



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA  
LABORATORIO DE INMUNOGENÓMICA Y ENFERMEDADES METABÓLICAS  
ÁREA DE INVESTIGACIÓN

***"Determinación de microRNAs en suero de individuos portadores del haplotipo de riesgo para  
lupus eritematoso sistémico Xq28"***

**REPORTE DE SERVICIO SOCIAL**

**Alumno:** Pablo Alberto Fabela Escobedo  
**Licenciatura:** Química Farmacéutica Biológica  
**Matricula:** 2142030922

**Proyecto genérico:** Evaluación de productos relacionados con la salud

**Etapas:** Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico,  
biológico y microbiológico de productos relacionados con la salud.

**Asesor interno:** Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez. Profesor investigador titular C. No. Eco. 37622  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Laboratorio de Inmunología

**Asesor externo:** Dra. Cecilia Contreras Cubas. *Cecilia Contreras C.*  
Investigador en Ciencias Médicas C.  
Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas INMEGEN  
Dirección de Investigación Médica

Lugar de realización: Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

**FECHA DE INICIO: 03-06-2019**  
**FECHA DE TÉRMINO: 03-12-2019**



[pabloafabelae@gmail.com](mailto:pabloafabelae@gmail.com)



5549932069

# INDICE

Introducción.....	3
Antecedentes.....	4
Objetivo general .....	6
Objetivos específicos .....	6
Materiales y métodos .....	7
○ Población de estudio.....	7
○ Extracción de RNA total.....	7
○ Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	7
○ PCR en tiempo real (qPCR) .....	7
○ Análisis.....	8
Actividades realizadas .....	8
Objetivos y metas alcanzadas .....	8
Resultados y conclusiones .....	9
Recomendaciones.....	12
Bibliografía .....	12

## Introducción

Uno de los avances más importantes en las ciencias genéticas han sido el descubrimiento y la caracterización de las funciones de los microRNAs (miRNAs), estas son moléculas pequeñas de aproximadamente 22 pares de bases (pb) de material genético no codificante, que tienen la función de regular la expresión de algunos genes o están involucrados en la transcripción de proteínas particulares, de manera directa secuestrando un RNA mensajero (mRNA) diana, siendo un regulador postraducciona, o un regulador en la inhibición de proteínas asociadas a mecanismos epigenéticos.<sup>1, 2, 3</sup>

Se han identificado perfiles de expresión de miRNAs alterados en células y tejidos afectados por diversas enfermedades autoinmunes, y algunos de ellos se han propuesto como biomarcadores moleculares de diagnóstico en estas patologías.<sup>4</sup>

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, con daño tisular de naturaleza autoinmune que afecta varios órganos, caracterizada por la formación de complejos autoinmunes antinucleares (ANA) y con una etiología poco comprendida hasta ahora<sup>5, 6</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que la probabilidad en el riesgo de desarrollar LES puede estar asociada a factores ambientales como la luz UV<sup>5</sup>, epidemiológicos (enfermedades virales)<sup>7</sup>, o genéticos (haplotipos de riesgo).

Por otra parte, se ha demostrado que LES es una enfermedad multigénica, esto quiere decir que, varios genes están relacionados con el riesgo de desarrollar la enfermedad, algunos polimorfismos de un solo nucleótido, o variantes poco comunes aumentan el riesgo si se es, o no portador de este genotipo. Actualmente se han descrito haplotipos en los genes IRAK1 y MECP2, de la región Xq28, que están estrechamente relacionados con el riesgo de desarrollar LES<sup>8, 9</sup>

Existen diferencias mundiales en la incidencia y prevalencia de LES que varían según el sexo, la edad, el origen étnico y el tiempo, sin embargo, las mujeres resultan afectadas con mayor frecuencia que los hombres para todas las edades y grupos étnicos, por esa inclinación hacia el estudio de variantes relacionadas con el cromosoma X.<sup>10</sup>

Por lo tanto, es fundamental el estudio de la expresión diferencial de RNAs pequeños no-codificantes, como los miRNAs en individuos con susceptibilidad genética a LES con el fin de determinar si estos participan en algunos procesos que contribuyan al desarrollo de LES. Es así como el enfoque genético puede ser utilizado como una herramienta de diagnóstico, para elucidar la predisposición de desarrollar enfermedades, así como en los tratamientos a futuro, por lo que el objetivo de este trabajo tiene como finalidad determinar el nivel de expresión de los miRNAs en individuos con susceptibilidad genética a desarrollar LES.

