



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN
ESPECIALIDAD EN:

GENÉTICA MÉDICA

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE Hsa-miR-16 Y Hsa-miR-186 EN PLASMA DE
PACIENTES MEXICANOS CON DIAGNÓSTICO DE OSTEOARTRITIS DE RODILLA
DE BAJO GRADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE MÉDICO ESPECIALISTA EN:

GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

Matvey Sosa Arellano

ASESORES:

M. en C. Verónica M. Borgonio Cuadra

M. en C. Celia González Huerta

Dr. Antonio Miranda Duarte

PROFESOR TITULAR DEL CURSO:

Dra. Margarita Valdés Flores

MÉXICO, D. F.

Mayo 2013





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.

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL

DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQUETZAL HERNÁNDEZ LÓPEZ

SUBDIRECTORA DE POSTGRADO

Y EDUCACIÓN CONTÍNUA

DR. LUIS GÓMEZ VELÁZQUEZ

JEFE DE ENSEÑANZA MÉDICA

DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES

PROFESOR TITULAR

DR. ANTONIO MIRANDA DUARTE

ASESOR TITULAR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores por su tiempo y dedicación; a mi esposa, mi hermano y mis padres por el apoyo moral.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| Resumen | v |
| Marco teórico | 1 |
| • Generalidades de Osteoartritis | 1 |
| • Epidemiología | 1 |
| • Clasificación | 1 |
| • Diagnóstico de OA | 1 |
| • Fisiopatogenia de OA de rodilla | 3 |
| • Factores de riesgo | 5 |
| • MicroRNAs | 8 |
| • Generalidades | 8 |
| • Biogénesis de microRNA | 9 |
| • Mecanismo de silenciamiento transcripcional a cargo de los miRNA | 9 |
| • miRNA circulantes, sensores importantes en la patología de OA | 11 |
| Planteamiento del problema y justificación | 14 |
| • Pregunta de investigación | 14 |
| Hipótesis | 15 |
| Objetivos | 15 |
| • Objetivo general | 15 |
| • Objetivos particulares | 15 |
| Diagrama de flujo | 16 |
| Materiales y métodos | 17 |
| • Tipo de estudio | 17 |
| • Población | 17 |
| • Muestra y tamaño de la muestra | 17 |

| | |
|--|----|
| • Criterios de selección | 17 |
| • Definición de las variables | 18 |
| • Aspectos éticos | 18 |
| Metodología | 19 |
| • Monitoreo y validación de la presencia y el grado de expresión de microRNA presentes en plasma de sujetos con OA de bajo grado y sujetos control | 19 |
| • Separación del plasma de sujetos con OA y controles | 19 |
| • Extracción de RNA pequeños | 19 |
| • Cuantificación de RNA pequeños | 19 |
| • qRT-PCR | 19 |
| • Análisis estadístico | 20 |
| • Análisis in silico para la predicción de moléculas blanco de miR-16 y miR-186 | 21 |
| • Análisis con la plataforma miRecords | 21 |
| Resultados | 22 |
| • Los miRNA se encuentran de forma redundante en muestras de plasma en los pacientes con OA y los controles | 22 |
| • miR-16 y miR-186 se encuentran sobre-expresados en el plasma de los pacientes con OA | 22 |
| • miR-16 y miR-186 podrían regular moléculas involucradas en la fisiopatología de la OA | 22 |
| Discusión | 30 |
| • Presencia de los microRNAs en plasma | 30 |
| • Papel de la sobreexpresión de miR-16 y miR-186 en plasma de pacientes con OA de bajo grado | 30 |
| • Importancia de la predicción de blancos para los microRNA expresados en plasma | 32 |
| Conclusiones | 34 |
| Referencias | 35 |
| Anexos | 42 |

| | |
|--|----|
| • Anexo 1: Extracción de RNA pequeños mediante el uso del kit miRNeasy | 42 |
| • Anexo 2: cDNA de hsa-miR-16, hsa-miR-186 y U6 | 44 |
| • Anexo 3: Preamplificación de cDNA de hsa-miR-16, miR-186 y U6 | 45 |
| • Anexo 4: PCR Tiempo Real | 46 |
| • Anexo 5: Cuantificación de la concentración de Ácidos nucleicos | 47 |
| • Anexo 6: Análisis In silico | 48 |
| • Anexo 7: Validación de la eficacia del ensayo con sonda individual | 49 |
| • Anexo 8: Carta de consentimiento informado | 50 |

RESUMEN

Introducción: La Osteoartritis (OA) es la más frecuente de las enfermedades articulares y en su fisiopatología se encuentran involucrados distintos factores moleculares. Los microRNAs son moléculas de alrededor de 22 nucleótidos que regulan de forma negativa la expresión de distintos genes y se pueden encontrar expresados de forma estable en plasma de los individuos. La presencia y el papel que desempeñan estos pequeños microRNAs en el plasma de pacientes con OA no están bien dilucidados.

Objetivo: Valorar el nivel de expresión de miR-16 y miR-186 en el plasma de pacientes con OA primaria de rodilla, y saber si las moléculas que participan en la fisiopatología de la OA pueden ser blancos regulados por estos.

Resultados: Con la técnica RT-qPCR encontramos la sobreexpresión de miR-16 y miR-186 en el plasma de los pacientes con OA. También encontramos 37 probables blancos para miR-186 y 39 para miR-16 con el análisis *in silico*.

Conclusiones: La sobreexpresión de estos microRNA podría estar jugando un papel importante en la regulación de las vías fisiopatológicas de la enfermedad.

MARCO TEÓRICO:

Generalidades de Osteoartritis:

La Osteoartritis (OA) es la más común de las enfermedades articulares. Es un síndrome anatomoclínico caracterizado por dolor y que conduce progresivamente a una pérdida o disminución de la función articular. Se produce primariamente en articulaciones que soportan peso como la cadera y la rodilla, aunque puede afectar también la columna vertebral y pequeñas articulaciones de las extremidades (Hunter 2011).

Epidemiología:

La OA es más frecuente en el sexo femenino y su prevalencia aumenta con la edad; se ha demostrado que la prevalencia en adultos mayores de 45 años es de 19% y en adultos de 60 años o más es de 37% o incluso mayor (Michael 2010; Zhang 2010; Espinoza 2005). En México se calculó la prevalencia de las manifestaciones locomotrices en una población cercana a la ciudad de México reportando a la OA con un 2.3% (Espinoza 2005).

Clasificación:

La OA se ha clasificado históricamente como primaria y secundaria basados en el conocimiento o no de un mecanismo causal previo. Se considera OA primaria o idiopática cuando no se conoce un mecanismo causal directo y se sugiere que tiene un componente hereditario importante. La OA secundaria generalmente es atribuida a traumatismos, procesos mecánicos y quirúrgicos (Herrero-Beaumont et al., 2009).

Diagnóstico de OA:

El diagnóstico se realiza con datos clínicos y radiológicos. La OA se clasifica radiológicamente con la escala de Kellgren-Lawrence la cual da un panorama de afectación de la articulación basándose en el acortamiento en el espacio articular y la formación de osteofitos (Tabla 1) (Hart, 1991). Sin embargo, estos criterios no necesariamente se relacionan con los síntomas clínicos.

Tabla 1. Escala radiológica de OA (Kellgren-Lawrence 1957).

ESCALA DE KELLGREN/LAWRENCE

Ann Rheum Dis, 1957

Para cualquier articulación:

- 0 **No:** Ausencia de osteofitos, estrechamiento o quistes.
- 1 **Dudosa:** osteofitos sólo.
- 2 **Mínima:** osteofitos pequeños, estrechamiento de la interlínea moderado, puede haber quistes y esclerosis.
- 3 **Moderada:** osteofitos claros de tamaño moderado y estrechamiento de la interlínea.
- 4 **Severa:** osteofitos grandes y estrechamiento de la interlínea grave.

Fisiopatogenia de OA de rodilla:

La OA de rodilla se caracteriza principalmente por daño y deformación del complejo articular, más específicamente al cartílago articular (CA) y el hueso subcondral (HS) (Figura 1). El CA se encuentra conformado principalmente por condrocitos y por matriz extracelular (ME) distribuidos en capas. Debajo de este se encuentra el HS; una zona de hueso epifisiario debajo del cartílago articular, que incluye la placa de HS, hueso trabecular y hueso subarticular. Estos tejidos mantienen una constante comunicación y tienen la función conjunta de absorber las fuerzas mecánicas a las que se ve sometida la articulación (Goldring, 2010; Pritzker, 2006; Castañeda, 2012).

La ME es producida por los condrocitos y favorece la unión de los mismos; tiene la característica de ser tensa pero flexible, lo que permite una correcta distribución de las fuerzas mecánicas de impacto y a la vez conservar una forma adecuada para permitir la función articular. Está conformada por distintas proteínas entre las que destacan Colágenas tipo II, IX y XI, y proteoglicanos como el Agrecano. Además, se encuentra en un proceso de modelación y remodelación constante. Estos procesos son desarrollados por el condrocito al producir tanto las proteínas de ME, como Metaloproteinasas (MMPs), y la familia de Agrecanasas con Dominio de A Desintegrina y Metaloproteinasa con Motivos parecidos a Trombospondina (siglas en inglés, ADAMTS). Estos mecanismos son regulados por citocinas catabólicas y anabólicas (Hunter, 2011; Hashimoto, 2008; Goldring, 2010). El HS también se somete a procesos de modelación y remodelación para poder mantener la forma adecuada del complejo articular. Estos procesos son desarrollados por las células propias del hueso como osteoblastos y osteoclastos (Goldring, 2010; Castañeda, 2012).

La desregulación de las vías que controlan la homeostasis de la articulación conlleva al deterioro de la función de las células y tejidos involucrados; provoca cambios que van desde condromalacia o reblandecimiento del cartílago y HS, pérdida de la continuidad y erosiones, hasta la deformación de la morfología del complejo articular con la formación de osteofitos; provocando OA (Pritzker, 2006, Goldring, 2010).

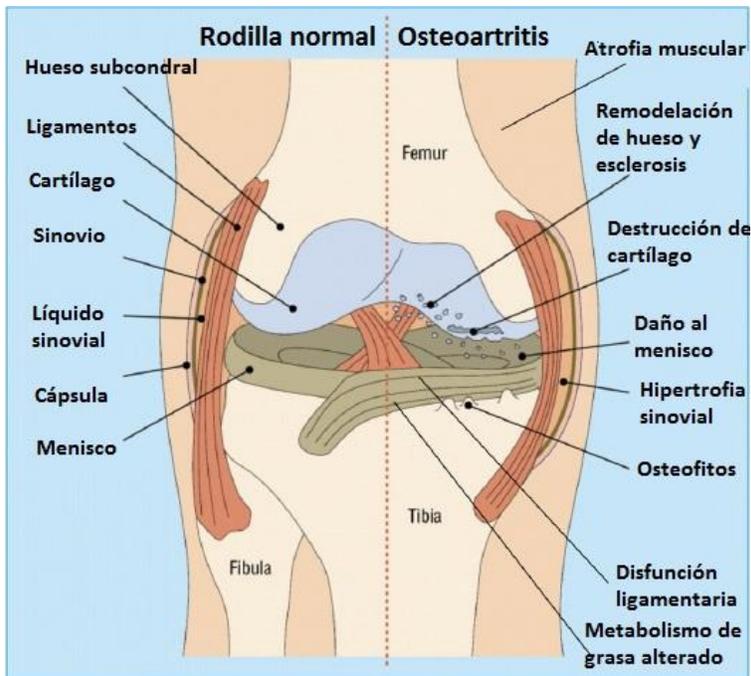


Figura 1. Daño a los distintos tejidos articulares en OA (Hunter, 2011).

