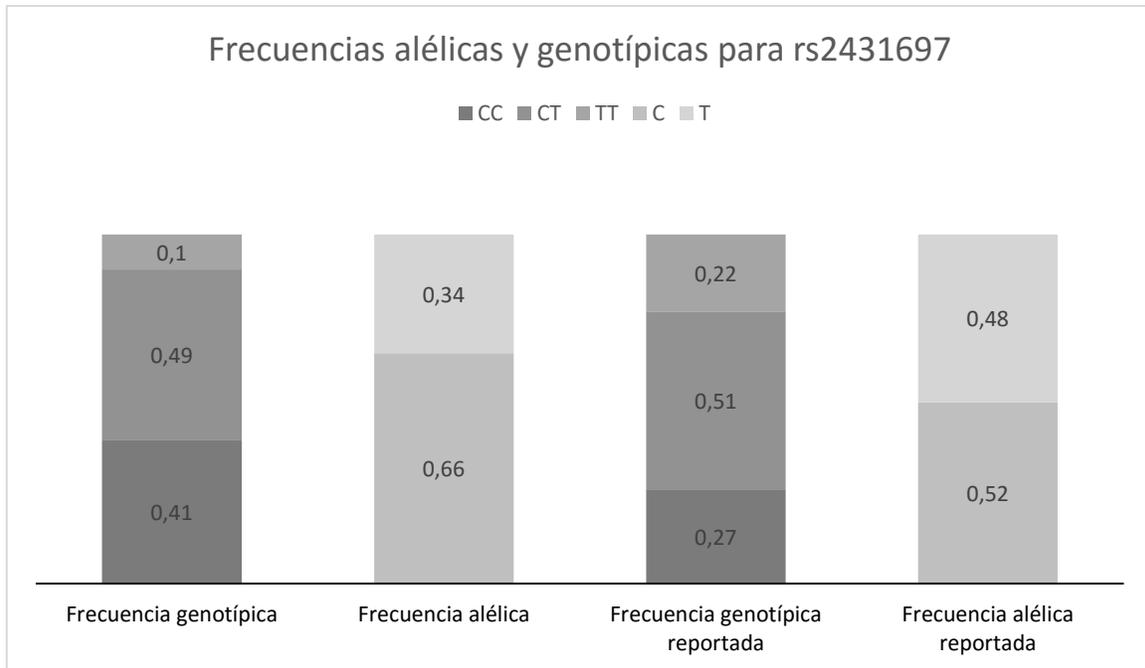


Figura8. Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo rs2431697. Valores de frecuencias obtenidas para el segundo SNP de estudio en nuestra población de estudio. Nuestra población de estudio es de 51 individuos, en contra de 436 individuos utilizados en el estudio previo. ^[44]

V.2 Análisis de correlación genotipo-expresión

V.2.1 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2910164 y miR-146a

Para determinar el efecto de cada uno de los miRNPs sobre la expresión y función de miR-146a, se realizó la correlación genotipo-expresión de ambos polimorfismos con el intermediario pre-miR-146a y la forma madura de miR-146a. En el caso de la correlación del SNP rs2910164 mostrada en la (Figura 9), observamos que la presencia del alelo menor C, ocasiona una disminución en los niveles de pre-miR-146a y miR-146a maduro, siendo la expresión en los individuos con genotipo CC la más baja. Sin embargo, solo en la correlación de miR-146a maduro las diferencias entre los individuos GG con los otros 2 grupos son significativas, teniendo un valor de $p < 0.05$ entre los dos grupos homocigotos y $p < 0.001$ entre los individuos GG vs GC.

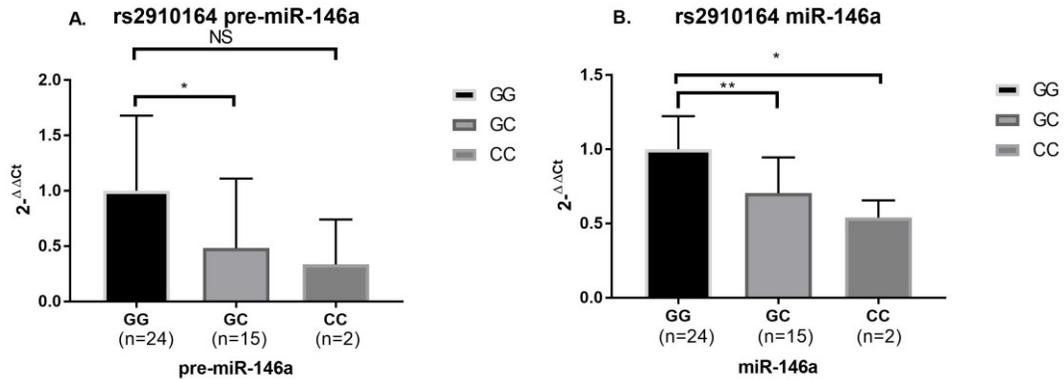


Figura 9. Correlación genotipo-expresión del polimorfismo rs2910164 con la forma madura y precursora de miR-146a. En estos gráficos podemos observar el efecto del SNP rs2910164 sobre los niveles de la forma precursora y madura de miR-146a en los individuos con los 3 posibles genotipos (GG, GC y CC). Gráfico A observamos una disminución en los niveles del pre-miR-146a en los individuos con el alelo C y el gráfico B muestra los niveles de miRNA maduro los cuales disminuyen igualmente en los portadores del alelo C. **= $p < 0.001$ *= $p < 0.05$ NS= No significativo.

