

REVISIONES

MicroRNAs, mecanismo epigenético para estudiar la enfermedad celiaca

Karla A. Bascuñán Gamboa¹, Magdalena Araya Quezada² y Francisco Pérez Bravo¹

¹Laboratorio de Nutrigenómica. Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile. ²Laboratorio de Inmunogenética. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA). Universidad de Chile. Santiago, Chile

RESUMEN

Este artículo pone al día los conceptos básicos de la enfermedad celiaca (EC) y resume los hallazgos sobre los microRNAs (miRNAs) en procesos biológicos asociados a la regulación de la inflamación crónica y autoinmunidad. Los miRNAs, una nueva clase de moduladores de la expresión génica a nivel post-traduccional, son moléculas de RNA pequeñas y no codificables que se unen a secuencias complementarias de RNAs mensajeros específicos, que pueden interferir con la síntesis de proteínas. Se revisaron los estudios publicados que evaluaron los patrones de expresión de miRNAs en diferentes Enfermedades Autoinmunes (EAI) y especialmente en la EC. La EC es una enteropatía crónica del intestino delgado provocada por proteínas del gluten, caracterizada por una respuesta inmune alterada en individuos genéticamente susceptibles, que se traduce en daño de la mucosa del intestino delgado. Esta enfermedad tiene una alta prevalencia y un tratamiento efectivo a través de una dieta libre de gluten. En la patogenia de esta enfermedad se ha demostrado que factores genéticos otorgan susceptibilidad, pero no explican el total de los casos.

El estudio de la función de los miRNA es de particular interés en la EC, dado que este mecanismo epigenético ha sido recientemente descrito en la patogenia de las EAI e inflamatorias. El estudio de los miRNA en la EC contribuirá a dilucidar cómo alteraciones en la regulación epigenética participarían en el desarrollo y evolución de esta enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad celiaca. miRNAs. Epigenética. Autoinmunidad.

Bascuñán Gamboa KA, Araya Quezada M, Pérez Bravo F. MicroRNAs, mecanismo epigenético para estudiar la enfermedad celiaca. *Rev Esp Enferm Dig* 2014;106:325-333.

Recibido: 26-11-2013
Aceptado: 10-03-2014

Correspondencia: Francisco Pérez Bravo. Laboratorio de Nutrigenómica. Departamento de Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Avenida Independencia 1027, Independencia. Santiago, Chile
e-mail: fperez@med.uchile.cl

ABSTRACT

This article summarizes recent findings on the role of microRNAs in biological processes associated with the regulation of chronic inflammation and autoimmunity. miRNAs are small non-coding RNA molecules that have been recently emerged as a new class of modulators of gene expression at the post-transcriptional level. MiRNAs bind to complementary sequences of specific targets of messengers RNA, which can interfere with protein synthesis. We reviewed studies that evaluated the expression patterns of miRNAs in different autoimmune diseases, especially in celiac disease (CD). CD is a chronic enteropathy triggered by gluten proteins, characterized by altered immune responses in genetically susceptible individuals that results in damage to the bowel mucosa. CD has a high prevalence and an effective treatment by a specific diet ("gluten free diet"). Genetic factors confer susceptibility but do not explain the whole disease, suggesting that environmental factors do play a relevant role in the development of the condition.

The evaluation of the potential role of miRNA is of particular interest in CD given that these epigenetic mechanisms in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases have been recently described. Improving our understanding of miRNAs in CD will contribute to clarify the role of altered epigenetic regulation in the development and course of this disease.

Key words: Celiac disease. miRNAs. Epigenetics. Autoimmunity.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.
CU: colitis ulcerosa.
DMI: diabetes mellitus 1.
EAI: enfermedades autoinmunes.
EC: Enfermedad celiaca.
EII: enfermedad inflamatoria intestinal.
EM: esclerosos múltiple.
GWAS: Genome-wide association study.
HLA: Human leucocyte antigen.
IgA: inmunoglobulina A.
IL-1 β : Interleukina 1 beta.

LES: lupus eritematoso sistémico.
 INF γ : interferón gamma.
 miRNAs: microRNAs.
 NF κ B: factor nuclear kappa B.
 Pre-miRNA: miRNA prematuro.
 Pri-miRNA: miRNA primario.
 RNA: ácido ribonucleico.
 RNAasa: RNA polimerasa.
 RNAm: RNA mensajero.
 SNP: Single nucleotide polymorphism.
 TG2: transglutaminasa de tejido 2.
 TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.
 tTG: anti-transglutaminasa tisular.
 T reg: células T reguladoras.
 UTR: Untranslated region.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía mediada por el sistema inmune y considerada una de las enfermedades heredables más complejas, siendo la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos del 75 % (1,2). Los haplotipos HLA (Human Leucocyte Antigen) DQ2/DQ8 confieren la carga más alta heredable estimada comunicada hasta el momento (cerca al 35 %) (3).

La exposición a la gliadina, proteína componente del gluten, es el factor principal asociado a la aparición de los síntomas de la EC, desencadenando una respuesta inmune inapropiada en individuos portadores de haplotipos HLA de riesgo. No obstante, la presencia de estos es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de EC. De hecho, aproximadamente el 30 a 40 % de los sujetos sanos poseen alelos HLA de riesgo (4,5). En el caso de los factores genéticos no asociados a HLA, estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association study*) actualmente han descrito varios loci de susceptibilidad, cada uno de los cuales se asocia con riesgo de desarrollar EC (6). Un área potencialmente interesante es el papel de los mecanismos de regulación epigenéticos en la EC, un aspecto que ha sido investigado escasamente hasta ahora.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños ácidos ribonucleicos (RNAs) no codificables, de entre 20 a 25 nucleótidos, que modulan la expresión génica a través de la base canónica de emparejamiento a secuencias complementarias en el 3'-*untranslated region* (UTR) del RNA mensajero (RNAm) objetivo (7). Desde su identificación en 1993 (8), se ha demostrado que su función es relevante, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (9). Ellos participan en la regulación de la expresión génica en una variedad de procesos biológicos, como trastornos autoinmunes (10), el desarrollo de células inmunes maduras y en el control de su función (11,12).

