



Pontificia Universidad
Católica del Ecuador

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA COMPUTACIONAL**

TEMA: Determinación de perfil de miARN en el tratamiento con interferón beta en
pacientes con esclerosis múltiple.

AUTOR: SALAZAR ANDRADE, ANDREA CRISTINA

DIRECTOR: GUEVARA BARRIENTOS, DAVID

QUITO

2023

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme seguir creciendo profesionalmente.

A mis padres, familia y compañeros que me acompañaron en este camino tan importante. A mi director de tesis David Guevara por su apoyo y ayuda incondicional.

Contenido

ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	4
Esclerosis múltiple	4
Interferón beta	5
microARN	5
OBJETIVOS	6
Objetivos específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
DISCUSIÓN Y CONCLUSION	18
BIBLIOGRAFÍA	20

TEMA: Determinación de perfil de miARN en el tratamiento con interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate the translation of messenger RNA. They are important for the diagnosis and treatment of cancer and some other autoimmune diseases, mainly multiple sclerosis (MS). Interferon beta is the first model therapeutic treatment to control the disease, due to its immunomodulatory effect for patients with MS. This study shows changes in miRNA expression in response to treatment with interferon beta. The samples obtained were from peripheral blood in patients with relapsing-remitting MS (RRMS). We measured the expression of 270 mature miRNAs with samples that were obtained using the NGS platform Illumina. We observed that the upregulation of beta-interferon-responsive genes was notable in men, while it was downregulated in women. Expressed miRNAs are involved in apoptotic processes and, besides being able to serve as biomarkers in biological effects, they can always help in future research to reduce the effects and progression of MS.

INTRODUCCIÓN

Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune que afecta al sistema nervioso central (SNC). Es una de las más comunes y se caracteriza por una desmielinización inflamatoria en el cerebro, la médula ósea y el nervio óptico (Bizzoco *et al.*, 2009). La enfermedad lleva a una alteración en la transmisión de señales neurológicas mediante la eliminación de la vaina de mielina (Milo y Kahana, 2010). La mielina permite que los impulsos eléctricos pasen de manera rápida y eficiente a las células nerviosas y, si esta se daña, esto se relaciona directamente con ataques que conducen a la discapacidad y deterioro de la función neurológica. Tiene varios síntomas que normalmente aparecen en personas de entre 20 y 40 años (Honardoost *et al.*, 2014). Es común en adultos, con mayor frecuencia en mujeres (Gourraud *et al.*, 2012), además de incluir factores genéticos, epigenéticos, microbianos y ambientales.

Existen varios tipos EM en que los pacientes muestran un único episodio desmielizantes (CIS) y procesa a un curso de EM remitente-recurrente (EMRR) con exacerbaciones agudas. (Miller *et al.*, 2012) En esta etapa puede mantenerse estable durante un tiempo específico, mientras que puede existir el empeoramiento donde aumentara la discapacidad durante un tiempo determinado.

Hay varias terapias modificadoras de la enfermedad que son eficaces cuando se aplica en la primera etapa de la enfermedad (Hecker *et al.*, 2013). Las inyecciones de interferón beta

recombinante (IFN-beta) se consideran una opción de primera línea en el tratamiento de la EMRR. Se ha demostrado que reduce el número de recaídas y suprime la acumulación de nuevas lesiones inflamatorias en el cerebro. (Abad *et al.*, 2010)

En Ecuador, en el año 2008, 159 pacientes de tres diferentes ciudades importantes del país como Quito, Cuenca y Guayaquil, se identificaron que los tratamientos tienen baja prevalencia por el número mínimo de pacientes que tienen la enfermedad (Correa-Díaz *et al.*, 2019). Sin embargo, la población más afectada es del sexo femenino en etapa adulta. Según Abad *et al.* (2010), el principal fenotipo en Ecuador es del tipo EMRR. La EMRR se caracteriza por un cuadro progresivo de discapacidad de al menos un año de evolución en ausencia de recaídas. Para el tratamiento se usó el interferón en altas dosis (44 mcg subcutáneo trisemanal) y también de baja dosis (30 mcg intramuscular una vez por semana) (Correa-Díaz *et al.*, 2019).