V.2.2. Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2910164 y TRAF6/IRAK1

Posteriormente, se realizó la correlación de la expresión de los ARNm blanco IRAK1 y TRAF6 con los genotipos del rs2910164, observándose que el alelo menor C ocasiona una tendencia al aumento en los niveles de sus ARNm blanco, que coincide con la disminución de miRNA maduro en los individuos portadores de este alelo, aunque el efecto es poco visible en la correlación para IRAK1, sin embargo, es notable el aumento en TRAF6 comparando los niveles de los individuos GG vs los individuos CC incluyendo su valor de $p < 0.05$ (Figura 10).

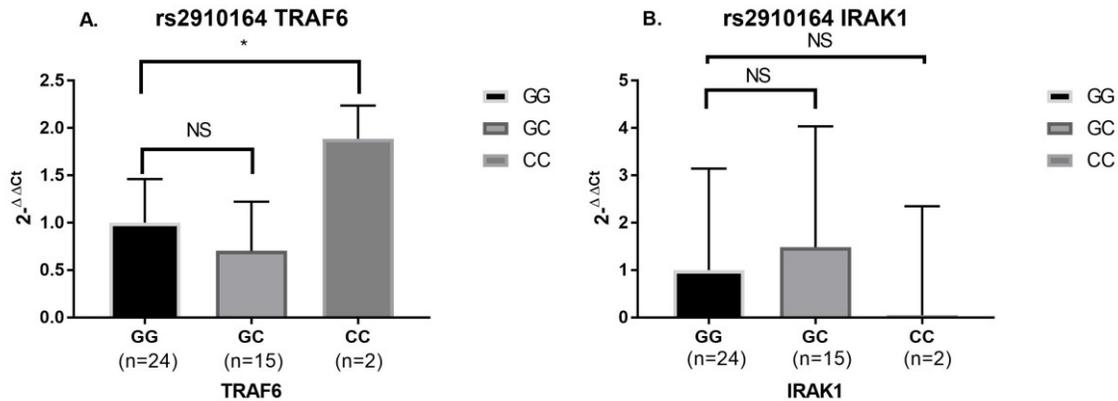


Figura 10. Efecto del polimorfismo rs2910164 sobre la regulación de IRAK1 y TRAF6. En las gráficas se muestra el efecto de los genotipos en la expresión de TRAF6 e IRAK1. **A.** Se puede observar en éste gráfico que la presencia del alelo menor C ocasiona una tendencia al aumento en la expresión de TRAF6 observando el mayor efecto en individuos homocigotos para el alelo menor. **B.** En el caso de IRAK1, la presencia del alelo menor C ocasiona un incremento en la expresión del ARNm blanco de IRAK1, aunque se muestra una disminución para individuos homocigotos CC. **= $p < 0.001$ *= $p < 0.05$ NS= No significativo.

V.2.3 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2431697 y miR-146a

Debido a que el SNP rs2431697 se encuentra potencialmente en la región promotora, específicamente en una región enhancer, se realizó la correlación de los genotipos de este SNP con cada uno de los intermediarios en la maduración de miR-146a y con miR-3142. En la (Figura 11), se observa una disminución en los individuos portadores del alelo menor T, incluyendo la expresión de miR-3142.