## Antecedentes

Las variantes genéticas son cambios en la secuencia de las bases nitrogenadas del DNA y se denominan mutaciones, que suelen darse durante los periodos de replicación, reparación, o recombinación del DNA y que se encuentran de manera frecuente en las poblaciones. Éstas pueden a su vez tener o no algún efecto en la secuencia de las proteínas, por ejemplo, produciendo proteínas inmaduras sin función o una proteína con funciones modificadas.<sup>11</sup>

Las modificaciones en el DNA se denominan dependiendo del nivel en el que estas se presentan, siendo moleculares los cambios en las bases nitrogenadas, cromosómicos los cambios en la estructura de la cromatina o génicos en las alteraciones en los cromosomas.<sup>12</sup>

Por su parte, las mutaciones moleculares constan en un cambio de uno o algunos nucleótidos, que pueden ser silentes al cambiarse por un codón sinónimo y así, no modificar el producto de la traducción, ser una mutación *missense* o de cambio de sentido que da como resultado una proteína modificada, *nonsense* o sin sentido que cambian un codón que traduce a un aminoácido por un codón de término, generándose así una proteína trunca.<sup>13</sup>

Dentro de las mutaciones moleculares se pueden definir varios subgrupos como son:<sup>14</sup>

- Las variantes genéticas de un solo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés: Single Nucleotide Variant) que son cambios en una única base dentro de una región en un gen; estos cambios pueden ser de una base púrica por otra púrica, o una pirimidínica por otra pirimidínica, en ambos casos se denominará mutación de transición y si el cambio es una base púrica por una pirimidínica o viceversa serán una mutación de transversión.
- Inversión, hace referencia al intercambio o giro en dos nucleótidos con uno en medio de ellos que permanece en su posición silvestre.
- Inserción, adición de uno o más nucleótidos en la secuencia del gen.
- Delección, que es la pérdida de uno o más nucleótidos en la secuencia del gen.
- Duplicación es cuando un fragmento de la secuencia se está multiplicando una o varias veces dentro de la misma secuencia.

Estos tres últimos causan un cambio en el marco de lectura que modifica la secuencia de todos los subsecuentes codones del gen.

Se ha demostrado que las SNVs se asocian a una gran cantidad de enfermedades, complejas, sumado generalmente al efecto de factores ambientales.<sup>13, 14</sup>

En este aspecto no son excepción las enfermedades autoinmunes en la cual se han reportado una gran cantidad de SNVs asociadas al riesgo a padecerlas, y en otras ocasiones se han asociado en ciertas poblaciones con protección para estas.<sup>15</sup>

Se han descrito SNVs localizadas en distintos genes del sistema inmune, algunas de estas presentes en genes clave de la regulación de la respuesta inmune, como son las interleucinas. Otra vía celular importante a la que se han asociado SNVs, es regulación genética como, por ejemplo, en genes de desmetilasas o cinasas, proteínas fundamentales en la modificación de la cromatina. Esto resulta de vital importancia en enfermedades autoinmunes, donde las modificaciones en estas vías conllevan a un mal funcionamiento en el reconocimiento de células propias desencadenando daño citotóxico e inflamación.

Así, la suma de factores genéticos, cambios epigenéticos y factores ambientales contribuye a la compleja etiología de LES. Mediante estudios de asociación genética, se ha reportado un haplotipo de riesgo para esta enfermedad en la región Xq28, en la que se localizan los genes *IRAK1* y *MECP2*.<sup>16</sup>

El gen *IRAK1* codifica para el receptor de interleucina-1 asociado a cinasa 1, una de las dos cinasas serina/treonina asociadas con el receptor de interleucina-1 (IL1R), tras su estimulación. Este gen es parcialmente responsable de la regulación positiva de IL1- inducida por el factor de transcripción NF- $\kappa$  B.<sup>17</sup>