Incluso, el condrocito con OA se caracteriza por un aumento en el número de células terminalmente diferenciadas e hipertrofia, así como alteraciones en la síntesis de ME y proliferación celular. Aumenta la expresión de metaloproteasas como MMP-1, -3, -9, -13, -14 y agrecanasas ADAMTS 4, 5, y 9, y disminuye la expresión de moléculas de la matriz extracelular (Figura 2) (Horton Jr. et al, 2006).

Factores de riesgo:

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de OA son los siguientes (Figura 3):

- A) Sexo femenino: La OA predomina en el sexo femenino después de los 50 años. Esto se relaciona con el inicio de la menopausia y con bajos niveles de estrógeno, ya que la sustitución hormonal también se asocia con una disminución en la prevalencia de los síntomas (Richette et al., 2003).
- B) Edad: El cartílago articular del adulto mayor desarrolla cambios como el aumento de la suavidad, fibrilación y fisuras en el mismo; así como, el denominado “fenotipo senescente” del condrocito: un condrocito incapaz de reaccionar de forma adecuada a las señales catabólicas y con una disminución en su tasa de proliferación celular y aumento de apoptosis (Horton, 2006; Hashimoto, 2008).
- C) Obesidad: Se relaciona con la OA por sus repercusiones sistémicas y proinflamatorias (Yusuf, 2012; Issa, 2012). Dentro de las principales moléculas estudiadas se encuentra la Leptina y la adiponectina quien ha demostrado su potencial uso como biomarcador de protección para el desarrollo de OA cuando se encuentra elevado (Massengale, 2012; Koskinen, et al, 2011).
- D) Genes: La manera en la que los genes determinan el desarrollo de la OA depende directamente del tipo y la función de los genes afectados. Se ha propuesto que los genes involucrados con la morfología de la matriz cartilaginosa pueden predecir una presentación juvenil o temprana de la OA; los genes

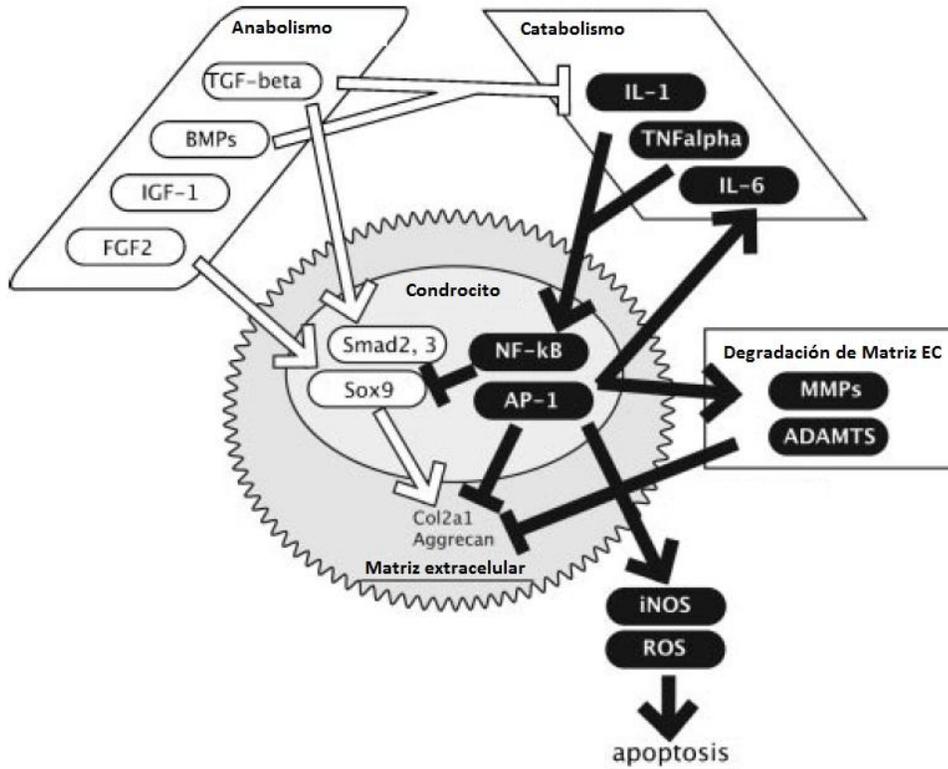


Figura 2. Vías anabólicas y catabólicas alteradas en el tejido articular en la OA. Las vías de modelación y remodelación mal reguladas conducen a una degradación descontrolada y una mala distribución de la matriz extracelular y la formación de osteofitos. La desregulación de las vías catabólicas favorece la apoptosis (Hashimoto 2008).

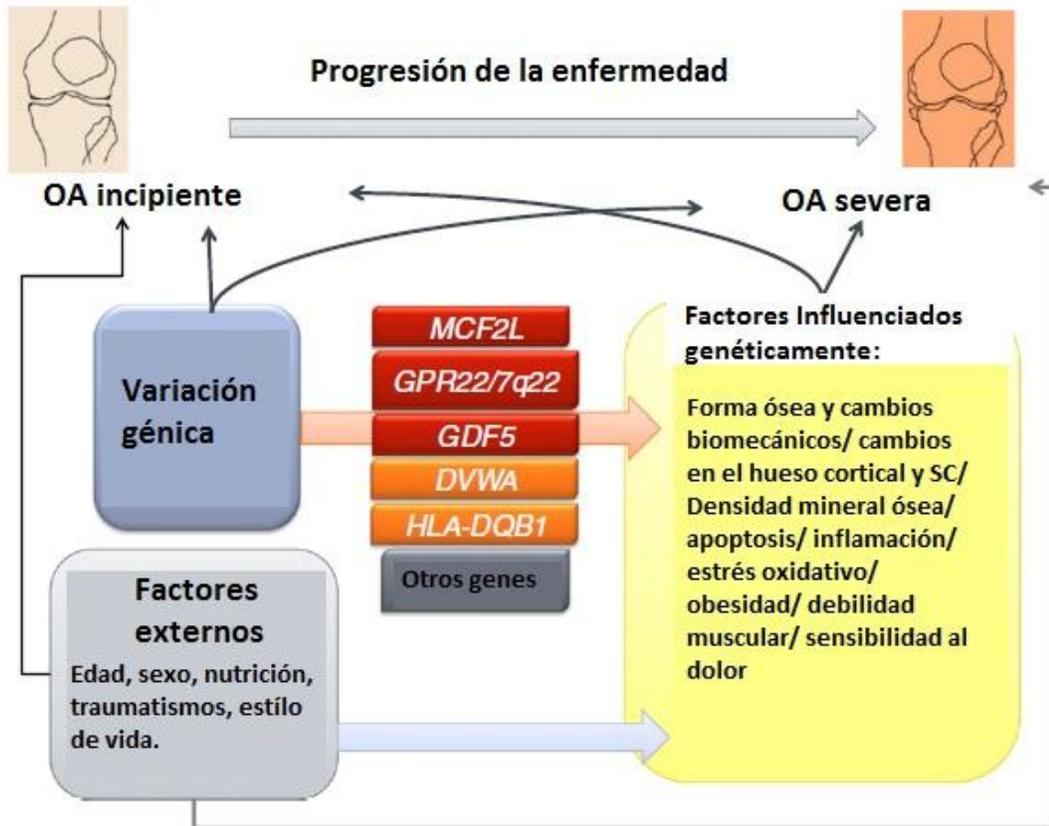


Figura 3.- Factores de riesgo para el desarrollo de OA. Los factores externos como edad, sexo, y estilo de vida favorecen, directamente o en conjunto con las variaciones génicas, tanto el desarrollo de OA incipiente como la progresión de su severidad, debido a que estos factores influyen directamente sobre la formación ósea, la inflamación del cartílago y la apoptosis del condrocito, entre otros factores (Chapman 2011).

involucrados con el desarrollo de la morfología articular pueden predecir una presentación de la OA más tardía; y los genes involucrados con la función de mantenimiento de la matriz extracelular del cartílago articular son los afectados en el desarrollo de la OA denominada primaria o del adulto mayor (Sandell, 2012; Galves-Rosas et al. 2010). También existen polimorfismos que han mostrado utilidad como marcadores de alto y bajo riesgo para el desarrollo de OA en genes como *CALCA* y *ERα* (Borgonio-Cuadra et al., 2012; Magaña et al., 2010). Otros genes actúan como represores de la expresión como los que codifican para RNA interferente como los que codifican para microRNA.

MicroRNA

Generalidades:

Los microRNA (miRNA, miR), junto con la modificación de histonas y la metilación de DNA, forman parte de los mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica. Estos mecanismos se caracterizan por modificar el genoma sin cambiar la secuencia de nucleótidos y están involucrados en los procesos fisiológicos de los individuos (Barter et al, 2012).

Los miRNA son pequeños RNA no codificantes importantes para el desarrollo larvario de *C. elegans* desde hace ya casi 2 décadas (Lee, et al., 1993; Reinhart, 2000). Tienen una longitud de alrededor de 22 nucleótidos en su forma madura y se expresan en las células y los tejidos de los organismos eucariontes regulando de manera postranscripcional la expresión de sus genes blanco. Se encuentran codificados en regiones intrónicas, o exónicas y también en secuencias intergénicas no codificantes de proteína; estas regiones pueden codificar para un solo miRNA o un grupo de ellos (Boyd, 2008). Actualmente se conocen 1100 microRNAs en humanos según la base de datos de www.microrna.org.