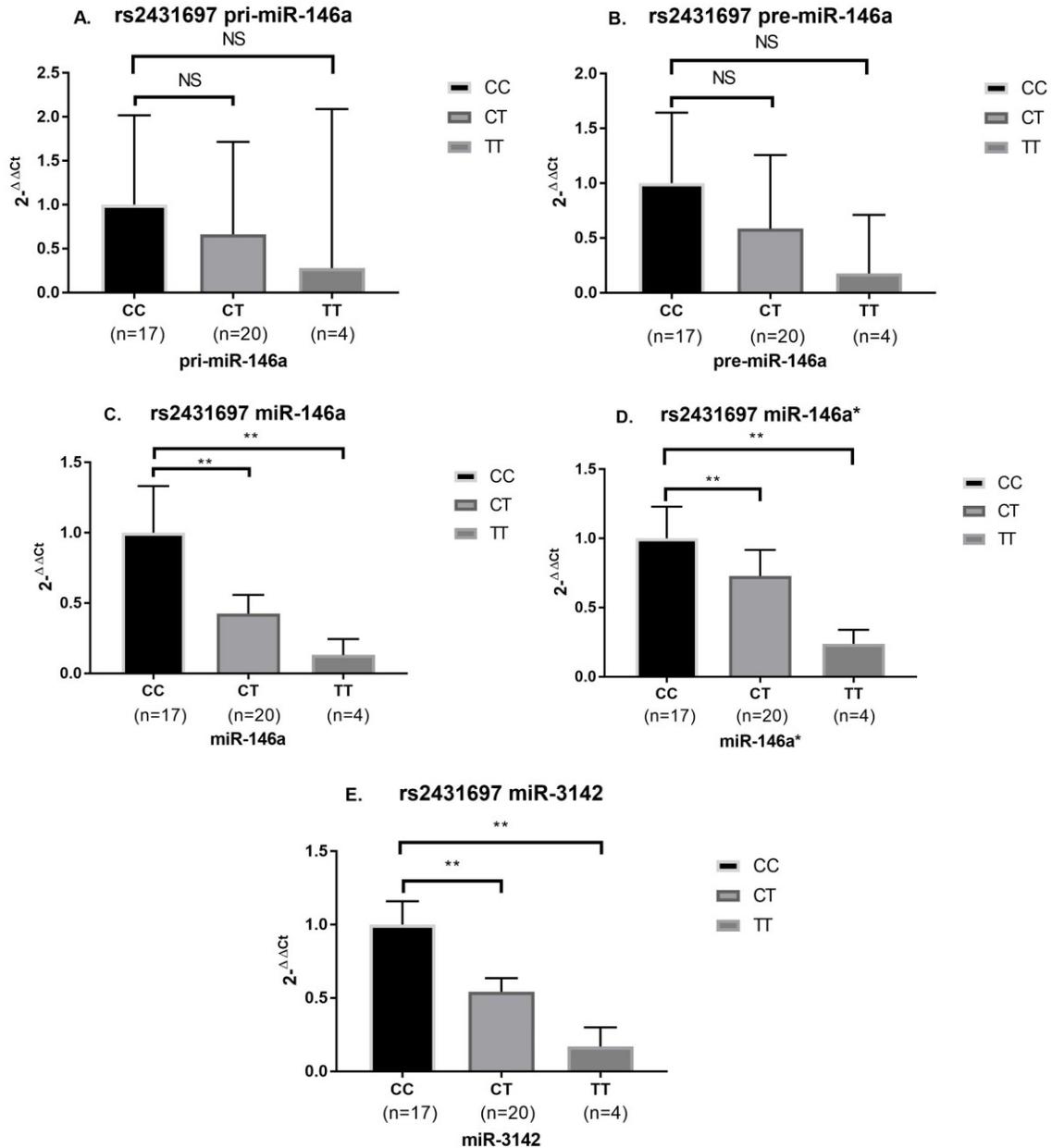


Figura 11. Correlación genotipo-expresión del polimorfismo rs2431697 con todos los intermediarios en la maduración de miR-146a y con miR-3142 maduro. En los gráficos podemos observar el efecto que genera el SNP sobre la expresión de miR-146a y sus intermediarios, así como de miR-3142 que está dentro de éste. En los gráficos **A, B, C y D** se aprecia la disminución en la expresión en todos los estadios de maduración de miR-146a en los individuos que poseen el alelo menor T, acentuándose el efecto en los homocigotos TT, en el gráfico **E** observamos la disminución en los niveles de miR-3142 que al igual que con miR-146a se presenta en los individuos con alelo T **= $p < 0.001$ *= $p < 0.05$ NS= No significativo.

Es importante hacer notar que los estadios primario y precursor de miR-146a no son significativos sus cambios entre los tres genotipos, sin embargo, en los demás

intermediarios de miR-146a y para miR-3142 los valores de significancia se encuentran con un valor de $p < 0.001$ (Figura 7). De manera interesante solamente para las correlaciones de miR-146a* y de miR-3142 su comparación entre individuos CT y TT obtuvo valores de $p < 0.001$.

V.2.4 Análisis de correlación genotipo-expresión entre rs2431697 y TRAF6/IRAK1

Por otra parte, el efecto del SNP rs2431697 en la expresión de IRAK1 es su disminución en los individuos con el alelo menor T, ya sean genotipo CT o TT. Estos niveles entre los individuos con genotipo CT y TT tienen valores parecidos, siendo ligeramente mayor en los controles heterocigotos y siendo solamente significativa la diferencia de estos con los individuos con genotipo CC. (Figura 12).