En este artículo analizaremos los conceptos básicos de la EC y revisaremos la evidencia disponible acerca de la

participación que podrían tener los miRNAs en la modulación de la expresión génica en autoinmunidad, con especial énfasis en la EC.

ENFERMEDAD CELIACA

En las últimas décadas ha variado sustancialmente la conceptualización de la EC. Esto, a partir del uso de anticuerpos plasmáticos, del tipo anti-endomisio y anti-transglutaminasa tisular (tTG), para una búsqueda activa de los individuos afectados. Históricamente, la enfermedad se conocía a partir de biopsias de intestino delgado de pacientes, en las que un daño intenso de la mucosa confirmaba el diagnóstico. Se la consideraba una enfermedad digestiva que afectaba principalmente a los niños y que era poco frecuente en los adultos. Sin embargo, estudios realizados en las últimas décadas han revelado que afecta igualmente a los adultos, apareciendo incluso con mayor frecuencia que en la edad infantil (13,14).

La EC infantil aparece típicamente durante los primeros años de vida, después de un tiempo de introducir el gluten en la alimentación; la presentación clínica más frecuente es la llamada "clásica", caracterizada por un predominio de manifestaciones digestivas, diarreas con síndrome de malabsorción característico, pérdida de peso, y deficiencias nutricionales y de vitaminas (15). En el adulto, la EC suele presentarse de forma clínicamente poco evidente, con menor sintomatología digestiva, ausencia de síndrome de malabsorción y menor frecuencia de aplanamiento vellositario intenso detectable, caracterizada, en cambio, por frecuentes manifestaciones extradigestivas y diversas enfermedades asociadas, generalmente autoinmunes, lo que dificulta su diagnóstico (16,17); hoy en día estas formas se denominan "atípicas". Un estudio que evaluó las diferencias en las presentaciones clínicas y el cuadro al momento del diagnóstico, en un grupo de pacientes diagnosticados en la infancia *versus* otro diagnosticado en la edad adulta, mostró que en los celíacos diagnosticados en la infancia, hubo un predominio de la presentación clásica de la EC, con una mayor positividad de la serología y aplanamiento vellositario y un menor retraso diagnóstico en relación a los diagnosticados en la edad adulta, en los cuales, por el contrario, predominaron las formas atípicas, con menor positividad de la serología y formas histológicas más leves. En ellos, también fueron más frecuentes las EAI asociadas y existió un mayor retraso diagnóstico (18). Actualmente, los datos de prevalencia provienen de estudios basados en los niveles séricos de anticuerpos anti-tTG, principalmente del tipo inmunoglobulina A (IgA-tTG). Cuando estos estudios se completan con una biopsia intestinal en individuos seropositivos, la frecuencia de EC disminuye, pero aún así es mucho mayor que la conocida anteriormente, con un rango descrito entre 1:70 a 1:500 habitantes (19). Esto se debe a que los anticuerpos mencionados permiten identificar individuos afecta-

dos principalmente por el componente autoinmune de la enfermedad, que a menudo coincide con sintomatología digestiva de baja intensidad.

El diagnóstico serológico de la EC basado únicamente en la positividad de la serología no es aceptado en la actualidad. La Guía ESPGHAN de 2012 (20) indica que en los niños pequeños, que presentan un cuadro muy sintomático y clásico y con niveles de tTG IgA > 100 U/ml constituirían la excepción a la regla y no requieren de biopsia para hacer el diagnóstico (21).

Así, hoy en día el concepto es que la EC es una enfermedad frecuente, afectando aproximadamente al 1 % de la población (22), tanto a niños como adultos, que puede aparecer en cualquier momento de la vida y que tiene un componente genético y autoinmune relevante en todas sus presentaciones clínicas (22). En la actualidad, uno de los principales desafíos lo constituye el entender las interacciones entre los factores genéticos, el ambiente y el sistema inmune, que permitan comprender la variabilidad clínica que se observa. En relación a la genética, la incapacidad de explicar la totalidad de la enfermedad ha llevado a estudiar el genoma completo y por otra parte, la epigenética aparece como un campo interesante, temas que serán revisados en las próximas secciones. La participación de los microRNAs como mecanismo epigenético, se avizora como una herramienta relevante para entender cómo la alteración de la regulación génica participa en la aparición y curso de la enfermedad.

Fisiopatología

La EC es una enteropatía autoinmune, crónica, que se desarrolla en el intestino delgado, la cual es desencadenada por proteínas del gluten presentes en el trigo, centeno y cebada en individuos genéticamente susceptibles, que resulta en daño de la mucosa del intestino delgado. Sus características histológicas típicas son el aumento de linfocitos intraepiteliales, aplanamiento de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas y una marcada infiltración de células inflamatorias en la lámina propia. La eliminación del gluten de la dieta del paciente habitualmente resulta en una rápida recuperación de la mucosa intestinal, que se acompaña de la mejoría sustancial de la absorción de nutrientes. Por tanto, el tratamiento con una dieta libre de gluten es suficiente para una amplia mayoría de pacientes con EC, evidenciándose mejorías clínicas tras pocas semanas (23).