Biogénesis de los microRNA:

La biogénesis de la mayoría de los miRNA es llevada a cabo a través de la *vía canónica* (Winter et al, 2009; Kim, 2005), la cual involucra los siguientes pasos: En el núcleo celular se generan transcritos primarios (pri-miRNA) de hasta miles de pares de bases los cuales forman estructuras secundarias tallo asa. Estas estructuras secundarias son reconocidas por un complejo microprocesador que las sostiene a través de dominios de unión a doble cadena de RNA (dsRBD, siglas en inglés) de las proteínas DGCR8 y DROSHA, quien además tiene dos dominios RNasa tipo III en tándem con los que separa la estructura tallo-asa para formar pre-miRNAs de aproximadamente 80 pb (Kim, 2005). Las moléculas pre-miRNA son transportadas al citoplasma por un receptor de transporte nuclear llamado Exportina-5 (Yi et al., 2003). En el citoplasma el pre-miRNA es reconocido por DICER, quien con sus dos dominios RNasa tipo III corta el asa del tallo de doble cadena (Kim, 2005). De este dúplex de RNA, el Complejo de Silenciamiento mediado por Interferencia de RNA (RISC, siglas en inglés), seleccionará una cadena para que forme parte del complejo con ayuda de las proteínas Argonauta (Kwak et al., 2012). La otra cadena generalmente se degrada aunque también puede ser usada por el complejo RISC (Figura 4) (Winter, 2009).. Se han descrito otras rutas para la maduración de los miRNA conforme crece el número de investigaciones al respecto. Estas son dependientes o independientes del complejo microprocesador (DROSHA/DGCR8) o de DICER (Berezikov et al., 2007; Winter, 2009; Cheloufi et al., 2010). Sin embargo, Estas vías no están dilucidadas en su totalidad.

Mecanismo de silenciamiento transcripcional a cargo de los miRNA:

Como parte del complejo RISC, los miRNA son los encargados de reconocer al mRNA blanco que será regulado y lo logran a través de una porción de alrededor de 8 nucleótidos de su región 5' que identifica la región 3' no traducida de los mRNA blanco (Figura 4). También se ha sugerido que pueden identificar secuencias en la región 5' UTR y la región codificante de los mRNA blanco (Cannell et al., 2008; Rigoutsos, 2009; Zhou et al., 2009). Una vez adherido a su molécula blanco, puede inhibir su expresión de tres formas: a) declive del transcrito blanco previo al inicio de la

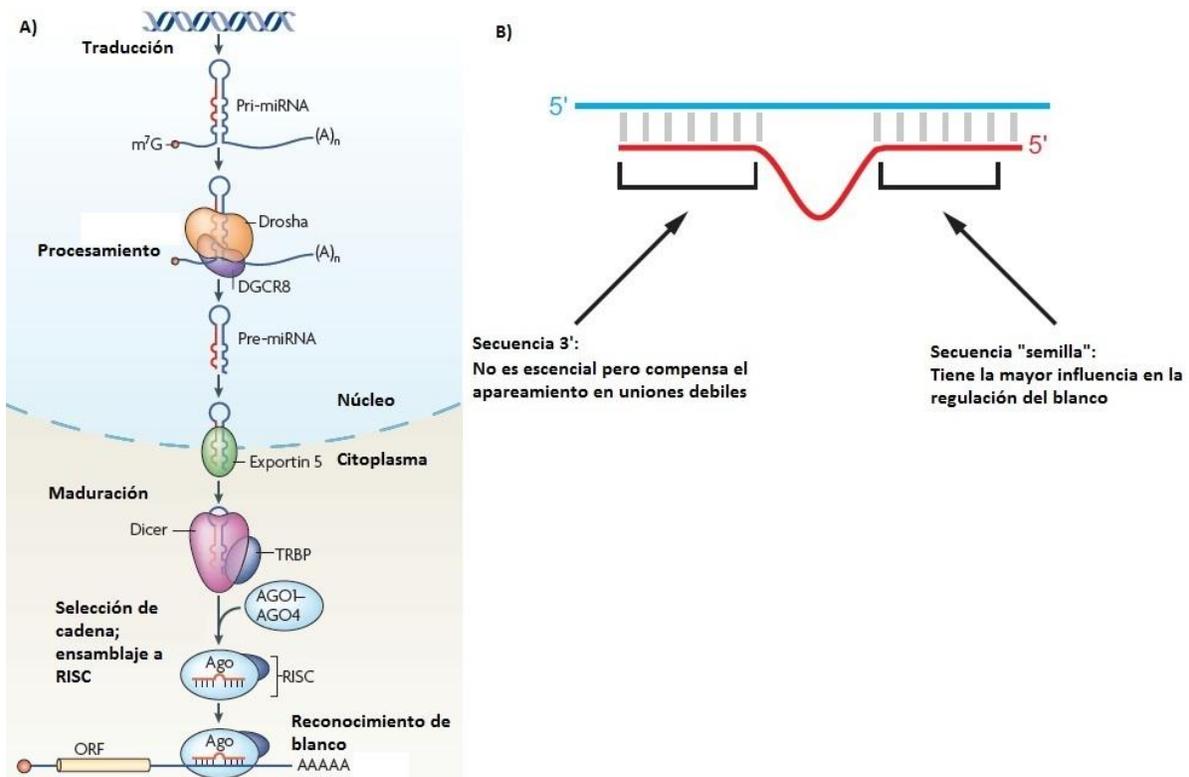


Figura 4.- Vía canónica de la biogénesis de microRNA y secuencia semilla. A) la biogénesis de los miRNA tiene tres pasos principales: la transcripción del pri-miRNA y el procesamiento de este en el núcleo para la formación de pre-miRNA de alrededor de 80 pb, y el proceso de maduración y ensamblaje al complejo RISC. B) alrededor de 8 nucleótidos de la región 5' del miRNA maduro se ensamblan casi en su perfección para el reconocimiento de su mRNA blanco. La secuencia en la región 3' favorece la estabilidad de la unión con el blanco en los casos donde la complementariedad con la secuencia "semilla" no es completa (Inui 2010; Chang 2007).

traducción; b) Inhibición del inicio de la traducción, o c) inhibiendo el proceso de elongación de la traducción (Canell et al., 2008; Jackson, 2007).

miRNA circulantes sensores importantes en la patología de OA:

Los miRNA no solo se localizan en células de los distintos tejidos del organismo, también se pueden encontrar distribuidos en fluidos corporales como orina, saliva, suero y plasma, entre otros (Weber et al, 2010; Cortez et al, 2009). Estos miRNA pueden encontrarse unidos a complejos proteicos o a exosomas (Hunter et al, 2008; Valadi et al, 2007). De forma experimental se ha demostrado en células dendríticas de ratón que estas moléculas podrían estar ejerciendo su función no solo en la célula que les da origen sino incluso en células vecinas regulando procesos de maduración celular (Montecalvo, 2012). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones de microRNA en plasma se han enfocado a demostrar su utilidad como biomarcadores ya que su perfil de expresión puede diferenciarse entre diversas patologías como el cáncer donde, por ejemplo, miR-205, miR-206, miR-335 muestra una expresión diferencial en Cáncer pulmonar; mientras que miR-485-5p, miR-361-3p, miR-326, miR-487b, lo hacen a su vez en cáncer colorrectal (Chen et al, 2008).

En OA se han analizado los perfiles de expresión de microRNA en condrocitos, encontrándose una expresión desregulada de al menos 23 miRNA: 11 con baja expresión y 12 sobre expresados (Tabla 2) (Iliopoulos, 2008; Jones, 2009). Un estudio donde se analizó el plasma y el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y con OA reportó la utilidad de miR-132 en plasma para distinguir entre los controles sanos y los pacientes con enfermedad articular, tanto RA como OA. Por otra parte, se observó que la expresión de miR-16 es menor en el plasma de pacientes con OA en comparación con el grupo control, además de ser útil para distinguir entre los dos tipos de artropatía en líquido sinovial (Murata et al., 2010).

Tabla 2. Expresión diferencial de miRNAs en cartílago con OA.

| |
|---|
| <p>MicroRNAs subexpresados: -25*, -26a, -27a&b, -29a, -140, -146a, -149, -210, -337, -373</p> <p>MicroRNAs sobreexpresados: -9, -16, -22, -23b, -25*, -30b, -98, -103, -223, -377, -483, -509</p> |
|---|

*miR-25 se reportó sobreexpresado por Jones mientras que Iliopoulos lo reportó subexpresado (Goldring 2011).

Así mismo, en nuestro laboratorio previamente se realizó un estudio piloto para analizar el perfil de expresión de miRNA en plasma de pacientes con OA de rodilla de bajo grado (datos no reportados). Se utilizaron placas de arreglos de miRNA para identificar 384 de estas moléculas y se identificó la expresión diferencial de 13 miRNA con la plataforma qPCR siendo los resultados más significativos para miR-16 y miR-186.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:

El perfil de expresión de miRNA en plasma de pacientes con OA no está bien dilucidado. Se ha reportado un estudio en el que miR-16 tiene un perfil de expresión diferencial en el plasma de pacientes con OA (Murata et al., 2010). Nuestro laboratorio realizó un estudio piloto en el cual miR-16 y miR-186 mostraron una expresión diferente a la reportada en la literatura, además de otros 11 miRNA que también mostraron una expresión diferencial, lo cual requiere validación. Tampoco se ha demostrado si estos microRNA tienen blancos potenciales entre las moléculas que participan en las vías fisiopatológicas que se involucran en el desarrollo de la enfermedad.

El estudio de miRNAs en plasma de pacientes con OA podría facilitarnos un método alternativo de pronóstico y diagnóstico de la enfermedad. Las ventajas de estudiar miRNAs de plasma nos provee un método no invasivo que podrían utilizarse como biomarcadores de la enfermedad. El conocer el perfil de expresión de miRNAs 16 y mir-186 en pacientes con OA nos dotará de información para decidir si es posible el empleo de estos como marcadores moleculares. No obstante el estudiar estas dos moléculas abre muchas posibilidades en el entendimiento de algunos mecanismos en donde RNAm son sus blanco.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existe un perfil de expresión diferencial para miR-16 y miR-186 en el plasma de los pacientes con OA de rodilla de bajo grado; y cuales moléculas involucradas en la enfermedad serían blanco potencial de estos miRNA?

HIPÓTESIS:

Existe un nivel de expresión diferencial para miR-16 y miR-186 en el plasma de los pacientes con OA de rodilla de bajo grado; y además, tienen blancos potenciales que están involucrados en la enfermedad.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Conocer el nivel de expresión de miR-16 y miR-186 en plasma de pacientes mexicanos con OA de rodilla de bajo grado, y analizar blancos potenciales para cada uno de ellos.