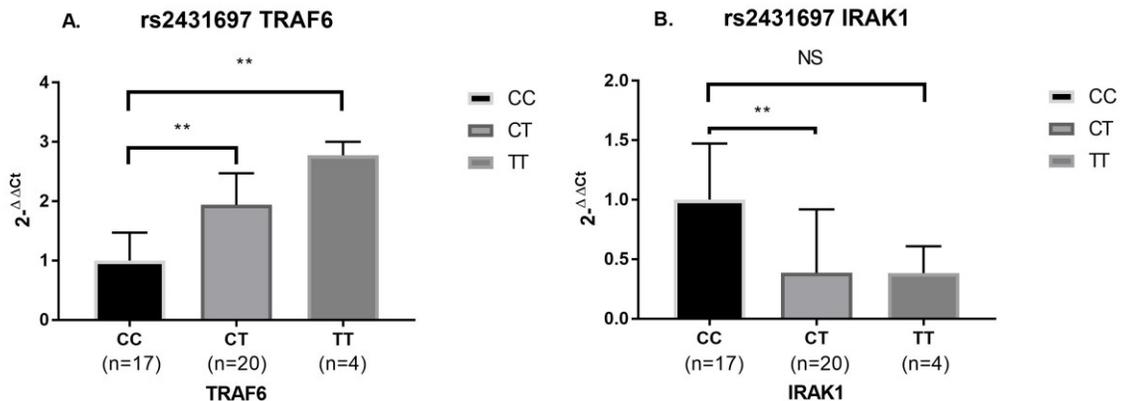


Figura 12. Efecto del polimorfismo rs2431697 sobre la regulación de de los ARNm TRAF6 e IRAK1. En la figura se muestra el efecto del SNP en la expresión de los ARNm de TRAF6 e IRAK1. En el gráfico **A** se muestra un aumento claro en la expresión de TRAF6 en los individuos que poseen al alelo T, siendo mayor la diferencia si son homocigotos para dicho alelo. Por otra parte en el gráfico **B** observamos una disminución en los niveles de IRAK1 en los individuos que presentan el alelo T, siendo parecidos los valores entre heterocigotos y homocigotos TT.

**= $p < 0.001$ *= $p < 0.05$ NS= No significativo.

Por otra parte, la expresión de TRAF6 se encuentra aumentada en los controles portadores del alelo T similar a lo ocurrido en la correlación para rs2910164, pero cabe resaltar que la correlación del SNP rs2431697 muestra que en individuos

heterocigotos la expresión de TRAF6 se encuentra aumentada a diferencia del rs2910164 en donde se observa un decremento. Aunado a esto los valores obtenidos del análisis estadístico nos indica que la diferencia entre los individuos GG es significativa con respecto a los otros dos grupos con valores de $p < 0.001$, incluyendo la comparación entre controles CT y CC, lo que implica un efecto aditivo a la presencia de un alelo o de dos.

VI. Discusión

El estudio de los miRSNPs localizados en el gen de *MIR-146a* brindan información relevante acerca de la susceptibilidad genética pero también acerca de una regulación diferencial de este SNP y sus ARNm blanco entre individuos con distintos genotipos. En este aspecto, el conocer más acerca del efecto de estos SNPs en la regulación de la respuesta inmune innata, puede ayudarnos a entender patologías como las autoinmunes. La determinación de los genotipos en la población de estudio develó que para el SNP rs2910164 las frecuencias genotípicas previamente identificadas son GG: 48%, GC: 40% y CC: 13%^[27] que se comparan con las obtenidas en este estudio, GG: 58%, GC: 37% y CC: 5%. Por otro lado, para el rs2431697 las frecuencias genotípicas que se reportaron previamente son CC: 27%, CT: 51% y TT: 22%^[44] vs las obtenidas de CC: 41%, CT: 49% y TT: 10% (Figuras 7 y 8). Como se observa en la genotipificación de nuestros individuos controles encontramos que las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas para ambos SNPs presentan una tendencia similar en la distribución de los alelos. Cabe señalar que las diferencias se deben al tamaño de la muestra que se genotipificó en este trabajo.

Con el fin de conocer el efecto que los miRSNPs rs2910164 y rs2431697 sobre la expresión y función del miRNA miR-146a, se realizó un estudio de correlación genotipo-expresión de miR-146a. Como se mencionó anteriormente, el rs2910164, al localizarse en la secuencia que forma parte del precursor de miR-146a, podría tener un efecto en el procesamiento de dicho intermediario para generar el miRNA maduro. Al realizar la correlación genotipo/expresión para el SNP rs2910164, se observó un efecto del alelo C ocasionando un aumento tanto en los niveles del

precursor como de la forma madura en los individuos portadores de dicho alelo, observándose una disminución de forma considerable en los individuos homocigotos para el genotipo CC. Un modelo previamente mencionado en otro estudio ^[27] nos indica que la presencia del SNP ocasiona inestabilidad en la estructura tallo-asa debido a la falta de complementariedad de bases (Figura 6), al generarse esta burbuja en la estructura puede impedir la correcta maduración del precursor debido a su posición y a su cercanía con el sitio de corte de Dicer para generar el miRNA maduro y con ello derivar en su degradación.