Se ha descrito que la variante *rs3027898 A/C* localizada en *IRAK1* se asocia a varias enfermedades autoinmunes, tales como LES y esclerosis múltiple. A su vez, esta es la SNV más estudiada en la artritis inflamatoria, lo que puede sugerir una relación entre la presencia de la variante y la inflamación autoinmune.<sup>18</sup>

Otra variante en *IRAK1* es el *rs1059702 A/D*, la cual se ha caracterizado en pacientes lúpicos con lesiones dermatológicas (LD) de etnias americanas, hispanas, europeas y asiáticas, pero no en poblaciones africanas.<sup>19</sup>

Por su parte, *MECP2* forma parte de la familia de enzimas con dominio de unión a sitios CpG (MBD, por sus siglas en inglés: Methyl Binding Domain). Esta se une específicamente al DNA metilado y puede reprimir la transcripción de ciertos genes. A diferencia del resto de los miembros de la familia MBD, *MECP2* está localizado en el cromosoma X y participa en el silenciamiento de este. Las variantes genéticas de *MECP2* se han asociado mayormente a los casos de síndrome de Rett siendo más común en mujeres.<sup>20</sup>

La variante *rs17435 A/T* localizada en *MECP2* se asocia a LES; se ha sugerido que esta puede estar relacionada con la diferenciación de la metilación en los pacientes con LES con respecto a los controles sanos.<sup>21</sup>

Otros de los cambios a nivel de regulación génica que se han descrito en LES es el cambio de perfil de expresión de los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA endógeno que tienen la función de regular de manera post-transcripcional la

expresión de genes que codifican para proteínas, estos están distribuidos en todos los cromosomas humanos excepto en el cromosoma Y, siendo importante señalar que su distribución no es aleatoria y que se encuentran principalmente en regiones intrónicas y alrededor del 30% de los genes de miRNAs se encuentra en regiones intergénicas.<sup>22</sup>

La biogénesis de estas moléculas, comienza con las transcripciones primarias de miRNA (pri-miRNA) en el núcleo. Posteriormente, los pri-miRNA se pliegan en horquillas y actúan como sustrato para Drosha, enzima de la familia RNasa III involucradas en el proceso de maduración de miRNA. Drosha procesa pri-miRNA a un miRNA precursor (pre-miRNA) de unos 70 pb aproximadamente, que se transportan desde el núcleo al citoplasma. En el citoplasma Dicer, otra enzima de la misma familia procesa el pre-miRNA en un dúplex de miRNA/miRNA\* de 20 a 23 pb. El miRNA duplex se une al complejo RISC (por sus siglas en inglés: RNA Induced Silencing Complex), en donde los miRNAs maduros interactuarán con la región no traducida 3'(UTR) de su mRNA diana por medio de complementariedad de bases.<sup>23</sup>

En los últimos años, se ha observado que los pacientes con LES muestran distintos patrones de expresión de miRNA, incluidos los miRNAs circulantes, y que estos están correlacionados con el desarrollo y la progresión de la enfermedad.<sup>24</sup> Se reportó que algunos miRNAs como miR-371-5p, miR-423-5p, miR-638, miR-1224-3p y miR-663 están conservados y regulados en las células mononucleares (CMNs) de pacientes con nefritis lúpica en diferentes grupos étnicos.<sup>24</sup>

Los avances recientes indican que los miRNAs están involucrados en el desarrollo del LES, estableciendo un nuevo camino hacia la comprensión de la patogénesis de la enfermedad y que podría conducir al descubrimiento de nuevos objetivos terapéuticos.<sup>25</sup> Así, el establecer la contribución de las variantes genéticas y epigenéticas en el desarrollo de LES es de suma importancia. La contribución en los cambios epigenético mediada por variantes genéticas puede dar indicios de los complejos cambios que tiene lugar en esta enfermedad.

#### Objetivo general

- Determinar el patrón de expresión diferencial de miRNAs circulantes en individuos con susceptibilidad genética a LES.