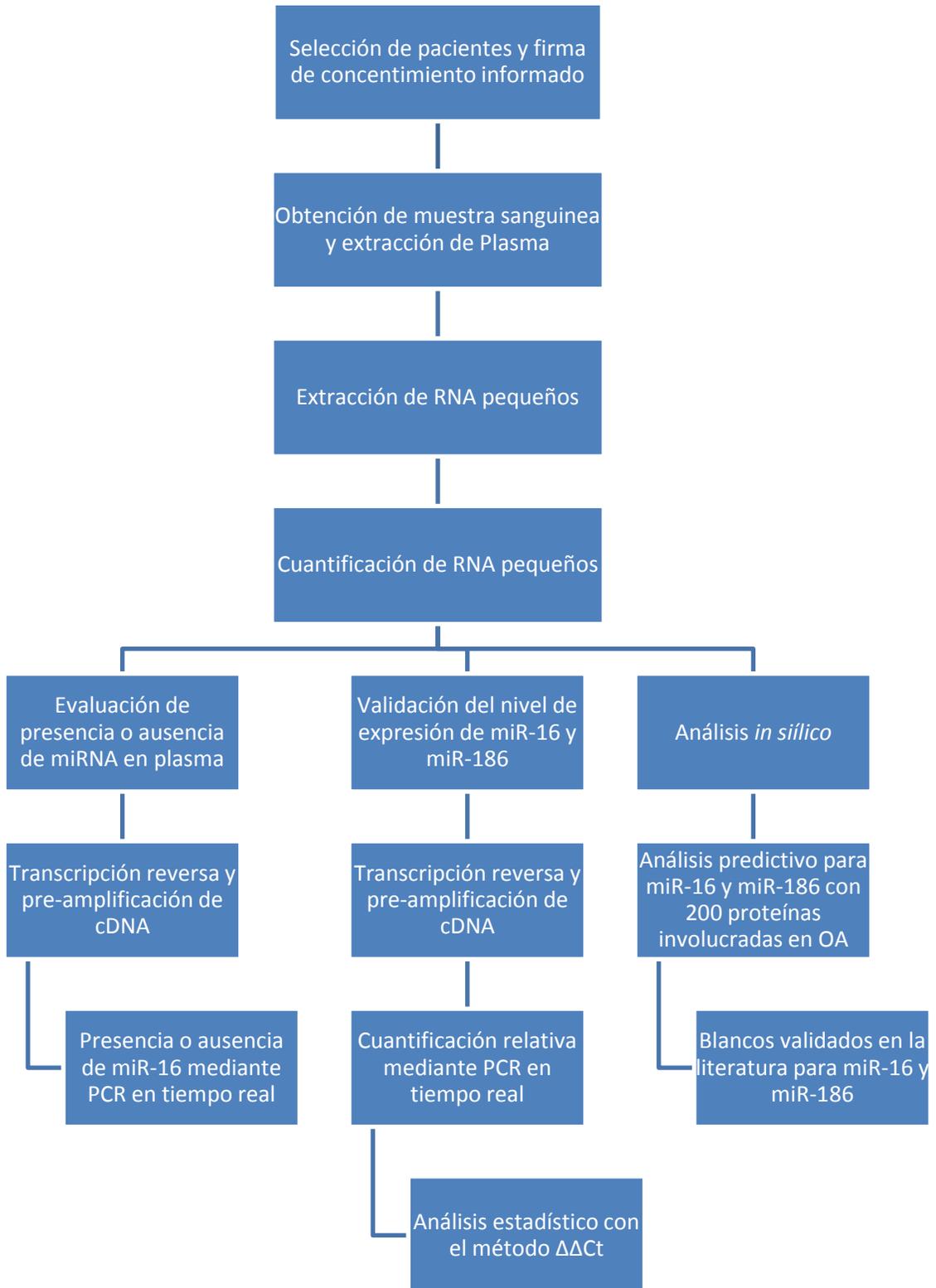
Objetivos particulares:

Evaluar la presencia de miRNAs en plasma de pacientes con OA de rodilla de bajo grado y controles.

Validar el nivel de expresión de miR-16 y miR-186 en pacientes con OA de rodilla de bajo grado y en controles.

Identificar mediante análisis *in silico* posibles genes blanco para miR-16 y miR-186 involucrados en OA.

DIAGRAMA DE FLUJO:



MATERIALES Y MÉTODOS:

Tipo de estudio: Estudio comparativo, observacional y transversal.

Población: Pacientes que acudan al Instituto Nacional de Rehabilitación con diagnóstico de OA de rodilla grado radiológico 2-3, y sujetos sin OA.

Muestra y tamaño de la muestra: Se estudió el plasma de pacientes con OA primaria de rodilla y controles. El cálculo de tamaño de muestra se realizó con la fórmula de comparación de medias considerando que el objetivo es comparar los niveles de expresión entre pacientes con OA primaria de rodilla y controles sin OA y estos se valoraron en escala cuantitativa continua (Chow 2008). El cálculo se realizó considerando los datos sobre miRNAs en plasma donde se valoraron para diferenciar OA y sujetos sanos (Murata 2010).

Concentración media de miR-132 en sanos: ~250 pmol/l

Concentración media de miR-132 en OA: ~50 pmol/l

Tamaño del efecto (Δ): ~200 pmol/l

Nivel de α : 0.05

Nivel de β : 0.80

N: 6 sujetos por grupo para una prueba de 2 colas.

Aun cuando 6 sujetos por grupo son suficientes para demostrar una diferencia, completamos una muestra de 27 individuos por grupo.

Criterios de selección:

Criterios de inclusión de Casos:

1. Pacientes mayores de 40 años de edad, de ambos sexos.
2. Diagnóstico de OA de rodilla establecido y confirmado en INR con estudio radiológico que demuestre un grado radiológico de Kellgren-Lawrence 2 y 3.

Criterios de exclusión de Casos:

1. Pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide u otra enfermedad reumatológica, cáncer, infarto agudo al miocardio, neurodegenerativas y renales.

Criterios de inclusión de Controles:

1. Pacientes con diagnóstico radiológico grado 0 en escala de Kellgren-Lawrence.

Criterios de exclusión de controles:

1. Pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide u otra enfermedad reumatológica, cáncer, infarto agudo al miocardio, neurodegenerativas y renales.

Definición de las variables:

Variable dependiente: OA de rodilla de bajo grado. Se considerará al diagnóstico radiológico de OA de rodilla grados 2 y 3 con escala de Kellgren-Lawrence.

Variable independiente: Nivel de expresión diferencial de miR-16 y miR-186. Se considerará en comparación con un gen control endógeno y un grupo control sano.

Aspectos éticos: Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de ética e Investigación. Aunque la toma de muestra sanguínea confiere un riesgo mínimo, para incluir a los casos y controles, siempre se procedió a entrevistarse con los pacientes para invitarlos a participar y sólo se incluyeron aquellos que otorgaron su consentimiento. Se explicó de forma sencilla y comprensiva la naturaleza del estudio y la necesidad de la toma de muestra sanguínea, sin ejercer ningún tipo de presión para convencerlos de su colaboración. Quienes aceptaron participar en el estudio firmaron una carta de consentimiento diseñada previamente (Anexo 8).

METODOLOGÍA:

Monitoreo y validación de la presencia y el grado de expresión de microRNA presentes en plasma de sujetos con OA de bajo grado y sujetos control.

Separación del plasma de sujetos con OA y controles: Se obtuvo alrededor de 5 ml de sangre periférica por punción venosa a 27 pacientes con de OA de rodilla de bajo grado y 27 individuos controles (Tabla 3). La muestra de sangre total se centrifugó a 3900 rpm, por 10 minutos, a 4 °C, para la obtención de plasma. Se almacenó la muestra obtenida a una temperatura de -80 °C hasta su uso.

Extracción de RNA pequeños: Se usó el kit miRNeasy (Qiagen. UK) que provee columnas con membrana de silica. El kit miRNeasy combina una mezcla de isotiosanato de guanidina y fenol para favorecer la lisis, inactivar RNAsas, remover DNA y proteínas del lisado, una vez que las muestras son homogenizadas con el reactivo de lisis Qiazol (fenol-isotiosanato) y posteriormente mezcladas con cloroformo, hay una separación de fases por centrifugación (acuosa y organica), la porción del RNA es la fase superio (fase acuosa) mientras que la interfase y porción inferior corresponde a DNA y proteínas (fase orgánica). La fase acuosa es recuperada y se le adiciona etanol para favorecer la unión de las moléculas de RNA a la silica, la muestra es entonces colocada en las columnas de membranas de silica, el RNA se une a la membrana y el fenol y otros contaminantes son removidos tras diversos buffers de lavado, finalmente el RNA es eluido en agua libre de nucleasas.

Cuantificación de RNA pequeños: El producto final se sometió a valoración con un espectrofotómetro (NanoDrop 2000) para determinar la concentración de RNA de cadena simple y descartar la posibilidad de contaminación con otras moléculas como DNA y Proteínas.

qRT-PCR: Los miRNAs purificados se utilizaron para llevar a cabo la amplificación in vitro de miR-16 y miR-186 en todos los individuos sanos y enfermos. Las muestras se sometieron a qRT-PCR, proceso que consiste en el empleo de una sonda taqman; esta

sonda es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicon, y en su extremo 5' presenta un fluorocromo (reportero) y en el extremo 3' un quencher (apagador) de tal forma que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda toda la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el apagador por lo que la fluorescencia global es igual a cero.

Dado que la sonda taqman tiene una T_m mayor que los primers, en la etapa de alineación, es la primera en unirse a su secuencia específica, antes que los primers; de esta forma, cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, al encontrarse con la sonda la degrada gracias a su actividad exonucleasa 5'-3' y de esta manera libera al reportero del apagador cuya fluorescencia emitida puede ser determinada por un sistema de detección de fluorescencia. Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada y esta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, este sistema permite visualizar el incremento del amplicón a lo largo de la reacción de PCR.

Análisis estadístico: Los niveles de expresión relativa se calcularon usando el método $\Delta\Delta Ct$. Comparamos la expresión de un gen de interés con la de un gen endógeno control, y este diferencial lo comparamos entre el grupo control y el grupo con OA (Schmittgen 2008; Livak 2001). El valor de Ct se determina con qPCR y se refiere al número de ciclos necesarios para que la fluorescencia liberada en cada amplificación cruce un límite determinado. Se usó al gen MammU6 como control endógeno debido a que su expresión mostró mayor estabilidad en todas las muestras. Para determinar la expresión diferencial de los miRNA estudiados entre las muestras con OA y los controles se realizó la prueba de t de Student. Solo los microRNA con un valor de P igual o menor a 0.05 y un factor de cambio de 2 o mayor se consideraron diferencialmente expresados. Todos estos análisis se realizaron con el Software R (HTqPCR, gplots) en la plataforma bioconductor.

Se realizó estadística descriptiva para determinar las diferencias entre las características individuales de los pacientes con OA y el grupo control con el test U de Mann-Withney para variables continuas y chi-cuadrada (χ^2) o el test exacto de Fisher para variables

categorías. El Software estadístico que usamos fué STATA 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

Análisis *in silico* para la predicción de moléculas blanco de miR-16 y miR-186.

Análisis con la plataforma miRecords: Para la predicción de genes blanco de miRNA los algoritmos normalmente usados consideran principalmente los parámetros de secuencia del transcrito y conservación de su complementariedad con la región “semilla” del miRNA de interés, y el perfil termodinámico del apareamiento. Sin embargo, existen otras plataformas que consideran otras características importantes como el contexto genómico en el cual se encuentran las secuencias blanco de los mRNA lo que influye en la formación de estructura tipo asas y la accesibilidad de la estructura secundaria con la secuencia “semilla” del miRNA (Brandenstein et al, 2012; Xiao F., 2009).