La descripción de la patogénesis de la EC ha mostrado que las células T CD4 tienen una función principal en la iniciación y organización de la respuesta patológica (24). Un modelo que ha sido propuesto para conceptualizar el papel de la respuesta adaptativa de las células T en la patogénesis de EC incluye eventos lumbales, epiteliales y aquellos propios de la mucosa, incluyendo la activación de linfocitos T (25). Dentro de los eventos lumbales

involucrados, la digestión del gluten es el evento primario; este es digerido a péptidos, pero debido a la falta de endopeptidasas proliil en la vellosidades intestinales y en las secreciones gástricas y pancreáticas, péptidos residuales de gluten relativamente grandes, ricos en prolina y glutamina, permanecen después de la digestión inicial. Para el 99 % de los individuos, entre ellos la mayoría de los que llevan los alelos de susceptibilidad para EC (HLA-DQ2 y HLA-DQ8), esto no representa un problema, al menos en términos del desarrollo de EC (25).

Péptidos de gluten parcialmente digeridos acceden a las células presentadoras de antígenos en la región subepitelial del intestino delgado. La vía a través de la cual ingresa el gluten aun no está completamente determinada, pero podrían incluir el paso paracelular a través de una capa dañada de células epiteliales o bien el paso transepitelial (26). Una infección transitoria u otra causa de inflamación en el intestino delgado establecerían el escenario adecuado para una respuesta de células T de la mucosa a los péptidos de gluten. Después de haber establecido las condiciones para el desarrollo de una respuesta de tipo Th1, los péptidos de gluten unidos a HLA-DQ2 o HLA-DQ8 activan a células T que inician la producción de citocinas Th1. Finalmente, la liberación de IFN- γ y otras citocinas, que perpetúan esta respuesta y alteran las funciones de la mucosa, principalmente la permeabilidad intestinal, resultaría en la activación y liberación de metaloproteínas que serían responsables del desplome de la arquitectura de la lámina propia (27).

Genética

La EC es un desorden multigénico que involucra factores de riesgo genéticos asociados y no asociados a HLA. Para el primer caso, los principales factores de riesgo se encuentran codificados en las moléculas HLA clase II, del tipo HLA DQ2/DQ8. Cerca del 90 % y el 10 % de los individuos con EC son portadores del heterodímero DQ2 y DQ8, respectivamente (28). Los péptidos de gliadina deamidados tienen una alta afinidad de unión por moléculas HLA DQ2 y DQ8, lo cual explica la inmunogenicidad del gluten en individuos que las portan (29). La transglutaminasa de tejido (TG2) es una enzima altamente ubicua, que modifica los péptidos de gluten que atraviesan el epitelio intestinal mediante deamidación (30). Este proceso de deamidación introduce cargas negativas en la posición favorable para el acople con las moléculas HLA DQ2 y DQ8, logrando expandir la presentación de péptidos de gluten, y por consecuencia el aumento de células T CD4 específicas para gluten.

Para mejorar la comprensión de los factores genéticos no asociados a HLA en la EC, el componente genético ha sido extensamente estudiado a través de estudios de asociación del genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association study*), los cuales proporcio-

nan un abordaje general que permite identificar genes y vías involucradas en un determinado fenotipo. El primer GWAS para EC fue realizado en Inglaterra en el año 2007 e incluyó 778 pacientes con EC y 1.422 controles (31). Los resultados mostraron que a demás de las regiones HLA, 13 regiones en el genoma se asociaron a EC. La mayoría de las regiones identificadas contenían genes que controlan la respuesta inmune, tales como el locus IL2-IL21 en el cromosoma 4q27, lo que sugiere, por primera vez, el potencial papel de la IL-2, una citocina importante para la homeostasis y función de las células T, y de IL21, un nuevo miembro de la superfamilia de citocinas tipo 1 que regula muchas otras células inmunes y no inmunes (31). Este primer estudio GWA reveló también el fenómeno de pleiotropía, es decir, que las variantes genéticas asociadas a EC están también asociadas con otras enfermedades relacionadas con la inmunidad (32). Un segundo estudio GWAS, que incluyó más de 4.500 pacientes con EC y cerca de 11.000 controles provenientes de cuatro poblaciones diferentes (Inglaterra, Italia, Finlandia y Holanda) arrojó como resultado la identificación de 13 nuevas regiones que alcanzaron significancia; la mayoría de los genes identificados poseen funciones inmunes, junto a un importante papel regulador en la selección de las células T del timo (*THEMIS/PTPRK*) (33,34).

Hasta el momento, el estudio de la genética en las EAI ha sido en genes que codifican a proteínas, esperando encontrar un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) que altere la secuencia de proteínas y así su función. Sin embargo, uno de los más sorprendentes hallazgos indica que solo tres de los 57 SNPs independientes identificados afectan la secuencia proteica en sujetos con EC (*MMEL1*, *SH2B3* y *IRAK1*) (34). Recientemente se han identificado SNPs que se encuentran en regiones intrónicas e intergénica del genoma, sugiriendo que la regulación transcripcional de estos genes es afectada por SNPs de riesgo para EC. Existen diversas vías a través de las cuales se podría ejercer un efecto en la transcripción, ya sea alterando o creando sitios de unión para factores de transcripción o modificando sitios de unión de complejos proteicos reguladores de cromatina, traduciéndose en un efecto epigenético que podría afectar la metilación del ADN, junto con la modificación de histonas (35,36). Por otro lado la asociación de EC a genes que afectan secuencias 3' UTR, podrían conducir a una disminución en la estabilidad o un aumento en la degradación de los respectivos RNAm. Por otro lado, podrían promover la inhibición de la traducción de proteínas por alterar sitios de unión de RNAs o por afectar sitios de unión a miRNAs (6).