Interferón beta

El interferón beta es un medicamento inmodulador que tiene amplios efectos sobre la regulación génica de las células sanguíneas (Sospedra, 2005). Se cree que estos genes sensibles a IFN-beta mediante los efectos beneficiosos del tratamiento a través de procesos inmunomoduladores, antiproliferativos y antipatogénicos.

microARN

Los microARN (miARN) son pequeñas moléculas compuestas por moléculas monocatenarias cortas no codificantes que participan principalmente en la regulación de la expresión génica a través de la inhibición de la transcripción y la traducción. Están compuestas de 21 a 25 nucleótidos y regulan la expresión del ARNm a nivel postranscripcional. (Tufekci *et al.*, 2011) Principalmente están involucrados en la patología, siendo las que afectan principalmente las células inmunitarias periféricas. Los miARN son moléculas reguladoras clave en el núcleo y participan en la proliferación, diferenciación y apoptosis de varias células en todo el cuerpo. Sin embargo, varios estudios han demostrado que los miARN están involucrados en la EM, viéndose afectadas principalmente las células gliales y las células inmunitarias periféricas. Estas moléculas se han convertido en nuevas dianas diagnósticas y también han mostrado su potencial como biomarcadores. (Pérez y Eisele, 2022)

La formación de los miARN comienza en el núcleo. Con la ayuda de la ARN polimerasa II se transcriben los precursores de los miARN conocidos como miARN primarios que tienen una longitud variable de cientos de nucleótidos. Posteriormente, una RNasa III llamada Drosha los procesa y crea una horquilla de 60 a 70 nucleótidos llamada premiARN que, con la ayuda de la exportina-5, se transportan al citoplasma donde, a su vez, son procesados por la RNasa III Dicer para madurar miARN. Se unen junto con la proteína argonauta al complejo silenciador de ARN (RISC). Este complejo es el responsable último de degradar el ARNm o

de inhibir la traducción (Tsitsiou y Lindsay, 2009). Los miARN se encuentran empacados en microvesículas, exosomas o cuerpos apoptóticos, lo que permite su identificación en diferentes órganos y fluidos corporales (Jagot & Davoust, 2016). Este conjunto de vesículas extracelulares puede desempeñar un papel importante en la comunicación intercelular, tanto a nivel local como sistémico, ya que pueden ser internalizadas por células receptoras cercanas y distantes (Bruno *et al.*, 2020).

Para comprender mejor los mecanismos moleculares de acción de la terapia con IFN-beta es importante investigar la dinámica de expresión de miARN durante la terapia. La regulación de los miARN puede contribuir a los efectos inmunomoduladores y clínicos del tratamiento. Además, los miARN podrían ser marcadores para caracterizar la respuesta biológica a IFN-beta. Los biomarcadores de miARN para el seguimiento del tratamiento podrían ser útiles en el manejo individual de la actividad de la enfermedad.

Resumen

El principal objetivo del estudio es identificar los miARN asociados al uso del interferón beta especialmente en la esclerosis múltiple. A partir de 8 muestras femeninas y 8 muestras masculinas se tomaron 2 grupos de estudio, uno de control y el otro de pacientes con esclerosis múltiple. Los datos de secuenciación obtenidos fueron realizados con tecnología Illumina y los resultados se obtuvieron con DESeq2 y edgeR, paquetes de R.

A diferencia de las mujeres, en hombres con EMRR se identificaron 6 miARN regulados a la baja y 26 miARN regulados al alza (p ajustado $< 0,05$). Se demostró nuevamente una mayor expresión de miR-431, miR-127-3p, miR-379, miR-376c, miR-381, miR-410 y miR-656 en hombres (p ajustado $< 0,05$), pero no en mujeres con EMRR. Al mismo tiempo, los niveles de expresión de estos miARN fueron menores en hombres sanos que en mujeres sanas, mientras que en hombres con RRMS aumentaron y alcanzaron o superaron los niveles de mujeres con RRMS. En general, demostramos que los niveles de expresión de estos miARN dependen tanto del estado de salud como del género.

OBJETIVOS

Determinar el perfil de miARN en el tratamiento con interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple.

Objetivos específicos

- Identificar los miARN expresados en el tratamiento con interferón beta en pacientes con esclerosis múltiple.
- Analizar micromatrices para perfilar la expresión de miARN en esclerosis múltiple.
- Clasifica los miARN con base en la expresión diferencial.
- Analizar la eficacia del tratamiento con interferón beta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de datos

Las secuencias de NGS (PRJNA514238) obtenidas de la página ENA (European Nucleotide Archive) de pacientes con esclerosis múltiple con tratamiento de interferón beta, tanto en hombres como mujeres, fueron extraídas por la Universidad Médica Nacional de Investigación Rusa (Baulina *et al.*, 2019).

Preparación de los datos de miARN

La búsqueda de miARN relacionados con la esclerosis múltiple permitió el uso de PBMC como material biológico informativo y de fácil acceso. Para excluir el sesgo en los niveles de expresión de miARN causados por las terapias modificadoras de la enfermedad se realizó un perfil de miARN en pacientes con EMRR sin tratamiento previo. Teniendo en cuenta la hipotética especificidad de género en la patogénesis de la enfermedad, comparamos la expresión de miARN en pacientes con EMRR y controles sanos por separado para hombres y mujeres. El perfil de miARN en hombres identificó 32 miARN expresados diferencialmente que superaron el umbral para correcciones múltiples y pueden atribuirse a la EM (Baulina *et al.*, 2019).