Usamos la plataforma miRecords (Xiao F., 2009; miRecords, mirecords.umn.edu) dado que esta plataforma utiliza los formatos de distintos algoritmos de predicción, tales como: DIANA-microT, Micro Inspector, miRanda, Mir Target2, miTarget, NB miRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNA hybrid y TargetScan/TargetScanS. Con esta herramienta analizamos las coincidencias de hsa-miR-16 y hsa-miR-186 con 200 moléculas y vías moleculares involucradas en la fisiopatología de la OA previamente reportadas en la literatura.

RESULTADOS:

Los miRNA se encuentran de forma redundante en muestras de plasma en los pacientes con OA y los controles.

Con el fin de conocer si en las muestras trabajadas contábamos con miRNA para posteriormente ser evaluado decidimos medir su presencia por qPCR. Además, simultáneamente evaluamos la eficiencia de la reacción de qPCR con miR 16 vs control endógeno U6 y miR-186 vs control endógeno U6.

El ensayo con sonda individual tipo taqMan mediante qPCR mostró la presencia de hsa-miR-16, hsa-miR-186 y U6 en todas de las muestras de plasma de los sujetos estudiados, esto nos indicó que el método de extracción de RNAs pequeños se llevó a cabo de manera eficiente. Tras evaluar el rango dinámico de detección para los 2 miRs con el gen endógeno normalizador observamos que para miR-16 fue posible detectar la cantidad mínima de hasta 80 pg con un valor CT (ciclo umbral) de 33.5 y para miR-186 detectamos pudimos detectar hasta 6.17 ng (Tabla 4).

miR-16 y miR-186 se encuentran sobre-expresados en el plasma de los pacientes con OA

El análisis delta delta Ct posterior a PCR en Tiempo Real con sondas individuales hsa-miR-16 y hsa-miR-186 mostró una sobre-expresión de ambos miRNA en el plasma de los pacientes con OA en comparación con los controles sanos, con una tasa de cambio de 3.3 y 4.4 respectivamente. Al realizar el análisis estadístico se demostró que los valores fueron significativos tanto para miR-16 como para miR-186 (Tabla 5, figura 5).

miR-16 y miR-186 podrían regular moléculas involucradas en la fisiopatología de la OA.

El análisis bioinformático con la plataforma miRecords predijo 37 moléculas blanco para miR-16 de las cuales 4 ya han sido corroboradas de forma experimental, mientras que para miR-186 arrojó 39 probables blancos de los cuales ninguno ha sido demostrado

Tabla 3.- Características clínicas de ambos grupos estudiados.

| | Grupos | | |
|---|--------------------|-----------------------|------|
| | OA (n = 27) | Controles (n = 27) | P |
| Femenino (n, %) | 24 (88.9) | 22 (81.5) | 0.4 |
| Edad [media (Min – Max), años] | 55.6 (38.6 – 66.6) | 52.9 (40.9 – 71.2) | 0.5 |
| IMC [media (Min – Max), kg/m ²] | 27.7 (19.9 – 35.9) | 25.5 (18.3 – 33.5) | 0.01 |
| DM (n, %) | 5 (19.2) | 2 (7.4) | 0.2 |
| HTA (n, %) | 11 (42.3) | 5 (18.5) | 0.06 |
| Actividad ocupacional actual (n %) | 3 (12.0) | 1 (3.7) | 0.3 |
| Actividad ocupacional previa (n %) | 3 (11.5) | 3 (11.1) | 0.9 |
| Actividad deportiva actual (n %) | 6 (23.1) | 4 (14.8) | 0.4 |
| Actividad deportiva previa (n %) | 15 (57.7) | 22 (81.5) | 0.6 |
| Clasificación de Kellgren-Lawrence | | | |
| 0 (n, %) | | 27 (100.0) | |
| 2 (n, %) | 14 (51.8) | | |
| 3 (n, %) | 13 (48.1) | | |

Tabla 4.- Presencia y rango dinámico de miR-16 y miR-186 en muestras de plasma.

miR-16

| Concentración | Valor Ct miR-16 | Valor Ct U6 |
|---------------|-----------------|-------------|
| 50 ng | 22.79 | 26.27 |
| 10 ng | 25.07 | 28.93 |
| 2 ng | 27.86 | 31.6 |
| 0.4 ng | 30.41 | 33.93 |
| 0.08 ng | 33.5 | 36.17 |

miR-186

| Concentración | Valor Ct miR-186 | Valor Ct U6 |
|---------------|------------------|-------------|
| 500 ng | 26.07 | 23.92 |
| 166 ng | 27.69 | 25.91 |
| 55.55 ng | 29 | 27.58 |
| 18.51 ng | 30.4 | 29.23 |
| 6.17 ng | 32.19 | 30.92 |

experimentalmente. Los blancos predichos participan en distintas vías de la fisiología articular como: mantenimiento y modulación del condrocito y el osteocito, inflamación, respuesta inmune, proteasas, moléculas de matriz extracelular, y otras vías de señalización celular (Figura 6, tabla 6). Los blancos predichos cuya regulación por miR-16 ha sido previamente demostrada experimentalmente son VEGFA, IGFR1, TNF-alfa e IL5.

Tabla 5.- Expresión diferencial de miR-16 y miR-186.

| miRNAs | Valor de p | logFC |
|---------|------------|-------|
| miR-16 | 0.05 | 3.36 |
| miR-186 | 0.02 | 4.44 |

LogFC: veces de cambio. P significativo = $p < 0.05$

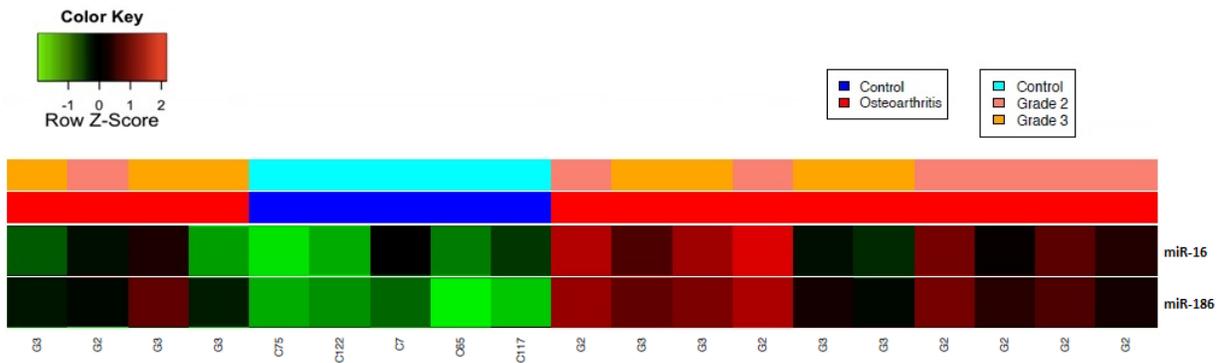


Figura 5. Diagrama de calor de la expresión de miR-16 y miR-186 en plasma de pacientes con OA y controles. Verde: expresión disminuida; Negro: sin cambio; Rojo: Expresión aumentada.

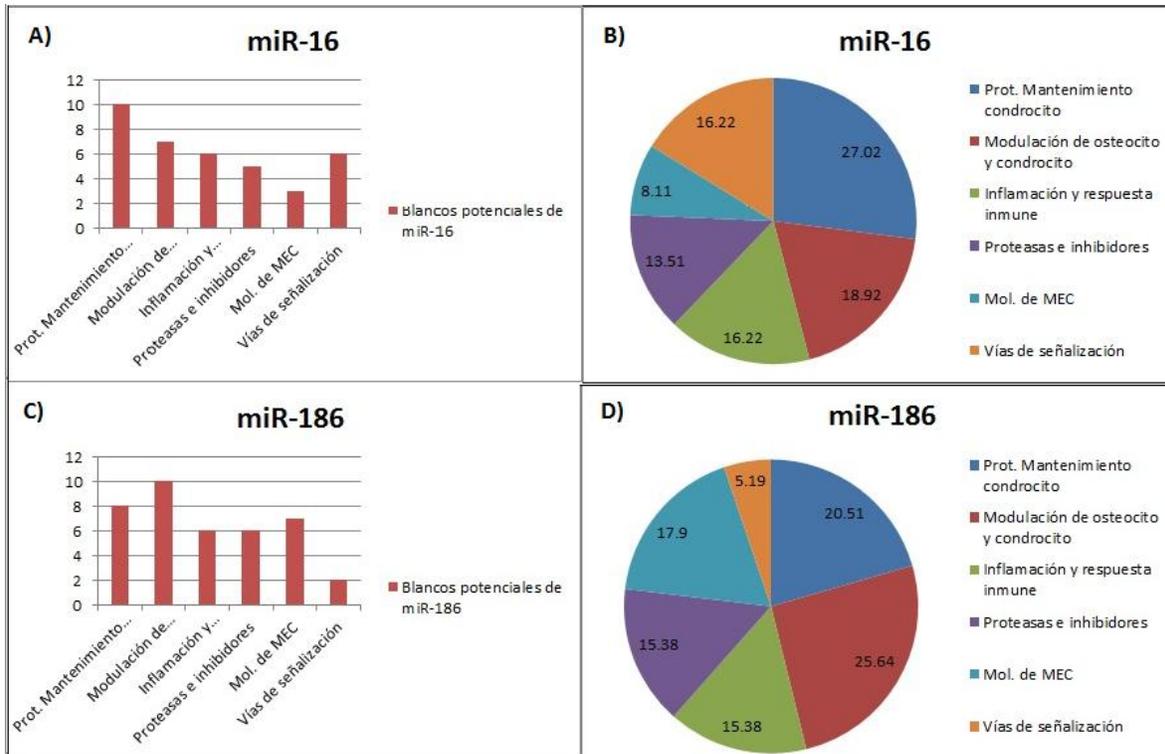


Figura 6.- Genes blanco predichos a través del análisis bioinformático con miRecords. A y B, número y porcentaje de blancos predichos miR-16. C y D, número y porcentaje de blancos predichos miR-186.