EPIGENÉTICA

La epigenética es el estudio de los cambios en la función de los genes, heredable y que no implica un cambio en la

secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) (37). La condición de heredable, implica que los marcadores epigenéticos tienen la habilidad de persistir durante el desarrollo y ser potencialmente transmitidos de generación en generación (38). El principal rol de la epigenética es la regulación de genes. Este proceso es clave en: a) la modulación individual de genes y su actividad; b) grupos de genes que son funcionales en cada tipo de célula específica, en el desarrollo y diferenciación de tipos celulares; y c) en la plasticidad metabólica celular, característica que le permite adaptarse a los cambios exógenos.

Hay diferentes mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica, ya sea activándola o reprimiéndola. La metilación del ADN, la modificación de histonas, el posicionamiento de nucleosomas y los miRNAs, son ejemplos de ellos. Es importante destacar que estos mecanismos pueden actuar en conjunto regulando la expresión génica (39). La epigenética está levantándose como una potente herramienta de estudio en las EAI en que hay un fuerte componente genético conocido, pero en los que la genética no explica la totalidad del cuadro. La EC tiene alta prevalencia y los factores genéticos explican buena parte pero no toda la enfermedad. Los HLA DQ2/DQ8 son los principales factores de susceptibilidad identificados, los genes no HLA no han sido exitosos y continúan siendo materia de estudio, y por eso se postula que la epigenética podría ser una herramienta que aporte a comprender la patogenia de la enfermedad. En este artículo se revisa la evidencia publicada acerca de miRNAs, uno de los 4 más conocidos mecanismos utilizados en la epigenética, en relación a la EC. Como los datos son escasos, se revisan además otras EAI en las cuales se han evaluado miRNAs, tales como artritis reumatoide, psoriasis, diabetes tipo 1, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple (EM) y enfermedad inflamatoria intestinal todas condiciones que comparten cambios de expresión en ciertos miRNAs.

microRNAs

Los miRNAs son una clase de RNA endógenos, pequeños y no codificables, de una sola hebra y que regulan la expresión génica mediante el control de la estabilidad y la traducción de los RNAm (40-42). Algunos de los procesos biológicos regulados por miRNAs, incluyen la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y el control del ciclo celular (42-44). La transcripción de genes primarios de miRNAs (pri-miRNA) es llevado a cabo inicialmente por la RNA polimerasa (RNAasa) II o III en el núcleo; a continuación el complejo microprocesador, compuesto por Drosha y sus proteínas asociadas (*DGCR8/Pasha*) procesan al pri-miRNA nuclear a una hebra precursora madre de aproximadamente 70 nucleótidos, generando un miRNA prematuro (pre-miRNA) (45-47). Los pre-miRNAs se exportan al citoplasma donde son escindidos a 21 nucleó-

tidos de miRNA doble hebra por la enzima RNAasa III Dicer, junto con su proteína asociada TRBP (*transactivator RNA binding protein*). A continuación una hebra es incluida dentro del complejo RISC (*del inglés, RNA-induced silencing complex*) y guía a este complejo a las regiones no traducibles 3' de las secuencias de RNAm al cual está dirigido u "objetivo" induciendo la degradación del RNAm suprimiendo la expresión de la proteína (48,49) (Fig. 1).

Los miRNAs se unen a sus RNAm objetivos mediante apareamiento de bases de ARN-ARN. La secuencia de unión de miRNA al RNAm objetivo se denomina generalmente como elemento de reconocimiento de miRNA (ERM, del inglés *miRNA recognition element*) (51). El mecanismo cómo los miRNAs silencian a sus RNAm continúa siendo poco claro. Sin embargo, actualmente se sabe que una hebra complementaria de miRNA de al menos 6 nucleótidos es suficiente para llevar a cabo las funciones de regulación postraduccional asociadas a los miRNAs, un solo miRNA podría actuar sobre varios cientos de RNAm objetivo y cada RNAm puede ser objeto de la acción de numerosos miRNAs. Por esta razón, se han propuesto varios grados de interacciones, incluyendo entre ellas la degradación de proteínas, la inhibición de la elongación de la traducción, la terminación prematura de la traducción y la inhibición de la iniciación de la traducción (52).

Si la complementariedad entre el miRNA y el RNAm objetivo es parcial, la traducción del RNAm objetivo se reprime, pero sin afectar los niveles de RNAm. Sin embargo, en casos donde existe una complementariedad perfecta o extensa, el RNAm objetivo se deadenila y es desestabilizado por escisión endonucleolítica y por lo tanto se impide la síntesis de proteínas por la degradación del RNAm objetivo en la célula (53).

miRNAs EN EL CONTROL DE LA AUTOINMUNIDAD

Desde el descubrimiento de los miRNAs, varios trabajos han mostrado que podrían desempeñar un papel en las EAI (10,54). Es bien sabido que los miRNAs están involucrados en el desarrollo de células inmunes y en el control de sus funciones (11,12). A la fecha, se han asociado diversos miRNAs a condiciones patológicas del sistema inmune. Estudios recientes revelan que los miRNA no regulan solamente el desarrollo de células de la inmunidad innata o adaptativa, sino que también el delicado equilibrio de su respuesta (55).

La expresión aberrante de miRNAs en algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes ha sido motivo de amplia investigación, ya que podrían afectar transcritos claves en la