#### Objetivos específicos

- a. Realizar una búsqueda bibliográfica de los miRNAs con expresión diferencial en LES.
- b. Extraer el RNA a partir de suero en individuos sanos portadores y no portadores del haplotipo Xq28.

- c. Determinar la expresión de los miRNAs por la técnica de RT-qPCR.
- d. Analizar las diferencias de expresión de miRNAs que existan entre individuos portadores y no portadores.

## Materiales y métodos

### Población de estudio

Se incluyeron personas voluntarias, a las cuales se les aplicó un cuestionario para evaluar su estado de salud. El estudio cuenta con la autorización de los comités de ética, bioseguridad e investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

### *Criterios de inclusión*

Individuos sanos mayores de 18 años de edad que en las últimas dos generaciones de su familia hubieran nacido en México y que aceptaran firmar el consentimiento informado.

### *Criterios de exclusión*

Individuos que presentaran o refirieran antecedentes de enfermedades autoinmunes, crónico concomitante o que estuvieran en algún tratamiento hormonal (cuestionario). También se consideró que no nacieron en México o que las últimas dos generaciones de su familia no fueran mexicanas.

### *Criterios de eliminación*

Se consideró cuando la muestra no contara con la calidad deseada de ácidos nucleicos, que fuera insuficiente o cuando se presentaran problemas técnicos. También se consideró cuando el voluntario decidiera no participar más en el estudio.

### Extracción de RNA total

Se realizó a partir de sueros previamente recolectados, mediante el método de TRIzol LP siguiendo las instrucciones del fabricante. Se adicionó un miRNA sintético o *spike* (cel- miR-39) como control interno para cuantificar el nivel de expresión.

### *Síntesis de DNA complementario (cDNA)*

- i. *RT-PCR para miRNAs*: se utilizó el estuche comercial miR-X (Clontech), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para cada reacción se tomaron 200ng de RNA total.
- ii. *RT-PCR para mRNAs*: se ocupó el estuche comercial Reverse Transcription Reagents (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se utilizaron 500ng de RNA total.

### PCR en tiempo real (qPCR)

Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo utilizando SYBR Green 2x qPCR MasterMix (Thermo Scientific). En el caso de los miRNAs se utilizó como gen de referencia el RNA pequeño U6 y el *spike*, y para los mRNAs el transcrito de GAPDH. Cada muestra fue



evaluado por triplicado, realizando las reacciones de qPCR en el termociclador QuantStudio3 (Thermo Scientific) bajo condiciones estándar.

#### Análisis

Los datos de expresión se analizarán con un método de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) utilizando la prueba estadística de t de Student para las comparaciones entre los grupos de estudio.

#### Actividades realizadas

- Durante el primer mes de estancia se preparó al alumno para poder ser capaz de realizar las actividades necesarias para la investigación, conforme a los protocolos establecidos, como lo son la elaboración de geles de agarosa para electroforesis de nucleótidos; RT-PCR y PCR punto final. A su vez realizó una búsqueda en bases de datos como son PubMed, Google Academy y BIDIUAM, para encontrar los microRNAs circulantes con mayor relevancia para LES.
- Además de lo anteriormente mencionado, participó en la genotipificación de SNVs localizadas en el gen de interleucina-6 (IL-6), por medio de la metodología de discriminación alélica por sondas TaqMan.
- Otra de las actividades realizadas durante la estancia fue la preparación de 5 muestras (extracción de DNA, PCR punto final, pruebas de calidad de la muestra y toma de alícuotas) para su secuenciación y la identificación de dos mutaciones distintas de los genes *Dys* y *NOD2*.
- Durante los dos meses posteriores, se realizó la estandarización de la extracción de RNA total a partir de muestras de suero, Aprendió la técnica de qPCR para mRNAs y miRNAs.
- Adicionalmente durante la formación dentro del instituto se participó en seminarios de revisión de artículos científicos, así como de resultados.

#### Objetivos y metas alcanzadas

-Se realizó con éxito la búsqueda de miRNAs previamente relacionados con una expresión diferencial en LES.