Tabla 6.- Genes posiblemente regulados por miR-16 y miR-186 utilizando la plataforma miRecords.

| Blanco | mir-186 | miR-16 | |
|----------|---------|--------|---|
| CDH11 | 0 | 1 | CADHERIN 11 |
| CYP19A1 | 1 | 0 | CYTOCHROME P450, FAMILY 19, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1 |
| FGF2 | 1 | 1 | FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 |
| FGF23 | 0 | 1 | FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 |
| FGF7 | 1 | 1 | FIBROBLAST GROWTH FACTOR 7 |
| FGF8 | 0 | 1 | FIBROBLAST GROWTH FACTOR 8 |
| FGFR1 | 1 | 1 | FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 1 |
| FGFR3 | 1 | 1 | FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 3 |
| HIF1A | 1 | 0 | HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1, ALPHA SUBUNIT |
| SCN9A | 1 | 0 | SODIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, TYPE IX, ALPHA SUBUNIT |
| VEGFA | 1 | 1 | VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A |
| HDAC4 | 0 | 1 | HISTONE DEACETYLASE 4 |
| MICAL3 | 0 | 1 | MICROTUBULE-ASSOCIATED MONOOXYGENASE, CALPONIN AND LIM DOMAINS-CONTAINING, 3 |
| CA2 | 0 | 1 | CARBONIC ANHYDRASE II |
| ESR1 | 1 | 1 | ESTROGEN RECEPTOR 1 |
| GPNMB | 1 | 0 | GLYCOPROTEIN NMB |
| GREM1 | 1 | 0 | GREMLIN 1 HOMOLOG, CYSTINE KNOT SUPERFAMILY |
| IGF1R | 0 | 1 | INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I RECEPTOR |
| IGFBP5 | 1 | 0 | INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-BINDING PROTEIN 5 |
| PTH1H | 0 | 1 | PARATHYROID HORMONE-LIKE HORMONE |
| RHOB | 1 | 0 | RAS HOMOLOG GENE FAMILY, MEMBER B |
| SOX5 | 0 | 1 | SRY-BOX 5 |
| SOX6 | 1 | 0 | SRY-BOX 6 |
| SOX9 | 1 | 1 | SRY-BOX 9 |
| SIRT1 | 1 | 1 | SIRТУIN 1 |
| BMPRI1A | 1 | 0 | BONE MORPHOGENETIC PROTEIN RECEPTOR, TYPE IA |
| BMPRI2 | 1 | 0 | BONE MORPHOGENETIC PROTEIN RECEPTOR, TYPE II |
| BCAP29 | 1 | 1 | B cell receptor-associated protein 29 |
| CCL22 | 1 | 0 | CHEMOKINE, CC MOTIF, LIGAND 22 |
| CRP | 0 | 1 | C-REACTIVE PROTEIN, PENTRAXIN-RELATED |
| FLT1 | 1 | 0 | FMS-RELATED TYROSINE KINASE 1 |
| IL15 | 0 | 1 | INTERLEUKIN 15 |
| IL16 | 1 | 0 | INTERLEUKIN 16 |
| IL1R1 | 1 | 1 | INTERLEUKIN 1 RECEPTOR, TYPE I |
| IL2 | 1 | 0 | INTERLEUKIN 2 |
| IL6R | 0 | 1 | INTERLEUKIN 6 RECEPTOR |
| PTGS2 | 0 | 1 | PROSTAGLANDIN-ENDOPEROXIDE SYNTHASE 2 |
| ADAM10 | 1 | 0 | A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN 10 |
| ADAM12 | 1 | 1 | A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN 12 |
| ADAM8 | 1 | 0 | A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE DOMAIN 8 |
| ADAMTS16 | 1 | 0 | A DISINTEGRIN-LIKE AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN TYPE 1 MOTIF, 16 |
| ADAMTS3 | 0 | 1 | A DISINTEGRIN-LIKE AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN TYPE 1 MOTIF,3 |
| ADAMTS5 | 1 | 1 | A DISINTEGRIN-LIKE AND METALLOPROTEINASE WITH THROMBOSPONDIN TYPE 1 MOTIF,5 |
| MMP3 | 0 | 1 | MATRIX METALLOPROTEINASE 3 |
| TIMP2 | 1 | 1 | TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 2 |

| | | | |
|---------|---|---|--|
| CHAD | 0 | 1 | CHONDROADHERIN |
| OLP | 1 | 0 | CARTILAGE INTERMEDIATE LAYER PROTEIN |
| COL13A1 | 1 | 0 | COLLAGEN, TYPE XIII, ALPHA-1 |
| COL15A1 | 0 | 1 | COLLAGEN, TYPE XV, ALPHA-1 |
| COL1A2 | 1 | 0 | COLLAGEN, TYPE I, ALPHA-2 |
| COL3A1 | 1 | 0 | COLLAGEN, TYPE III, ALPHA-2 |
| HAPLN1 | 1 | 0 | HYALURONAN AND PROTEOGLYCAN LINK PROTEIN 1/CARTILAGE LINK PROTEIN; CRTL1 |
| LRCH1 | 1 | 1 | LEUCINE-RICH REPEATS AND CALPONIN HOMOLOGY DOMAIN-CONTAINING 1 |
| MATN3 | 1 | 0 | MATRILIN 3 |
| CALM1 | 1 | 1 | CALMODULIN 1 |
| FRZB | 0 | 1 | FRIZZLED-RELATED PROTEIN |
| IHH | 0 | 1 | INDIAN HEDGEHOG |
| SMAD3 | 0 | 1 | MOTHERS AGAINST DECAPENTAPLEGIC, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 3 |
| WISP1 | 1 | 1 | WNT1-INDUCIBLE SIGNALING PATHWAY PROTEIN 1 |
| WNT5B | 0 | 1 | WINGLESS-TYPE MMTV INTEGRATION SITE FAMILY, MEMBER 5B |

Casilla gris o 1 = predicho. Clave: Púrpura-mantenimiento del condrocito, morado-modulación de condrocito y osteocito, naranja-Inflamación, marrón-proteasas e inhibidores, azul-Matriz Extracelular, amarillo-vías de señalización. Continúa en la siguiente página.

DISCUSIÓN:

Presencia de los microRNAs en plasma.

Se estudió el nivel de expresión de miR-16 y miR-186 en plasma de pacientes con OA y en controles sanos y se corroboró la presencia y reproducibilidad en la obtención de miRNA en plasma posterior a RT-PCR en tiempo real donde se detectaron cantidades de miRNA tan mínimas de hasta 80 pg, de manera consistente. Esto ya ha sido demostrado en varios estudios (Mitchell et al, 2008; Hu et al, 2010; Huang et al, 2010; Murata et al. 2010), e incluso se ha demostrado que la disminución en la concentración de miRNA ocurre de forma ligera cuanto más se exponga la muestra a cambios en la temperatura que cambien su estado físico (Murata et al. 2010). Esta característica de los miRNA es lo que los ha puesto en la mira de los investigadores por su potencial uso como biomarcadores en distintas patologías.

Papel de la sobreexpresión de miR-16 y miR-186 en plasma de pacientes con OA de bajo grado.

El análisis $\Delta\Delta Ct$, posterior al ensayo de qPCR con sonda individual para hsa-miR-16 demostró su sobre-expresión en el plasma de los pacientes con OA en comparación con el grupo control. Esto es diferente a lo reportado por Murata et al., para miR-16 quienes lo encontraron sub-expresado y además permitió diferenciar al grupo de OA con el grupo de Artritis reumatoide (AR) y el grupo control (Murata et al, 2010). Sin embargo, debemos considerar que el presente estudio se realizó en pacientes con OA de bajo grado, 14 sujetos grado II de KL y 13 grado III, mientras que el equipo de Murata estudió 11 pacientes grado III y 21 pacientes grado IV. Esto sugiere que el nivel de expresión de miR-16 en plasma cambia con respecto a la etapa de la enfermedad, lo cual podría explicarse de la siguiente manera: Se ha sugerido que los miRNA circulantes libres de células pueden ser resultado de la destrucción tisular secundaria a lesión directa, inflamación crónica, apoptosis, necrosis o bien modulada por procesos propios de células tanto sanguíneas como de los distintos tejidos del organismo que los liberan dentro de nanovesículas y

complejos miRNA-proteína. Iliopoulos y colaboradores previamente reportaron un aumento de la expresión de miR-16 en condrocitos de pacientes, en su mayoría grados III y IV (Iliopoulos et al, 2009); si se toma en cuenta que miR-16 es un regulador directo de la expresión de moléculas pro-inflamatorias, como TNF- α (Jing et al., 2005), se podría considerar el aumento de su expresión en el condrocito con OA como un mecanismo de defensa ante la respuesta inflamatoria excesiva que existe en el tejido cartilaginoso en todas las etapas de OA. Es por eso que en etapas tempranas donde los condrocitos no se han visto disminuidos considerablemente en número por el daño articular podría resultaren un aumento en la secreción de miRNA hacia el espacio articular y al plasma, mientras que en etapas tardías, en las cuales se ve reducido el cartílago articular de forma importante, se presenta una disminución en la cantidad de estos miRNA. Otra posibilidad es que el origen de la expresión de miR-16 en plasma podría ser de otro tipo celular y estar ejerciendo su función “a distancia”; sin embargo, aun considerando que los niveles de expresión de otros miRNA cambian con respecto a las etapas de la enfermedad, como es el caso de miR-146 y miR-223 en células mononucleares circulantes en sangre periférica (Okuhara et al., 2012), es difícil determinar el grado de contribución de células de otros tejidos, ya que estas no son las únicas células encargadas de su secreción (Murata et al., 2010).

Aunque no existen por el momento ensayos funcionales del papel de miR-16 en OA existe evidencia de la regulación que ejerce miR-16 en los genes VGFA y su receptor VEGFR2, en consecuencia, se podría especular el papel de este miRNA en eventos como la vascularización anómala del tejido articular al regular la expresión de estos factores de crecimiento (Caporali y Emanuelli, 2011; Chamorro-Jorganes et al, 2011), así mismo, su papel en el ciclo celular, la diferenciación del condrocito y del resto de las células que conforman los tejidos articulares al regular directamente a ciclinas que involucran el paso de fase G0/G1 y/o factores de crecimiento y sus receptores como FGFR1 (Linsley et al, 2007; Liu et al, 2008; Chamorro-Jorganes et al, 2011).

miR-186 es un microRNA al que se le han adjudicado funciones tumor-supresor y antiapoptóticas al participar en la regulación de vías de proliferación y envejecimiento

celular inhibiendo directamente a moléculas como CKII y factores proapoptóticos como P2X7 en células tumorales y premalignas (Goepfert et al, 2010; Kim et al, 2012; Zhou et al, 2008; Cai J. et al, 2013). En nuestro estudio, miR-186 presentó sobre-expresión en el plasma de los pacientes con OA, pero en este momento el papel que podría desempeñar sobre las células que conforman los tejidos del complejo articular es difícil de dilucidar al no existir evidencia de su presencia en estas células. Sin embargo, su expresión en células mesenquimatosas de tejidos como el tejido adiposo abdominal, facial y de mama sugiere que podrían desarrollar un papel importante en otras formas de tejido conectivo diferenciado como hueso, tendones o cartílago (Wang et al, 2010).

Importancia de la predicción de blancos para los microRNA expresados en plasma.