Por otra parte, el rs2431697 se localiza en la región promotora de *MIR-146a*, por lo que este SNP podría tener un efecto potencial en la transcripción de este. La correlación del SNP rs2431697 muestra una disminución en los niveles de todos los intermediarios de la maduración de miR-146a incluyendo a miR-3142 maduro en los individuos que poseen el alelo T, acentuándose en los homocigotos para dicho alelo (Figura 11). Esto concuerda con lo reportado en población europea por Lögfren ^[16], que muestra una disminución al igual en todos los estadios de maduración de miR-146a en su población control. Cierta tendencia también es mencionada en un estudio previo realizado en el laboratorio ^[44], sin embargo, los resultados obtenidos en dicho estudio muestran un aumento en la expresión de miR-146a, pero en población pediátrica con LES. Esto hace pensar en un mecanismo diferente de alteración en la expresión de miR-146a que predomina en individuos controles. Se han propuesto varios modelos referentes al posible mecanismo mediante el cual el SNP afecta la expresión, los que tienen mayor fuerza son indicativos que el SNP rs2431697 se encuentre en una región de sitio de unión para factores de transcripción, con ello afectando la interacción y unión con estos. Mediante el uso de bases de datos tal como son ENCODE y PROMO se ha encontrado que la región donde se encuentra este SNP es un sitio de unión a factores de transcripción como los son NF-KB, PAX5 y MAX, a su vez en este segmento se encontraron marcas epigenéticas como son H3K4me3 (trimetilación de la lisina 4 de la histona 3) que se encuentra enriquecida en la región, H3K4me1 (metilación de la lisina 4 en la histona 3), la cual es ausente en el sitio que se localiza el SNP, H2K27ac (acetilación de la lisina 27 en la histona 2), un sitio de

hipersensibilidad a DNAasa I y finalmente un posible enhancer en esta región ^{[16][44]}. Estos elementos nos permiten fundamentar la teoría que debido a la localización del SNP, este afecta directamente un sitio regulador de la transcripción de *MIR-146a* ocasionando alteraciones en su expresión, dado que el SNP altera la secuencia, este sitio enhancer puede ver alterada su interacción con factores de transcripción afines a él variando la unión con dichas proteínas y con ello afectando la transcripción de miR-146a, sin embargo, aun falta especificar cual es el mecanismo preciso por el cual actúa. En otro estudio se ha descrito el efecto de otro SNP cercano a los dos estudiados en el presente trabajo, el rs57095329 (A/G) (Figura 5). En este trabajo evalúan el efecto que puede tener el alelo G en la unión del factor de transcripción ETS-1, en el cual encuentran que pese a no ser total la falta de interacción con el factor, si altera la afinidad por él la presencia de dicho alelo y por ende volviendolo menos eficaz en la regulación de la expresión de miR-146a ^[33].

Sería conveniente realizar una metodología similiar aplicada al SNP rs2431697, para conocer más sobre su papel en la regulación de este importante miRNA.

Una vez analizado el efecto que pueden tener ambos SNPs en la expresión de miR-146a, se dispuso a elucidar el efecto que pueden tener sobre la función de éste mediante la realización de ensayos de expresión para dos ARNm blanco de miR-146a, IRAK1 y TRAF6.

La correlación genotipo expresión del SNP rs2910164 con TRAF6 (Figura10) muestra que los individuos homocigotos CC aumenta drásticamente la expresión, pese a la disminución no significativa en los controles heterocigotos, la tendencia al aumento en la expresión de TRAF6 coincide en otros estudios ^{[21][26][19]}, en los cuales se informa que la presencia del alelo C del SNP rs2910164 disminuye la expresión de miR-146a en individuos controles, afectando su función reguladora sobre sus ARNm blancos, entre ellos TRAF6, con lo cual aumentan los niveles de dicho mensajero. Por otra parte, la correlación de IRAK1 con rs2910164 muestra una tendencia al aumento en la expresión en los individuos heterocigotos, lo cual concuerda con la disminución de miR-146a para los mismos individuos, sin

embargo, en los homocigotos CC la expresión se encuentra en niveles muy bajos y las diferencias en los niveles no son significativas. En un estudio similar realizado para CAD, se encontró que la expresión de IRAK1 en los heterocigotos GC y en los homocigotos CC era menor que la expresión de los individuos GG, sin embargo, de las poblaciones con el alelo C la que presentó mayor expresión de IRAK1 fueron los homocigotos CC^[19]. Estas diferencias en los resultados pueden ser debidas a los tamaños de la población estudiada y a las diferentes poblaciones utilizadas.