- Se estandarizaron las condiciones de extracción de RNA circulante a partir de muestras de suero de individuos controles, tanto portadores como no portadores del haplotipo de riesgo

- Debido a las bajas concentraciones de RNA circulantes, no se logró realizarla prueba de calidad a través de una electroforesis de nucleótidos en gel de agarosa. Sin embargo, se verificó que la calidad de las muestras era suficientemente buena para continuar con la fase experimental del estudio.



- Se verificó que la calidad de las muestras era suficientemente buena para continuar con la fase experimental del estudio.

-Se realizaron con éxito las RT-PCR, para la obtención de DNA de una sola hebra o complementaria.

-Se realizaron los ensayos de q-PCR para la detección de miRNAs.

## Resultados y conclusiones

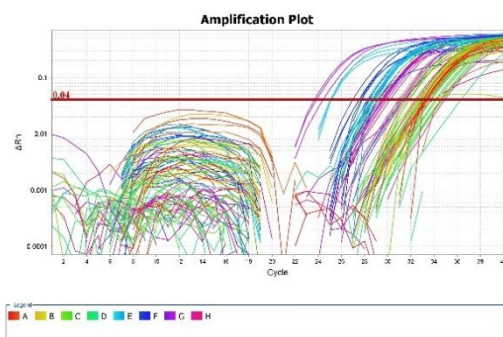
En la tabla 1 se muestran los parámetros de características generales de la población.

**Tabla 1. Descripción de la población.**

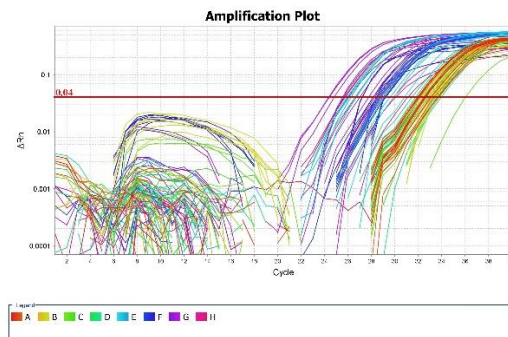
		<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>
<b>Grupo de estudio</b>	n=34	30 (88.24 %)	4 (11.76 %)
<b>Edad</b>	Media 22.76	30 - 20	
<b>Pacientes con enfermedades crónicas</b>	Sanos 25 (71.43 %)	Crónicos 9 (28.57 %)	
<b>Tratamiento esteroideo</b>	Si 2 (5.88 %)	No 32 (94.12 %)	

Tras los experimentos realizados, se obtuvieron las siguientes curvas de amplificación:

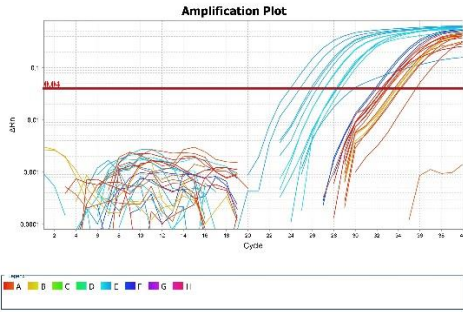
A)



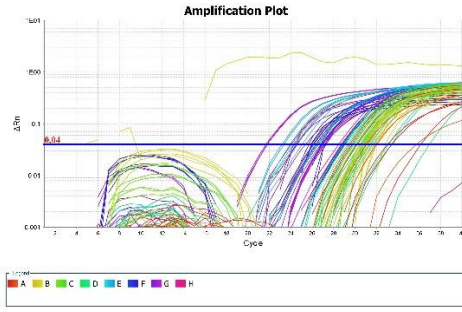
B)



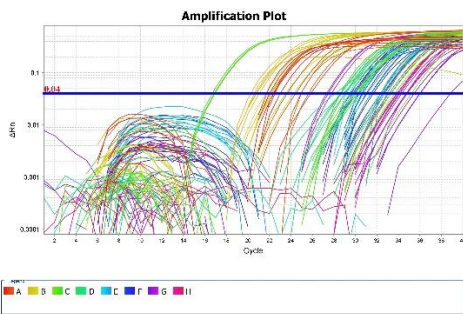
C)