Los estudios recientes sobre los microRNA libres en plasma no consideran su función como posibles biomarcadores y se han enfocado a encontrar una función similar a las hormonas que pudiera explicar su desempeño como un tipo de Transferencia Génica Horizontal (Redis et al, 2012). Existe diversa evidencia del papel que juegan los microRNA contenidos en exosomas en la comunicación célula-célula en el microambiente tumoral, en los procesos inmunológicos e incluso fisiológicos. Por ejemplo, Yang y colaboradores demuestran que los macrófagos regulan la invasividad de las células tumorales de mama a través de miRNA oncogénicos (principalmente miR-223) mediados por exosomas a través de una vía miR-223/Mef2c/Beta-Catenina (Yang et al, 2011). Así mismo, Kosaka, Igushi y colaboradores demuestran que la expresión de miR-146 vía transferencia intercelular conlleva a la inhibición del crecimiento celular en células PC-3M (Kosaka et al., 2010). También existe evidencia de que esta transferencia intercelular puede ser regulada de forma antígeno-dependiente unidireccional, y no de forma aleatoria durante las sinapsis inmunológicas. Lo anterior se demostró en células CD63 donde la inhibición de nSMase2 impide la transferencia de miRNAs hacia las células presentadoras de antígeno (Mittelbrunn et al., 2011). Por otra parte, Montecalvo y sus colaboradores demostraron en células dendríticas murinas, que la liberación de exosomas con distintos perfiles de miRNA dependen de la etapa de maduración de las mismas (Montecalvo et al., 2012). Es importante considerar los resultados del análisis *in silico*, el cual sugirió que 39 moléculas

involucradas en distintas vías de regulación de la función articular son potenciales blancos de regulación de miR-186. Esas moléculas participan principalmente en el mantenimiento y la modulación tanto del condrocito como del osteocito; ambas células son primordiales y sensibles para el mantenimiento de su homeostasis y actividad funcional. Además de las 37 moléculas blanco predichas para miR-16 las cuales principalmente participan también en las actividades de mantenimiento del condrocito y el osteocito. La diferencia principal en cuanto a las vías que regulan ambos miRNA (en el análisis in silico) es que miR-16 regula más moléculas involucradas en vías de señalización, y miR-186 regula un mayor número de proteínas de la ME. Si estos miRNA expresados en plasma ejercen realmente una función “a distancia” de su célula de origen y esta está involucrada en las vías fisiopatológicas de OA es aún un misterio. Sin embargo, también existe la posibilidad de que la presencia de estos miRNA en plasma no sea a través de exosomas sino de otras moléculas o incluso un reflejo directo de la destrucción celular a la que se ve sometido el tejido articular con inflamación crónica y no ejerzan realmente una función en otras células o tejidos, dentro o fuera de la articulación.

CONCLUSIONES:

Existen microRNA en plasma y es medible a través de un ensayo con sonda individual y el uso de PCR en tiempo real.

miR-16 y miR-186 se encuentran sobreexpresados en el plasma de los pacientes con OA de bajo grado en comparación con el grupo control.

Tanto miR-16 como miR-186 podrían estar regulando de forma directa distintas moléculas involucradas en la fisiopatología de la OA.

MiR-16 regula, al menos, 4 genes que pueden ser de relevancia en la fisiopatología de la OA.

Los perfiles de expresión de miR-16 y miR-186, podrían ser evaluados como biomarcadores de OA en estudios posteriores.

REFERENCIAS:

Barter M. J., Bui C., Young D.A. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis and cartilage* 2012; 20: 339-349.

Berezikov E., Chung W. J., Willis J, Cuppen E., et al. Mammalian mirtron genes. *Molecular Cell* 2007; 28: 328-336.

Borgonio-Cuadra V. González-Huerta C., Duarte-Salazar C., de Los Ángeles Soria-Bastida M., et al. Analysis of estrogen receptor alpha gene haplotype in Mexican mestizo patients with primary osteoarthritis of the knee. *Rheumatol Int.* 2012; 32(5):1425-1430.

Boyd S. D. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory Investigation* 2008; 88: 569–578.

Cai J., Wu J., Zhang H., Fang L., et al. miR-186 downregulation correlates with poor survival in lung adenocarcinoma, where it interferes with cell-cycle regulation. *Cancer Res* 2013; 73(2): 756-766.

Cannell I. G., Kong Y. W., Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans* 2008; Vol. 36 (part 6): 1224-1231.

Caporali A. y Emanuelli C. MicroRNA-503 and the extended microRNA-16 family in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2011; 21: 162-166.

Castañeda S., Roman-Blas J. A., Largo R., Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for Osteoarthritis treatment. *Biochemical Pharmacology* 2012; 83: 315–323.

Chamorro-Jorganes A., Araldi E., Penalva L. O. F., Sandhu D., et al. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2595-2606.

Chang T. C., Mendell J. T. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007; 8: 215-39.

Chapman K., Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone* 2011; doi: 10.1016/j.bone.2011.11.026.

Cheloufi S. Dos Santos C. O., Chong M. M., Hannon G. J. A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 2010; Vol. 465: 584-590.

Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research* 2008; 18: 997-1006.

Cortez M. A. y Calin G. A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert opinion on biological therapy* 2009; Vol. 9(6): 703-711.

Espinoza-Morales R. y Pérez-Bastidas M. E. Enfoque terapéutico actual de la osteoartritis. *Reumatol Clin* 2005; 1 Supl 2: S8-15.

Galves-Rosas A., González-Huerta C., Borgonio-Cuadra V. M., Duarte-Salazar C., et al. A COL2A1 gene polymorphism is related with advanced stages of OA in Mexican mestizo population. *Rheumatol Int* 2010; 30:1035–1039.

Goeppert B., Schmezer P., Dutruel C., Oakes C., et al. Down-regulation of tumor suppressor A kinase anchor protein 12 in human hepatocarcinogenesis by epigenetic mechanisms. *Hepatology* 2010; Vol. 52 (6): 2023-2033.

Goldring M. B. y Goldring S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; 1192: 230–237.

Goldring M. B. y Marcu K. B. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends in Molecular Medicine* 2011; doi 10.1016/j.molmed.2011.11.005.

Hart D. J., Spector T. D., Brown P., Wilson P., et al. Clinical signs of early osteoarthritis: reproducibility and relation to x ray changes in 541 women in the general population. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1991; 50: 467-470.

Hashimoto M., Nakasa T., Hikata T., Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Medicinal Research Reviews* 2008; Vol. 28, No. 3: 464-481.

Herrero-Beaumont G., Roman-Blas J. A., Castañeda S., y Jiménez S. A. Primary Osteoarthritis no longer primary: Three subsets with distinct etiological, clinical and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 39:71-80.

Horton Jr. W. E., Bennion P., Yang L. Cellular, molecular and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6(4):379-381.

Hu Z., Chen X., Zhao Y., Tian T., et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1721-1726.

Huang Z., Huang D., Ni S., Peng Z., et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-126.

Hunter D. J. Osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2011; 25: 801–814.

Hunter M. P., Ismail N., Zhang X., Aguda B. D., et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PloS one* 2008; 3(11): e3694.

Iliopoulos D., Malizos K. N., Oikonomou P., Tsezou A. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PLoS ONE* 2008; 3(11): e3740.

Inui M., Martello G., Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Molecular Cell Biology* 2010; Vol 11: 252-263.

Issa R. I., Griffin T. M. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiology of Aging & Age-related Diseases* 2012; 2: 17470.

Jackson R. J., Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci. STKE* 2007; 367: re1.

Jing Q., Huang S., Guth S., Zarubin T., et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 2005; Vol. 120: 623-634.

Jones S. W., Watkins G., Le Good N., Roberts S., et al. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- α and MMP13. *Osteoarthritis and Cartilage* 2009; Vol. 17: 464-472.

Kellgren J. H., Lawrence J. S. Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494.

Kim S. Y., Lee Y. H., Bae Y. S. miR-186, miR-216b, miR-337-3p, and miR-760 cooperatively induce cellular senescence by targeting alpha subunit of protein kinase CKII in human colorectal cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2012; 429: 173-179.

Kim V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Focus on RNA reviews* 2005; 6:376-385.

Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 17442-17452.

Koskinen A., Juslin S., Nieminen R., Moilanen T., et al. Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Research & Therapy* 2011; 13:R184.

Kwak, Tomari. The N domain of argonaute drive duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural and molecular biology* 2012; Vol. 19 (2): 145-152.

Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-854.

Linsley P. S., Schelter J., Burchard J., Kibukawa M., et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2007; 27(6): 2240-2252.

Liu Q., Fu H., Sun F., Zhang H., et al. MiR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Research* 2008; Vol. 36 (16): 5391-5404.

Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(t))} method. *Methods* 2001; 25(4): 402-408.

Magaña J. J., Gálvez-Rosas A., González-Huerta C., Duarte-Salazar C., Et al. Association of the calcitonin gene (CA) polymorphism with osteoarthritis of the knee in a Mexican mestizo population. *Knee*. 2010; 17(2):157-60.

Massengale M., Reichmann W. M., Losina E., Solomon D. H., et al. The relationship between hand osteoarthritis and serum leptin concentration in participants of the third national health and nutrition examination survey. *Arthritis Res Ther.* 2012; May 31;14(3):R132.

Michael J. W., Schlüter-Brust K. U., Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107:152-62.

Mitchell P. S., Parkin R. K., Kroh E. M., Fritz B. R., et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10513-10518.

Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., González S., et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2011; 2: 282.

Montecalvo A., Larregina A. T., Shufesky W. J., Stolz D. B., et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 2012; 119: 756-766.

Murata K., Yoshitomi H., Tanida S., Ishikawa M., et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2010; 12:R86.

Pritzker K. P., Gay S., Jimenez S. A., Ostergaard K., et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *OsteoArthritis and Cartilage* 2006; 14(1): 13-29.

Okuhara A., Nakasa T., Shibuya H., Niimoto T., et al. Changes of microRNA expression in peripheral mononuclear cells according to the progression of osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 2012; 22: 446–457.

Redis R. S., Calin S., Yang Y., You M. J., et al. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. *Pharmacology and therapeutics* 2012; 136: 169-174.

Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; Vol. 403: 901-906.

Richette P., Corvol M., Bardin T. Estrogens, Cartilage, and Osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003; Vol 70 (4): 257-262.

Rigoutsos I. New tricks for animal microRNAs: targeting amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* 2009; 69(8): 3245-3248.

Sandell L. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nature Reviews Rheumatology* 2012; Vol. 8: 77-89.

Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature protocols* 2008; 3: 1101-1108.

Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 2007; 9: 654-659.

Von Brandenstein M., Richter C., Fries J. W. U. MicroRNAs: small but amazing, and their association with endothelin. *Life Sciences* 2012; Vol. 91 (13-14): 475-489.

Wang K. H., Kao A. P., Singh S., Yu S. L., et al. Comparative expression profiles of mRNAs and microRNAs among human mesenchymal stem cells derived from breast, face, and abdominal adipose tissues. *Kaohsiung J Med Sci* 2010; 26: 113-122.

Weber J., Baxter D. H., Zhang S., Huang D. Y., et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry* 2010; Vol. 56(11): 1733-1741.

Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I., et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 2009; Vol. 11 (3): 228-234.