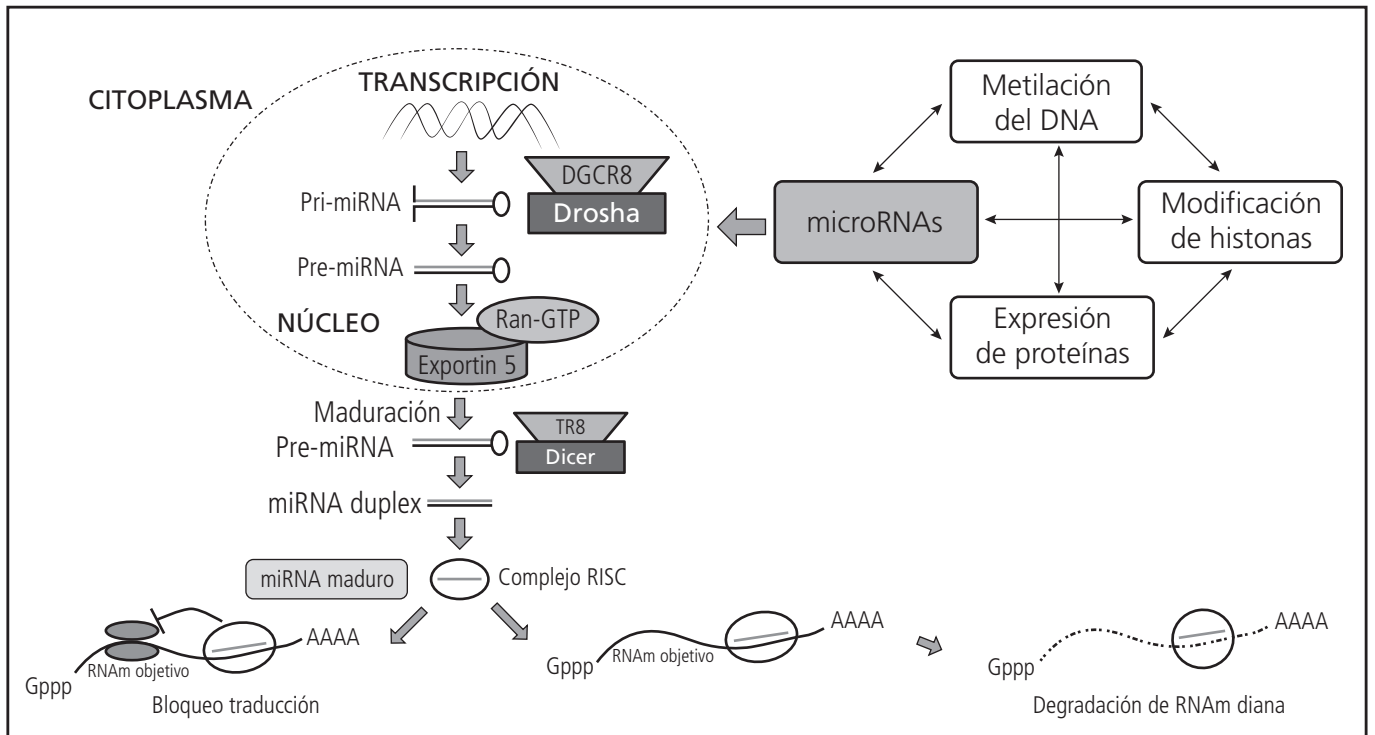


Fig. 1. Epigenética y biogénesis de miRNAs. La regulación epigenética de la expresión génica puede estar conducida a través de diferentes mecanismos, los cuales pueden activar o reprimir la expresión de genes. La expresión de proteínas resultante del actuar de estos mecanismos finalmente se traducirá en el fenotipo observado. MiRNAs son traducidos desde el genoma, siendo procesados en el núcleo, para posteriormente exportarse al citoplasma. Cargados en el complejo RISC, pueden acoplarse específicamente a secuencias de RNA mensajero para reprimir la traducción de proteínas.

aparición de estas patologías (56). Por ejemplo, en la artritis reumatoide, se ha descrito que miR-155 y miR-146 están sobreexpresados en fibroblastos sinoviales de pacientes en relación a sujetos sanos. La expresión de miR-155 es aumentada por moléculas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleuquina 1 beta (IL-1 β), aumento que produce un efecto inhibitorio en la expresión de metaloproteínas en fibroblastos sinoviales (57). Por otro lado, miR-146, miRNA cuya función es restringir la vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) es sobre-regulado por citocinas pro-inflamatorias (58,59). En el caso de psoriasis, se ha descrito una sobreexpresión de miR-21 y miR-146a en muestras de piel de pacientes en relación a individuos saludables, mientras que para la misma patología miR-125b estuvo sub-expresado (60). En el caso de la diabetes mellitus tipo 1, existen pocos estudios relacionados a miRNAs y su patogénesis; sin embargo, existen algunas hipótesis que sugieren que la función de las células T reguladores (T regs) es influenciada por cambios en la expresión de miRNAs específicos. En T regs de pacientes diabéticos existe un aumento en la expresión de miR-510 y una disminución en la expresión tanto de miR-342 como de miR-191, miRNAs cuya función exacta es aún desconocida. Existen otros estudios en los cuales se ha demostrado que los miRNAs podrían ser la causa de la citotoxicidad mediada por citocinas de las células β pancreáticas. Esta toxicidad es alcanzada cuando IL-1B y TNF- α inducen la expresión de miR-21, miR-34a y miR-146a en los islotes pancreáticos, produciendo una falla en las células β por un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias (61,62).

En el caso del lupus eritematoso sistémico (LES), se ha demostrado que la mayoría de los genes relacionados a esta patología contienen a lo menos un sitio blanco para miRNAs. Por ejemplo, miR-146a es un regulador negativo de la señal de los receptores *Toll-like* y su expresión está disminuida en pacientes con LES. También, este miRNA es un regulador negativo de la vía de señalización de IFN tipo I, llevando a cabo su función a través de la regulación del factor de regulación de interferón 5 y de la proteína de transducción de señales y transcripción, STAT-1. Por lo tanto, la disminución de la expresión de miR-146a en las células mononucleares de sangre periférica podría contribuir al aumento en la producción de IFN tipo 1 en el LES (63). Otro miRNA que regula la inmunidad de las células T y B es miR-155, cuya sobre-regulación en linfocitos T y B podría llevar a la activación anormal de células B y al anormal desarrollo de células T inflamatorias en pacientes con LES (64,65).