A su vez, en la correlación realizada para el SNP rs2431697 con TRAF6 (Figura12) se encontró que la presencia del alelo T ocasiona un aumento en la expresión, siendo la expresión mayor en los controles con genotipo TT, lo cual concuerda con la disminución de miR-146a de la cual se habló anteriormente, añadiendo a esto están los valores de p que en todas las comparaciones de esta correlación fueron significativos.

Finalmente, la correlación genotipo expresión para IRAK1 nos muestra un resultado diferente al obtenido en TRAF6, donde se observa que los individuos con el alelo T disminuye la expresión de IRAK1, teniendo niveles similares entre los heterocigotos y los homocigotos a dicho alelo. Con respecto a este SNP no se habían realizado estudios de correlación con los mensajeros blanco de miR-146a, por ende una vía diferente a la establecida de sobreexpresión de los mensajeros por disminución de miR-146a no se ha planteado. El aumento de la población de estudio sería una manera de confirmar los resultados obtenidos y en dado caso intentar proponer una vía mediante la cual pese a la disminución de miR-146a, la regulación sobre IRAK1 se incrementa dando como resultado una disminución en sus niveles. Pese a esto partiendo de la premisa de que los niveles de expresión de TRAF6 aumentan y considerando la posibilidad de que también lo hagan otros blancos involucrados en la misma vía como son IRF5 y STAT1, las consecuencias sobre la respuesta inmune innata mediada por IFN-I serían a considerar. Al estar alterada esta vía en 3 puntos debido al incremento en los niveles de ARNm de TRAF6, IRF5 y STAT1, ocasionaría que haya mayor cantidad de estas proteínas, lo que ocasionaría a su vez un aumento en la respuesta inmune innata que pese a ser útil en la defensa

ante patógenos haciéndola más rápida y eficiente por la generación de un ambiente pro-inflamatorio en las que se generarían grandes cantidades de citocinas, interleucinas y otros compuestos como los son ROS (por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species) por el componente celular del sistema inmune. Sin embargo, una constante producción de IFN-I generaría una respuesta inmune constante, que incluye la activación de linfocitos B, generación de anticuerpos, activación de linfocitos citotóxicos y el mantenimiento de el estado proinflamatorio que al final aunado a lo anterior ocasionaría daño celular, provocando la apoptosis de células que fueron dañadas en este proceso que pese a ser un mecanismo homeostático, liberaría el contenido celular que terminará por generar antígenos propios y con el estado inflamatorio que se encuentra, tendría como consecuencia la generación de una autoinmunidad.

Este posible mecanismo por el cual se puede generar una autoinmunidad, debido a desregulación en la respuesta inmune ocasionada por una alteración en los niveles de algunos componentes implicados en la vía de IFN-I es de hacer notar, puesto que detalla la importancia de estos miRNA reguladores, como lo es miR-146a y su papel fundamental en la regulación de la expresión de estos mensajeros, que pese a no ser un factor de riesgo para estas enfermedades, si debe jugar un papel importante en la etiopatología de las enfermedades autoinmunes.

VII. Conclusiones

- En la muestra de individuos controles estudiada las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas de los SNPs rs2910164 y rs2431697 presentan una tendencia similar a las previamente reportadas en la población mexicana.
- Los individuos con el alelo menor C del SNP rs2910164 presentan una disminución en los niveles de miR-146a y su precursor, sugiriendo un efecto del SNP en el procesamiento del precursor y con ello alterando la producción del miRNA maduro.
- Los individuos portadores del alelo menor T del SNP rs2431697 muestran una disminución de todos los intermediarios en la maduración de miR-146a,

así como de miR-3142, probablemente ocasionado por una alteración en la función de la región enhancer en la que se encuentra este SNP.

- En la correlación genotipo-expresión de los SNPs rs2431697 y rs2910164 con TRAF6 se observa un aumento en la expresión de dicho mensajero en los individuos que portan los alelos menores de los SNPs, ocasionado posiblemente por la falta de regulación de miR-146a debido a sus bajos niveles de expresión en estos individuos.

VIII. Referencias

[1]

PK Singh, AV Singh, Current understanding on micro RNAs and its regulation in response to Mycobacterial infections, *Journal of Biomedical Science* (2013).

[2]

Y. Huang, X. Shen, Q. Zou, S. Wang, S. Tang, G. Zhang, Biological functions of microRNAs: a review, *J Physiol Biochem.* 67 (2011) 129–139.

[3]

H. Ellegren, N. Galtier, Determinants of genetic diversity., *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 422–33

[4]

K. Frazer, S. Murray, N. Schork, E. Topol, Human genetic variation and its contribution to complex traits, *Nat Rev Genet.* 10 (2009) 241–251.