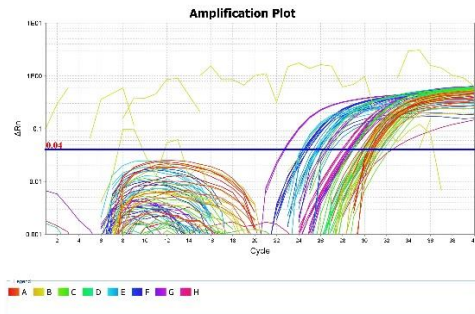
G)



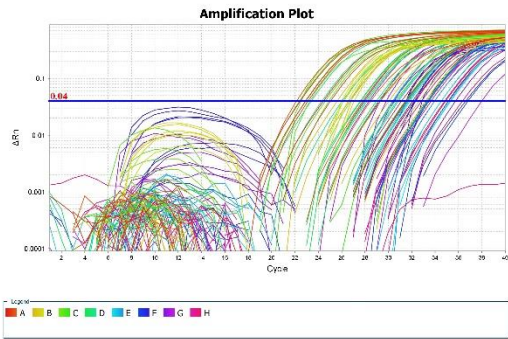
D)



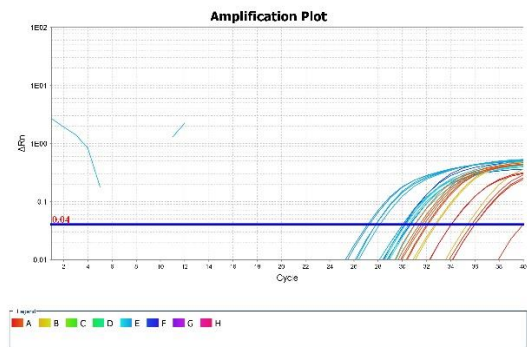
H)



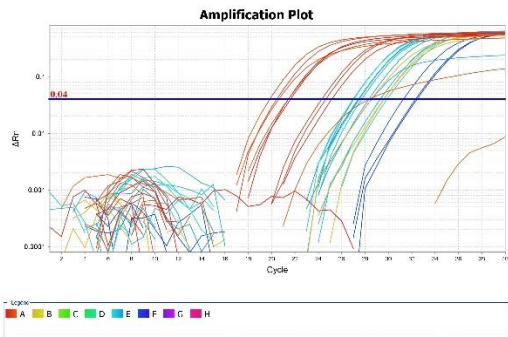
E)



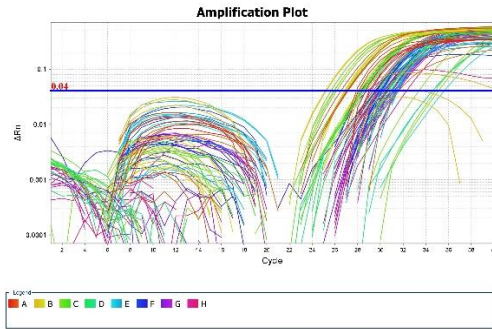
I)



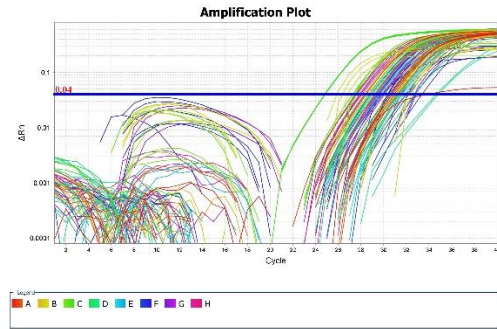
F)



J)



K)



*Figura A)* Curva de amplificación del gen U6 y el miRNA-21 placa 1; *figura B)* Curva de amplificación del gen U6 y el miRNA-21 placa 2; *figura C)* Curva de amplificación del gen U6 y el miRNA-21 placa 3; *figura D)* Curva de amplificación de Ce miR-39 y el miRNA-145 placa 1; *figura E)* Curva de amplificación de Ce miR-39 y el miRNA-145 placa 2; *figura F)* Curva de amplificación de Ce miR-39 y el miRNA-145 placa 3; *figura G)* Curva de amplificación del miR-146a y el miRNA-223 placa 1; *figura H)* Curva de amplificación del miR-146a y el miRNA-223 placa 2; *figura I)* Curva de amplificación del miR-146a y el miRNA-223 placa 3; *figura J)* Curva de amplificación del miR-326 y el miRNA-371b placa 1; *figura K)* Curva de amplificación del miR-326 y el miRNA-371b placa 2.