La esclerosis múltiple (EM) es otro desorden autoinmune en cuya patogénesis se ha involucrado a los miRNAs. Un estudio reciente mostró que miR-326 juega un rol fundamental mediando la sobre-regulación de la diferenciación de las células Th-17, porque inhibe Est-1 que es un regulador negativo de la diferenciación de estas células; miR-326 se encontró significativamente sobre-regulado en pacientes con EM remitente-recidivante, produciendo un aumento en el número de células Th-17 y de síntomas

severos de la enfermedad (66). Se han descrito otros miRNAs en esta patología, como miR-34a y miR-155, que estarían sobre-regulados en la EM activa, actuando sobre CD47. Esta última es una proteína de membrana que permite el reconocimiento y evita la fagocitosis por células especializadas. Macrófagos con bajos niveles de esta molécula son liberados de esta señal de control inhibitorio, lo cual causaría un aumento en la fagocitosis de mielina en la EM. También miR-155 promovería el desarrollo de células inflamatorias del tipo Th-1 y Th-17 (67).

Para el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en el año 2008, Wu y cols. (68) fueron los primeros en reportar la expresión de miRNAs en muestras de mucosa colónica de pacientes con EII. Identificaron 11 miRNAs expresados diferencialmente en colitis ulcerosa (CU) vs. controles y demostraron una relación inversa entre la quimiocina denominada proteína inflamatoria de macrófagos 2 alfa, previamente implicada en la EII (69) y miR-192. Del mismo modo, Bian y cols. (70) encontraron una sobreexpresión significativa de miR-150 en la mucosa inflamada de colon de pacientes con CU, en comparación con controles y establecieron una correlación inversa entre miR-150 y su RNAm objetivo c-Myb, un proto-oncogén que está implicado en la apoptosis (71). Por otro lado y para el caso específico de la enfermedad de Crohn, un reciente estudio mostró que una mutación silente en el marco de lectura del gen IRGM, un gen requerido para la autofagia de bacterias intracelulares, actúa como una variante funcional, por alterar el sitio objetivo de unión para miR-196, encontrándose que las variantes IRGM protectora poseen un sitio blanco para miR-196, lo cual normalmente resulta en una disminución en la cantidad de proteínas IRGM celular en células epiteliales inflamadas. Esta observación proporciona la primera evidencia de que una mutación silente puede ser clínicamente significativa (72).

miRNAs EN LA ENFERMEDAD CELIACA

A la fecha, y a pesar del aumento de estudios relacionados a miRNAs en patologías autoinmunes, los datos relacionados a la EC son escasos. Un estudio recientemente desarrollado, resaltó la importancia de los miRNAs en la diferenciación y función del epitelio intestinal de ratones. Los autores cuantificaron el perfil de expresión de la totalidad de los miRNAs presentes en la mucosa intestinal y determinaron la contribución de los miRNAs a la homeostasis intestinal. Para esto último se utilizaron ratones deficientes en la proteína Dicer. El estudio identificó 453 familias de miRNAs, destacando a mmu-miR-192 como el más altamente expresado, tanto en intestino delgado como grueso. En el caso de los ratones deficientes de Dicer, el epitelio intestinal apareció desorganizado con una disminución de las células caliciformes y un aumento importante en la apoptosis en las criptas ubicadas en el yeyuno y colon, además de una acelerada migración de células en el yeyuno. Junto a esto se observó una función

de barrera intestinal alterada, resultando en inflamación intestinal con infiltración de linfocitos y neutrófilos. Por tanto, los autores concluyen que Dicer poseería un rol vital en la diferenciación y función del epitelio intestinal (43).

Por otro lado, Capuano y cols., estudiaron biopsias de niños celíacos y encontraron que la expresión de cerca del 20 % de los miRNAs analizados en las biopsias de intestino delgado fueron diferentes a los encontrados en los controles, independientemente de si la enfermedad estaba activa o no. El estudio de los pacientes celíacos mostró altos niveles de expresión de miR-449a y una asociación inversa entre la sobreexpresión de miR449a, la señalización NOTCH1 (crucial en la mantención de la homeostasis del intestino por controlar la proliferación y diferenciación celular), y la producción de las células caliciformes, dos manifestaciones características del intestino delgado de pacientes celíacos (73). El reporte más reciente, que analizó la expresión de miRNA en mucosa duodenal de pacientes celíacos adultos, fue llevado a cabo en sujetos con EC no tratada, los cuales mostraban una presentación clásica o anemia por deficiencia de hierro, pacientes tratados con o sin normalización de la mucosa duodenal y sujetos controles sin EC. Los autores reportaron la desregulación de siete miRNAs (miR-31-5p, miR-192-3p, miR-1945p, miR-551a, miR-551b-5p, miR-638, and miR-1290) en pacientes con diferentes fenotipos clínicos en comparación con sujetos sin EC. Estos 7 miR-

NA fueron analizaron a continuación en fibroblastos duodenales obtenidos a partir de pacientes con EC y se incubaron con péptidos de gliadina (13 y 33mer). El grupo de miRNA miR-192/194, implicados en la remodelación de la matriz, se encontró desregulado en EC, con variaciones según las diferentes presentaciones clínicas. La expresión de miR-192-3p estuvo disminuida en fibroblastos derivados de pacientes con EC al estimularlos con péptidos de gliadina, mientras que su expresión permaneció invariable en fibroblastos de sujetos controles. Los autores concluyen que el análisis de miRNAs merece especial consideración, especialmente como potencial herramienta en el tratamiento y manejo de la EC (74).