[5]

Y. Nakamura, DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience, *J Hum Genet.* 54 (2009) 1–8.

[6]

K. Frazer, S. Murray, N. Schork, E. Topol, Human genetic variation and its contribution to complex traits, *Nat Rev Genet.* 10 (2009) 241–251.

[7]

M. Zhu, Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges, *Int J Biol Sci.* (2007) 420–427.

[8]

M Fareed, M Afzal, Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: a tool for broad spectrum service, *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* (2013)

[9]

J.N. Hirschhorn, K. Lohmueller, E. Byrne, K. Hirschhorn, A comprehensive review of genetic association studies., *Genet. Med.* 4 (2002) 45–61

[10]

R. Riley, M. Price, D. Jackson, M. Wardle, F. Gueyffier, J. Wang, et al., Multivariate meta-analysis using individual participant data, *Res Synthesis Methods.* 6 (2015) 157–174

[11]

W. Gu, J.R. Lupski, CNV and nervous system diseases – what's new?, *Cytogenet Genome Res.* 123 (2009) 54–64

[12]

V. Bansal, A. Bashir, V. Bafna, Evidence for large inversion polymorphisms in the human genome from HapMap data, *Biotechfor.* 17 (2007) 219–230.

[13]

R. Myerowitz, Tay-Sachs disease-causing mutations and neutral polymorphisms in the Hex A gene, *Hum Mutat.* 9 (1997) 195–208.

[14]

C. Hübner, I. Petermann, B. Browning, A. Shelling, L. Ferguson, Triallelic Single Nucleotide Polymorphisms and Genotyping Error in Genetic Epidemiology Studies: MDR1 (ABCB1) G2677/T/A as an Example, *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 16 (2007) 1185–1192

[15]

C. Phillips, J. Amigo, Á. Carracedo, M.V. Lareu, Tetra-allelic SNPs: Informative forensic markers compiled from public whole-genome sequence data, *Forensic Sci Int Genetics.* 19 (2015) 100–106.

[16]

S. Löfgren, J. Frostegård, L. Truedsson, B. Pons-Estel, S. D'Alfonso, T. Witte, et al., Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene, *Genes Immun.* 13 (2012) 268–274.

[17]

G. Wang, L.-S. Tam, B. Kwan, E. Li, K.-M. Chow, C. Luk, et al., Expression of miR-146a and miR-155 in the urinary sediment of systemic lupus erythematosus, *Clin Rheumatol.* 31 (2012) 435–440.

[18]

A. Soleimani, K. Ghanadi, Z. Noormohammadi, S. Irani, The correlation between miR-146a C/G polymorphism and UHRF1 gene expression level in gastric tumor, *J Dig Dis.* 17 (2016) 169–174.

[19]

P. Ramkaran, S. Khan, A. Phulukdaree, D. Moodley, A. Chuturgoon, miR-146a Polymorphism Influences Levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in Young Patients with Coronary Artery Disease, *Cell Biochem Biophys.* 68 (2014) 259–266.

[20]

J. Li, Y. Wan, Q. Guo, L. Zou, J. Zhang, Y. Fang, et al., Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+T cells from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther.* 12 (2010) 1–12.

[21]

P.-S. Hung, C.-J. Liu, C.-S. Chou, S.-Y. Kao, C.-C. Yang, K.-W. Chang, et al., miR-146a Enhances the Oncogenicity of Oral Carcinoma by Concomitant Targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB Genes, *Plos One.* 8 (2013) e79926.

[22]

H. Trinh, D. Pham, S.-C. Kim, R.-Y. Kim, H.-S. Park, S.-H. Kim, Association of the miR-196a2, miR-146a, and miR-499 Polymorphisms with Asthma Phenotypes in a Korean Population, *Mol Diagnosis Ther.* (2017) 1–8.

[23]

T. Oner, C. Arslan, G. Yenmis, B. Arapi, C. Tel, B. Aydemir, et al., Association of NFKB1A and microRNAs variations and the susceptibility to atherosclerosis, *J Genet.* 96 (2017) 251–259.

[24]

Y. Zeng, Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population, *World Journal of Gastroenterology.* 16 (2010) 3578.

[25]

H. Elsayed, W. Khater, A. Ibrahim, M. Hamdy, N. Morshedy, MicroRNA-146a expression as a potential biomarker for rheumatoid arthritis in Egypt, *Egypt J Medical Hum Genetics.* 18 (2017) 173–179.

[26]

Y. Zhu, Z. Xue, L. Di, Regulation of MiR-146a and TRAF6 in the Diagnose of Lupus Nephritis, *Medical Sci Monit Int Medical J Exp Clin Res.* 23 (2017) 2550–2557.

[27]

Tlatelpa, S. Asociación de polimorfismos de un solo nucleótido localizado en miR-146a en pacientes con lupus eritematoso sistémico pediátrico. Tesis (2015).