Se obtuvieron los valores de expresión para cada una de las muestras analizadas. Falta por realizar la clasificación de los individuos en portadores y no portadores del haplotipo por medio de un ensayo de genotipificación.

## Discusión

Se establecieron las condiciones experimentales adecuadas para la extracción de RNA total a partir de muestras de suero y se pudieron identificar miR-21, miR-145, miR-146a, miR-223, miR326 y miR-371b.

Así mismo, se puede confirmar la posible viabilidad del suero como muestra para el estudio de miRNAs circulantes libres de célula y puede ser una muestra factible para el estudio de biomarcadores de enfermedades autoinmunes, al ser una forma de estudio poco invasiva para el paciente, además que el estudio de los miRNAs con base a su expresión aumentada o disminuida podría ser orientativa hacia el estado de una enfermedad.<sup>26, 27</sup>

## Recomendaciones

Tomando en cuenta que el LES es un padecimiento que cuenta con limitados estudios en nuestro país y que a su vez la etiología es poco conocida, es recomendable realizar investigaciones que puedan contribuir en el conocimiento de las enfermedades autoinmunes como lo es LES, así mismo se tendría un papel claro de los microRNAs y mRNAs para futuros tratamientos a nivel molecular.

## Bibliografía

1. Berezikov E. Cuppen E. Plasterk R. Approaches to microRNA discovery. *Nature Genetics* 2006; 38:2-7.
2. Chuang JC. & Jones PA. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatric Research* 2007; 61:24-29.
3. Sato F. Tsuchiya S. Meltzer SJ. et al. MicroRNAs and epigenetics. *The FEBS Journal* 2011; 278: 1598-609.
4. German-Avila, I., et al. MicroRNA in autoimmune diseases. *Gac Med Mex*, 2019; 155 (1), 63-71.
5. Petri M. Genovese M. Engle E. et al. Definition, incidence, and clinical description of flare in systemic lupus erythematosus. A prospective cohort study. *Arthritis & Rheumatism* 1991; 34:937-44.
6. Cook C. Wedgwood R. Craig J. et al. Systemic lupus erythematosus. *Pediatrics* 1960; 26:570-85.
7. Pan Q. Liu Z. Liao S. et al. Current mechanistic insights into the role of infection in systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother* 2019; 117:109-22
8. Brooks WH. Le Dantec C. Pers JO. et al. Epigenetics and autoimmunity, *Journal of Autoimmunity* 2010; 34:207-19.
9. Sawalha AH. Webb R. Han S. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS One* 2008; 3:17-27.
10. Smit CD. & Cry M. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 1988; 14:1-14.
11. Ravi K. Mallavarapu MD. Edwin W., et al. The History of Lupus Erythematosus. *Southern Medical Journal* 2007; 100:896-898.
12. Ress, F., et al. The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies. *Rheumatology* 2017; 56(11),1945-1961.
13. Holmes R., & Jobling M. (1996) Cap. 5 Genetic. *Medical Microbiology*, (4<sup>a</sup> ed.), Texas, E. U. A. Baron S. ed.
14. U. S. National Library of Medicine (2020, enero 7). *Can changes in the structure of chromosomes affect health and development?*. Recuperado el 14 de enero de 2020, de <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/structuralchanges>