El estudio de miRNAs en EC se ha realizado principalmente en células del epitelio intestinal. La regulación de la expresión génica en el epitelio intestinal es compleja y controlada por diferentes vías de señalización que regulan el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación, las cuales se ven afectadas en patologías como la EC (75). Sería relevante determinar el funcionamiento de los miRNAs en las células del sistema inmune, ya sea local o sistémicamente, para entender cómo estas moléculas estarían participando en la patogenia de la EC. Estudios en esta área son necesarios para determinar la relevancia de la expresión de los miRNAs en el funcionamiento del sistema inmune de pacientes con EC (Fig. 2).

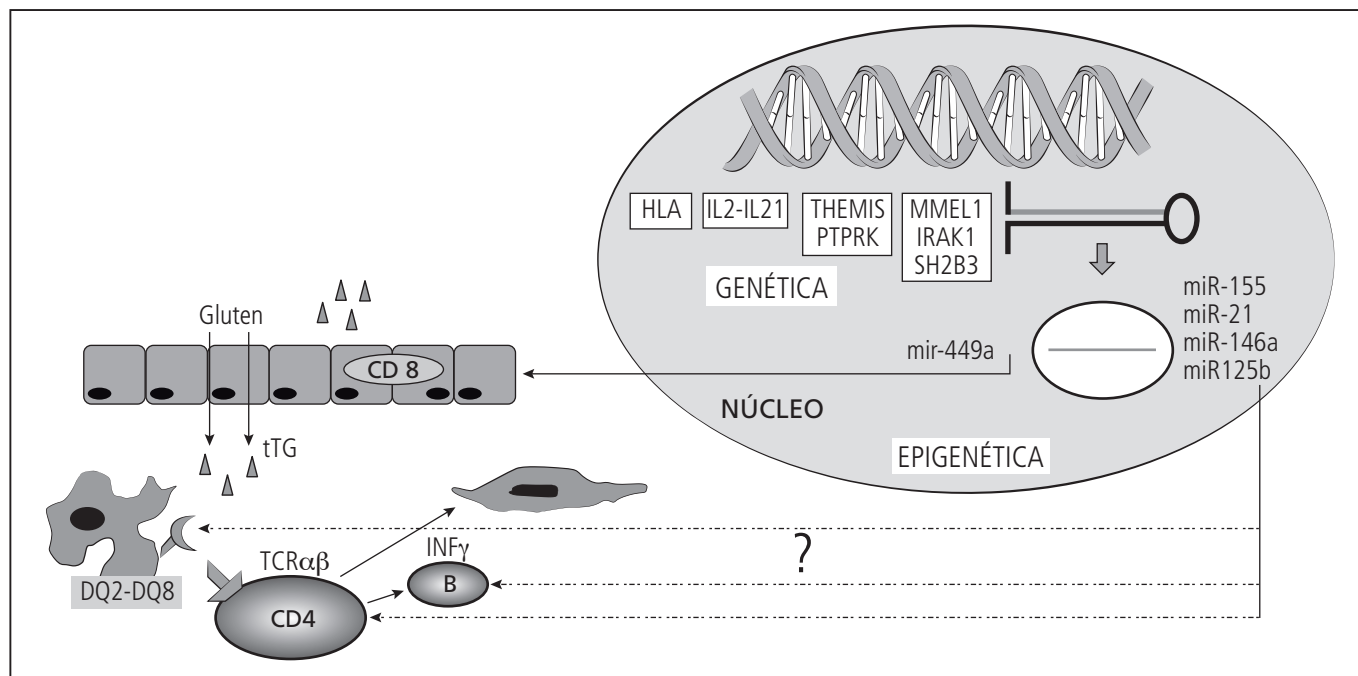


Fig. 2. Genética y epigenética en enfermedad celíaca. La enfermedad celíaca posee una reconocida susceptibilidad genética dada por las moléculas HLA DQ2-DQ8 responsables de la presentación antigénica de los péptidos de gluten deamidados por la transglutaminasa (tTG) a linfocitos T CD4. Estos últimos son responsables de amplificar la respuesta a través de la liberación de citocinas y/o la activación de otras células del sistema inmune que dan cuenta de la mayoría de los signos y síntomas de la enfermedad. Existen otros loci descritos que otorgarían susceptibilidad a esta patología, cada uno de los cuales se asocia a un bajo riesgo de desarrollar la enfermedad. miRNAs regulan la proliferación y diferenciación de células epiteliales. La expresión de miRNAs relacionados a la inflamación y EAI, podrían estar modulando la expresión de proteínas o moléculas objetivos involucradas en esta patología.

CONCLUSIONES

Los miRNAs son importantes en la diferenciación y función del epitelio intestinal, poseen un rol relevante en la regulación de la expresión génica en condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo los desórdenes inflamatorios y autoinmunes. Dado que se sabe poco sobre los determinantes moleculares que sustentan la patogénesis de la EC, la investigación de los perfiles de miRNA en estos pacientes resulta de especial interés. La actual evidencia existente acerca de la interacción que podría existir entre los miRNAs y el espectro de patologías autoinmunes abre una nueva puerta al estudio en la EC. En la actualidad, existen reportes que indican una expresión alterada de patrones de miRNAs en sujetos con distintas presentaciones de EC en comparación con controles sanos; esto sugiere un importante papel de los miRNAs como nuevos biomarcadores para distinguir los pacientes con diferentes cuadros clínicos. Perfiles específicos de miRNAs podrían contribuir al manejo individualizado de un paciente, transformando el enfoque clínico generalizado a uno personalizado. Por otro lado, estos moduladores génicos, podrían contribuir a dilucidar cómo alteraciones epigenéticas participan en el desarrollo y evolución en la EC.