[28]

J. Ji, E. Cha, W. Lee, Association of miR-146a polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis, *Lupus.* 23 (2014) 1023–1030.

[29]

S. Jiménez-Morales, R. Gamboa-Becerra, V. Baca, B. Río-Navarro, D. López-Ley, R. Velázquez-Cruz, 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 (2012) 317–321.

[30]

R. Park, W. Lee, J. Ji, Association between the three functional miR-146a single-nucleotide polymorphisms, rs2910164, rs57095329, and rs2431697, and autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis, *Autoimmunity.* (2016) 1–8.

[31]

Y. Wang, X. Wang, Z. Li, L. Chen, L. Zhou, C. Li, et al., Two Single Nucleotide Polymorphisms (rs2431697 and rs2910164) of miR-146a Are Associated with Risk of Coronary Artery Disease, *Int J Env Res Pub He.* 14 (2017) 514.

[32]

Y. Sheng, J. Xu, Y. Wu, X. Zuo, J. Gao, Y. Lin, et al., Association analyses confirm five susceptibility loci for systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population, *Arthritis Res Ther.* 17 (2015) 1–7.

[33]

X. Luo, W. Yang, D.-Q. Ye, H. Cui, Y. Zhang, N. Hirankarn, et al., A Functional Variant in MicroRNA-146a Promoter Modulates Its Expression and Confers Disease Risk for Systemic Lupus Erythematosus, *Plos Genet.* 7 (2011) e1002128.

[34]

Z.-M. Tang, P. Wang, P.-P. Chang, T. Hasahya, H. Xing, J.-P. Wang, et al., Association between rs2431697 T allele on 5q33.3 and systemic lupus erythematosus: case-control study and meta-analysis, *Clin Rheumatol.* 34 (2015) 1893–1902.

[35]

M. Caratachea, Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones, *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 20 (2007) 213-221.

[36]

N. Mookherjee, H. El-Gabalawy, High degree of correlation between whole blood and PBMC expression levels of miR-155 and miR-146a in healthy controls and rheumatoid arthritis patients, *J Immunol Methods.* 400 (2013) 106–110.

[37]

T. Sato, X. Liu, A. Nelson, M. Nakanishi, N. Kanaji, X. Wang, et al., Reduced miR-146a Increases Prostaglandin E2 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Fibroblasts, *Am J Resp Crit Care.* 182 (2010) 1020–1029.

[38]

K. Pauley, C. Stewart, A. Gauna, L. Dupre, R. Kuklani, A. Chan, et al., Altered miR-146a expression in Sjögren's syndrome and its functional role in innate immunity, *Eur J Immunol.* 41 (2011) 2029–2039.

[39]

J. Denk, K. Boelmans, C. Siegismund, D. Lassner, S. Arlt, H. Jahn, MicroRNA Profiling of CSF Reveals Potential Biomarkers to Detect Alzheimer's Disease, *Plos One.* 10 (2015) e0126423.

[40]

J. Li, Y. Wan, Q. Guo, L. Zou, J. Zhang, Y. Fang, et al., Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+T cells from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Res Ther.* 12 (2010) 1–12.

[41]

C. Yue, M. Wang, B. Ding, W. Wang, S. Fu, D. Zhou, et al., Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population, *Gynecol Oncol.* 122 (2011) 33–37.

[42]

H. Chen, T. Hu, X. Zheng, M. Li, M. Luo, Y. Yao, et al., Association between miR-146a rs2910164 polymorphism and autoimmune diseases susceptibility: A meta-analysis, *Gene.* 521 (2013) 259–264.

[43]

X. Zhou, J. Zhu, H. Zhang, G. Zhou, Y. Huang, R. Liu, Is the microRNA-146a (rs2910164) polymorphism associated with rheumatoid arthritis? Association of microRNA-146a (rs2910164) polymorphism and rheumatoid arthritis could depend on gender, *Joint Bone Spine.* 82 (2015) 166–171.

[44]

Maldonado M. Correlación de la expresión de miR-146^a y el polimorfismo rs2431697 en pacientes con lupus eritematoso sistémico pediátrico. Tesis (2016)

[45]

S. Lin, R. Gregory, MicroRNA biogenesis pathways in cancer, *Nat Rev Cancer*. 15 (2015) 321–333

[46]

miRBase. <http://www.mirbase.org> (2017)

[47]

P.N. Rao, W. Li, L.E.L.M. Vissers, J.A. Veltman, R.A. Ophoff, Recurrent Inversion Events at 17q21.31 Microdeletion Locus Are Linked to the MAPT H2 Haplotype, *Cytogenet Genome Res*. 129 (2010) 275–279.

[48]

Windows. Prism version 7.03 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

[49]

T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-Like Receptor Signaling Pathways, *Frontiers Immunol*. 5 (2014) 461.