Xiao F., Zuo Z., Cai G., Kang S., et al. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucl Acids Res* 2009; 37 (suppl 1): D105-D110.

Yang M., Chen J., Su F., Yu B., et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 117.

Yi R., Qin Y., Macara I., Cullen B. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003 17: 3011-3016.

Yusuf E. Metabolic factors in osteoarthritis: obese people do not walk on their hands. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14:123.

Zhang Y., Jordan J. M. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010;26:355-69.

Zhou L., Qi X., Potashkin J. A., Abdul-Karim F. W., et al. MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *The Journal of biological chemistry* 2008; Vol. 283(42): 28274-28286.

Zhou X. Duan X, Qian J., Li F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 2009; 137: 159–164.

ANEXOS:

ANEXO 1

Extracción de RNA pequeños mediante el uso del kit miRNeasy

Debemos tomar las siguientes consideraciones durante el manejo de muestras de plasma: se debe hacer siempre en hielo, y se debe evitar el uso del vórtex previo a la desnaturalización, en su lugar se recomienda mezclar por inversión antes de tomar la muestra.

Pasos a seguir:

1. Mezcla la muestra de plasma por inversión.
2. Tomar 400 µl de plasma y diluirlo con 400 µl de agua grado biología molecular en un tubo de centrífuga de 2 ml.
3. Añadir 800 µl de trizol o Quiazol (Quiagen, UK) a la dilución para asegurar una eficiente desnaturalización de proteínas.
4. Mezclar en vórtex e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Agregar 0.2 volúmenes de cloroformo grado biología molecular a la mezcla homogénea para favorecer una separación trifásica posterior (ver paso 7).
6. Mezclar en vórtex a velocidad máxima por 30 segundos.
7. Centrifugar a 12000 x G por 15 minutos a 4°C. Esto formará una columna en la que se presentan una fase superior o incolora (RNA), una fase intermedia o blanquecina (DNA) y fase inferior roja (Proteínas).
8. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
9. Añadir 1.5 volúmenes de etanol al 100% a la fase acuosa recuperada. Esto favorecerá que el RNA se adhiera a la membrana de sílica de las columnas utilizadas en el paso 11.
10. Mezclar vigorosamente con pipeta.
 - Continuar sin retraso el paso siguiente.
11. Pipetear hasta 700 µl de muestra a una columna de sílica.
12. Centrifugar a 8000 x G o a 10 000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente.
13. Repetir el paso hasta completar la muestra.
14. Agregar 700 µl de buffer RWT a la columna.
15. Centrifugar a 8000 x G durante 15 segundos a temperatura ambiente para lavar la columna. Descartar el sobrenadante.
16. Añadir 500 µl de buffer RPE en la columna.
17. Centrifugar a 8000 x G durante 15 segundos para secar la membrana.
18. Agregar 500 µl de buffer RPE a la columna nuevamente.
19. Centrifugar a 8000 x G a temperatura ambiente durante 2 minutos.
20. Colocar un nuevo tubo a la columna.
21. Centrifugar a máxima velocidad durante un minuto a temperatura ambiente.
22. Transferir la columna a un tubo de 1.5 mL.

23. Colocar 100 μ l de agua libre de nucleasas a 95 °C para la recuperación de RNA pequeños.
24. Dejar incubar durante 5 minutos.
25. Centrifugar a 8000 x G durante 1 minuto.

Almacenar el RNA a -80°C hasta su uso.

ANEXO 2

cDNA de hsa-miR-16, hsa-miR-186 y U6.

La transcripción reversa es un paso primordial para la valoración de la presencia de microRNAs, tanto como para su cuantificación posterior ya que nos permitirá la obtención de cDNA el cual se pre-amplificará y posteriormente se cuantificará en qPCR en tiempo real.

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN (μ l) |
|---|---------------|--------------------|
| Agua | | 1.057 |
| Amortiguador 10 x | 1 x | 0.5 |
| dNTPs 100 Mm | 1Mm | 0.05 |
| Inhibidor de RNAsa 20 U/microL | 0.252 U | 0.063 |
| Primer RT 5 x (hsa-miR-16, hsa-miR-186, o U6) | 1 X | 1 |
| Transcriptasa reversa 50 U/ μ L | 3.3 U | 0.33 |
| Templado (RNA total) | 50 ng | 2 |
| Volumen de la reacción final | | 5 |

- Mezclar por inversión.
- Centrifugar < 2000 rpm.
- Programa de ciclado para la amplificación:
 - 16°C x 30 minutos
 - 42°C x 30 minutos
 - 85°C x 5 minutos

Posterior: 4°C

ANEXO 3

Preamplificación de cDNA de hsa-miR-16, miR-186 y U6.

Esto aumentará la concentración de miRNA/ μ l y favorecerá la eficacia de las sondas utilizadas. Debemos agregar el templado al final en el tubo de reacción.

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN (μ L) |
|---|---------------|--------------------|
| Taqman PreAmp Master Mix 2X | 1 X | 2.5 |
| Primer RT 0.2 X (hsa-miR-16, miR-186 o U6) | 0.05 X | 1.25 |
| Templado de cDNA sin diluir (500 ng/ μ L) | 625 ng | 1.25 |
| Volumen final | | 5 |

1. Mezclar por inversión.
2. Centrifugar <2000 rpm.
3. Programa de ciclado de amplificación:

95°C x 10 minutos

14 ciclos:

95°C x 15 segundos

60°C x 4 minutos

Posterior: 4°C.

ANEXO 4

PCR Tiempo Real

Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado y en cada corrida se incluyó de manera rutinaria el control endógeno U6

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN | VOLUMEN (μL) |
|---|---------------|--------------|
| Taqman Universal Master Mix II, no UNG | | 2.5 |
| Primer sonda 20 X (hsa-miR-16, hsa-miR-186, o U6) | 1 X | 0.25 |
| Producto de preamplificación | 300 ng | 2.25 |
| Volumen final | | 5 |

1. Mezclar por inversión.
2. Centrifugar <2000 rpm.
3. Programa de ciclado de amplificación:

95°C x 10 minutos

40 ciclos:

95°C x 15 segundos

60°C x 1 minuto

ANEXO 5:

Cuantificación de la concentración de Ácidos nucleicos:

Se hizo uso del espectrofotómetro para conocer la concentración de RNAs pequeños y cDNA posterior a la extracción de RNAs pequeños, transcripción reversa y pre-amplificación. Esto nos permitió calcular los volúmenes de dilución para las pruebas pertinentes. Se realizó como se explica a continuación:

1. Descongelar la muestra.
2. Configurar Nanodrop para el análisis de RNA o DNA de cadena sencilla según sea el caso.
3. Calibrar Nanodrop con 1 μ L de agua destilada.
4. Una vez calibrado, tomar 1 μ L de muestra y colocar sobre el lente de nanodrop.
5. Una vez cerrado ordenar que analice la muestra.

Una vez analizada la muestra hacer limpieza del lente de Nanodrop con agua destilada.

ANEXO 6

Análisis *In silico*:

Para el análisis bioinformático, previamente se realizó una revisión bibliográfica donde se consideraron 200 moléculas involucradas en la fisiopatología de la Osteoartritis. Se buscaron coincidencias para determinar posibles blancos de hsa-miR-16 y hsa-miR-186 en la plataforma miRecords. Se consideraron blancos potenciales aquellas moléculas cuya regulación por los miRNA de interés fuera predicha por al menos 3 de los algoritmos utilizados. Posteriormente se determinó cuáles de estas coincidencias ya fueron validadas de forma experimental.

Los pasos a seguir para el análisis de coincidencias en la plataforma miRecords son los siguientes:

Para la predicción de genes blanco:

1. Seleccionar la opción de *Predecir blancos*.
2. Seleccionar Homo ssp
3. Seleccionar miRNA a analizar.
4. Seleccionar gen blanco (opcional)
5. Buscar concordancias.

Para la confirmación de blancos validados experimentalmente:

1. Seleccionar la opción de *Genes validados*.
2. Seleccionar Homo ssp.
3. Seleccionar miRNA a analizar.
4. Seleccionar gen blanco (opcional)

Buscar concordancias.

ANEXO 7

Validación de la eficacia del ensayo con sonda individual.

Para valorar la eficacia del ensayo de PCR en tiempo real con sonda individual (hsa-miR-16, hsa-miR-186 y U6) se realizaron diluciones 1:5 a partir de 200 ng de cDNA del preamplificado para analizarse por separado por PCR en tiempo real. Se realizó un análisis diferencial entre la sonda de interés (hsa-miR-16 y hsa-miR-186) y la sonda del gen endógeno control (U6).

Estos resultados se graficaron en el software Excel (Microsoft) para la realización de una pendiente: el eje "X" se usó para el logaritmo de la concentración y el eje "Y" para el diferencial de Ct entre el miRNA de interés y el control endógeno.

Consideramos la eficiencia de la sonda cuando la pendiente tenía un valor menor a 0.1.

ANEXO 8:

Carta de consentimiento informado

México, D.F. a de de 2012.

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente, informo que he dado mi consentimiento en forma libre, voluntaria y sin presiones para participar en el trabajo de investigación: "Nivel de expresión de hsa-mir-16 y hsa-mir-186 en plasma de pacientes mexicanos con diagnóstico de osteoartritis de rodilla de bajo grado", a cargo del Dr. Antonio Miranda Duarte, que se realiza en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

Previamente, se me ha explicado que existen varios factores hereditarios que se transmiten de generación en generación (de padres a hijos), y que veces esos factores hereditarios pueden modificarse o tener algunos cambios que podrían aumentar la posibilidad de que aparezca una enfermedad como la Osteoartritis.

El propósito de esta investigación es saber si algunos de esos factores están diferentes en la gente que tiene osteoartritis y en las personas que no tienen osteoartritis; para esto, es necesario reunir un grupo de pacientes con esa enfermedad y otro grupo de pacientes sin la enfermedad. Luego, se va a tomar una muestra de sangre con una jeringa en la vena del brazo; ya que de la sangre se puede obtener una muestra del material hereditario y allí se puede saber si el factor hereditario que quieren estudiar está presente o no. Esa toma de muestra es igual a la que realizan en los laboratorios y es un procedimiento sencillo que no tiene peligros, si acaso, podría formarse un moretón.

Se me comentó también que todo este procedimiento no tiene ningún costo para mí, y que no es necesario para hacer un diagnóstico o darme un tratamiento para mi padecimiento, pero entiendo que con los resultados de ésta investigación se conocerá mejor a la enfermedad y los elementos que la desencadenan. También se me explicó que es posible que guarden una parte del material hereditario que se obtenga de la sangre, porque es posible que después estudien otros factores que en este momento no pueden ser analizados.

Asimismo, se me ha explicado que me es posible solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación, que estoy en libertad de negarme a participar en el presente estudio y, que en ese caso, la atención que recibo en esta Institución no cambiará.

Nombre del paciente

Firma

Nombre del investigador

Firma