BIBLIOGRAFÍA

- Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 2006;55:803-8.
- Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002;50:624-8.
- Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 2009;137:1912-33.
- Hunt KA, van Heel DA. Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut* 2009;58:473-6.
- Sacchetti L, Calcagno G, Ferrajolo A, Sarrantonio C, Troncone R, Micillo M, et al. Discrimination between celiac and other gastrointestinal disorders in childhood by rapid human lymphocyte antigen typing. *Clin Chem* 1998;44:1755-7.
- Kumar V, Wijmenga C, Withoff S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: Celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Semin Immunopathol* 2012;34:567-80.
- Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:252-63.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.
- Pauley KM, Chan EK. MicroRNAs and their emerging roles in immunology. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:226-39.
- Pauley KM, Cha S, Chan EK. MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32:189-94.
- Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* 2007;21:578-89.
- Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One* 2007;2:e1020.
- O'Leary C, Wieneke P, Healy M, Cronin C, O'Regan P, Shanahan F. Celiac disease and the transition from childhood to adulthood: a 28-year follow-up. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2437-41.
- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekela I, Patrikainen H, Valve R, et al. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol* 2009;9:49.
- Savilanti E, Kolho KL, Westerholm-Ormio M, Verkasalo M. Clinics of coeliac disease in children in the 2000s. *Acta Paediatr* 2010;99:1026-30.
- Fernandez A, Gonzalez L, de-la-Fuente J. Coeliac disease: Clinical features in adult populations. *Rev Esp Enferm Dig* 2010;102:466-71.
- Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003;362:383-91.
- Rodrigo-Sáez L, Fuentes-Álvarez D, Pérez-Martínez I, Alvarez-Mieres N, Niño-García P, de-Francisco-García R, et al. Differences between pediatric and adult celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2011;103:238-44.
- Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:204-13.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:136-60.
- Vivas S, Ruiz de Morales JG, Riestra S, Arias L, Fuentes D, Alvarez N, et al. Duodenal biopsy may be avoided when high transglutaminase antibody titers are present. *World J Gastroenterol* 2009;15:4775-80.
- Reilly NR, Green PH. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Semin Immunopathol* 2012;34:473-8.
- Wahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol* 2002;118:459-63.
- Sollid LM. Celiac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2:647-55.
- Kagnoff MF. Celiac disease: Pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007;117:41-9.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2:361-7.
- Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989;169:345-50.
- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 2011;29:493-525.
- Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998;4:713-7.
- Van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zernakova A, Inouye M, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 2007;39:827-9.
- Hunt KA, Zernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet* 2008;40:395-402.
- Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 2010;42:295-302.
- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet* 2011;43:1193-201.
- De Gobbi M, Viprakasit V, Hughes JR, Fisher C, Buckle VJ, Ayyub H, et al. A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter. *Science* 2006;312:1215-7.
- Stefan M, Jacobson EM, Huber AK, Greenberg DA, Li CW, Skrabanek L, et al. Novel variant of thyroglobulin promoter triggers thyroid autoimmunity through an epigenetic interferon alpha-modulated mechanism. *J Biol Chem* 2011;286:31168-79.
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 2010;330:622-7.
- Wu C, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence. *Science* 2001;293:1103-5.

39. Quintero-Ronderos P, Montoya-Ortiz G. Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Dis* 2012;2012:593720.
40. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861-74.
41. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010;466:835-40.
42. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455:64-71.
43. McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, et al. MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology* 2010;139:1654-64, 64 e1.
44. Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. MicroRNAs: Key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 2008;27:5959-74.
45. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-60.
46. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097-101.
47. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231-5.
48. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123:631-40.
49. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
50. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, maturation, target recognition and regulatory functions. *Mol Cell Pharmacol* 2011;3:83-92.
51. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008;132:9-14.
52. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev* 2012;11:305-14.
53. Sonkoly E, Pivarcsi A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med* 2009;13:24-38.
54. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res* 2011;157:163-79.
55. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008;29:343-51.
56. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1001-9.
57. Li J, Wan Y, Guo Q, Zou L, Zhang J, Fang Y, et al. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R81.
58. Niimoto T, Nakasa T, Ishikawa M, Okuhara A, Izumi B, Deie M, et al. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:209.
59. Bostjancic E, Glavac D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 2008;17:95-102.
60. Roggli E, Britan A, Gattesco S, Lin-Marq N, Abderrahmani A, Meda P, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2010;59:978-86.
61. Mi QS, He HZ, Dong Z, Isales C, Zhou L. microRNA deficiency in pancreatic islet cells exacerbates streptozotocin-induced murine autoimmune diabetes. *Cell Cycle* 2010;9:3127-9.
62. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 2009;60:1065-75.
63. Calame K. MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity* 2007;27:825-7.
64. O'Connell RM, Kahn D, Gibson WS, Round JL, Scholz RL, Chaudhuri AA, et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. *Immunity* 2010;33:607-19.
65. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2009;10:1252-9.
66. Junker A, Krumbholz M, Eisele S, Mohan H, Augstein F, Bittner R, et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* 2009;132:3342-52.
67. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology* 2008;135:1624-35 e24.
68. Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, et al. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:807-21.
69. Bian Z, Li L, Cui J, Zhang H, Liu Y, Zhang CY, et al. Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis. *J Pathol* 2011;225:544-53.
70. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007;131:146-59.
71. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 2011;43:242-5.
72. Capuano M, Iaffaldano L, Tinto N, Montanaro D, Capobianco V, Izzo V, et al. MicroRNA-449a overexpression, reduced NOTCH1 signals and scarce goblet cells characterize the small intestine of celiac patients. *PLoS One* 2011;6:e29094.
73. Vaira V, Roncoroni L, Barisani D, Gaudioso G, Bosari S, Bulfamante G, et al. MicroRNA profiles in celiac patients distinguish different clinical phenotypes and are modulated by gliadin peptides in primary duodenal fibroblasts. *Clin Sci (Lond)* 2014;126:417-23.
74. Richmond CA, Breault DT. Regulation of gene expression in the intestinal epithelium. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;96:207-29.