15. Lafarge A., et al. Predictive factors of severe infections in patients with systemic necrotizing vasculitides: data from 733 patients enrolled in five randomized controlled trials of the French Vasculitis Study Group. *academic.oup.com*, recuperado el 27 de diciembre de 2019, de *Rheumatology*, kez575, <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez575>
16. Kaufman, M., et al. Fine mapping of Xq28: both MECP2 and IRAK1 contribute to risk for systemic lupus erythematosus in multiple ancestral groups. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2014; 72, 437-444.
17. National Center Biotechnology Information (2008). IRAK1 interleukin 1 receptor associated kinase 1 [Homo sapiens (human)]. Recuperado el 10 de diciembre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3654>
18. Labib, D., et al., Association between miRNA-146a and Polymorphisms of its Target Gene, IRAK1, Regarding Susceptibility to and Clinical Features of Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis, *Laboratory Medicine*, 2019; 50, 34-41.
19. Doudar, N., et al. Systemic lupus erythematosus: genetic variants in Xq28 region. *Reumatologia* 2019; 57 (5),264–270.
20. National Center Biotechnology Information (2015). MECP2 methyl-CpG binding protein 2 [Homo sapiens (human)]. Recuperado el 10 de diciembre de 2019, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4204>
21. Alesaeidi S. et al. Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MECP2) Polymorphism in Iranian Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Inflammation*. 2015; 38 (6):2185-2190.
22. Li M., He L. microRNAs as novel regulation of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *BioEssays*. 2012; 35, 670-680
23. Miao C. et al. The emerging role of microRNAs in the pathogenesis of systemic
24. Te J. et al. Identification of Unique MicroRNA Signature Associated with Lupus Nephritis. *PLoS ONE*. 2010; 5 (5): e10344
25. Honarpisheh, M., et al. The Involvement of MicroRNAs in Modulation of Innate and Adaptive Immunity in Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis, *J Immunol Res* 2018; 4:126106.
26. Qu, B., & Shen, N. miRNAs in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16, 9557-9572.
27. Garavelli S. et al. Blood Co-Circulating Extracellular microRNAs and Immune Cell Subsets Associate with Type 1 Diabetes Severity. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21;2, E477. <https://doi.org/10.3390/ijms21020477>

## RESUMEN

*“Determinación de microRNAs en suero de individuos portadores del haplotipo de riesgo para lupus eritematoso sistémico Xq28”*

**Introducción.** El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, con daño tisular de naturaleza autoinmune que afecta varios órganos, caracterizada por la formación de complejos autoinmunes antinucleares (ANA) y con una etiología poco comprendida hasta ahora<sup>1, 2</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que la probabilidad en el riesgo de desarrollar LES puede estar asociada a factores ambientales como la luz UV<sup>1</sup>, epidemiológicos (enfermedades virales)<sup>3</sup>, o genéticos (haplotipos de riesgo). Se ha demostrado que LES es una enfermedad en la que se encuentran asociados múltiples genes y que contribuyen con el riesgo de desarrollar LES. Actualmente se han descrito haplotipos en los genes *IRAK1* y *MECP2*, de la región Xq28, que están estrechamente relacionados con el riesgo de desarrollar LES.<sup>7, 8</sup> La incidencia y prevalencia mundial de LES varían según el sexo, la edad, el origen étnico y el tiempo, sin embargo, las mujeres resultan afectadas con mayor frecuencia que los hombres para todas las edades y grupos étnicos. Es fundamental el estudio de la expresión diferencial de los microRNAs (miRNAs) en individuos con susceptibilidad genética a LES con el fin de determinar si estos participan en algunos procesos que contribuyan al desarrollo de LES, de esta manera el enfoque genético puede ser utilizado como una herramienta de diagnóstico, para elucidar la predisposición de desarrollar enfermedades, así como en los tratamientos a futuro.

**Objetivo.** Determinar el patrón de expresión diferencial de miRNAs circulantes en individuos con susceptibilidad genética a LES.

**Material y métodos.** Se incluyeron individuos sanos mayores de 18 años, que las últimas dos generaciones de su familia hayan nacido en México y que aceptaron firmar el consentimiento informado. La extracción en sueros se llevó a cabo a través del método de TRIzol adicionando un spike (Ce miR-39 sintético) como control interno. Los datos de expresión se analizarán con base en el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Resultados.** Se obtuvieron los valores de expresión para cada una de las muestras analizadas. Falta por realizar la clasificación de los individuos en portadores y no portadores del haplotipo por medio de un ensayo de genotipificación.

**Conclusiones.** Se consiguió establecer las condiciones para la extracción de RNA total a partir de muestras de suero y se pudieron identificar miR-21, miR-145, miR-146a, miR-223, miR326 y miR-371b.