Las muestras que se analizaron fueron 12 secuencias de hombres y 12 de mujeres compuestas cada grupo por 8 muestras con EMRR con tratamiento y 4 muestras control, en ambos grupos (Tablas 1 y 2).

MUESTRA	HOMBRE	CONTROL
SRR8428642	X	CONTROL 1
SRR8428643	X	CONTROL 2
SRR8428644	X	CONTROL 3
SRR8428645	X	CONTROL 4
SRR8428646	X	TRATAMIENTO EMRR1
SRR8428647	X	TRATAMIENTO EMRR2
SRR8428648	X	TRATAMIENTO EMRR3
SRR8428649	X	TRATAMIENTO EMRR4
SRR8428650	X	TRATAMIENTO EMRR5

SRR8428651	X	TRATAMIENTO EMRR6
SRR8428652	X	TRATAMIENTO EMRR7
SRR8428653	X	TRATAMIENTO EMRR8

Tabla 1. Muestras con tratamiento con interferón beta en hombres con sus respectivos controles.

MUESTRA	MUJER	CONTROL
SRR8428654	X	CONTROL 1
SRR8428655	X	CONTROL 2
SRR8428656	X	CONTROL 3
SRR8428657	X	CONTROL 4
SRR8428658	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 1
SRR8428659	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR2
SRR8428660	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 3
SRR8428661	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 4
SRR8428662	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 5
SRR8428663	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 6
SRR8428664	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 7
SRR8428665	X	TRATAMIENTO MUJERES EMRR 8

Tabla 2. Muestras con tratamiento con interferón beta en mujeres con sus respectivos controles.

Análisis bioinformático

Las secuencias se limpiaron de los adaptadores de la biblioteca utilizando el software Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). Luego, las lecturas se filtraron y la calidad se ajustó utilizando Trim Galore (Krueger, 2021). y Cutadapt (Martin, 2011), y solo se consideraron secuencias de 15 a 65 pb de longitud. Posteriormente, todas las secuencias de miARN

informadas en miRBase (Kozomara *et al.*, 2019) se mapearon en el genoma humano de referencia utilizando el mapeador miRDeep2 (Friedländer *et al.*, 2011), que permite mapear secuencias en el genoma de referencia. Esto permite el mapeo de secuencias a un genoma de referencia. Ya con los resultados de las lecturas mapeadas, con HISAT2 (Kim *et al.*, 2019) obtuvimos alineaciones rápidas y sensibles para que pudiéramos usar StringTie2 (Kovaka *et al.*, 2019) para ensamblar rápida y eficientemente las alineaciones de RNA-Seq en transcripciones potenciales. Luego se calculó la expresión de miARN utilizando el paquete DESeq2 (Love *et al.*, 2014) y se cuantificó la expresión diferencial de miARN entre subgrupos. El paquete edgeR (Robinson *et al.*, 2009) también se utilizó para normalizar los números de secuencia de miARN por biblioteca mediante la secuenciación y el cálculo de FC (*fold change*) (\log_2) y el ajuste de la significación estadística (p) de la expresión diferencial según la tasa de descubrimiento falso (FDR). Luego, se crearon las tablas para los niveles de expresión de los miARN de cada subgrupo de casos en relación con los miARN de control y se representaron frente a su cambio de pliegue medio, lo que representa su sobreexpresión o sobreexpresión en el subgrupo. Los valores de corte para FC se establecieron en 1,5 y -1,5 para considerar los miARN como biomarcadores potenciales. Finalmente, se generaron gráficas de volcán (*volcano plot*) para obtener la significancia estadística de la expresión diferencial de los miRNA mediante el programa en línea VolcaNoseR (Goedhart & Luijsterburg, 2020), usando valores de corte de FC de 1 y de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Análisis bioinformático

Con los datos crudos obtenidos, se usaron las herramientas FastQC, MultiQC y Cutadapt, permitiéndonos obtener la calidad óptima para usarlas en el análisis de las muestras, las cuales tienen una longitud media de las lecturas que es de entre 18 a 36 nucleótidos con un contenido GC de aproximadamente entre 47-51%. El número promedio de las secuencias es alrededor de 4.500.000. La Tabla 3 detalla los resultados obtenidos mediante MultiQC, donde tenemos el nombre de la muestra, el porcentaje de duplicados, el porcentaje de GC, la longitud de pares de bases y las secuencias totales que están ordenadas desde el número más alto, que es 4,7, hasta 3.

Nombre de la muestra	% duplicados	% GC	Longitud	Secuencias totales
SRR8428642 CONTROL 1	96,2%	45%	24 pb	4,7
SRR8428643 CONTROL 2	96,2%	46%	24 pb	4,7
SRR8428644 CONTROL 3	96,2%	46%	23 pb	2,2
SRR8428645 CONTROL 4	97,2%	46%	24 pb	3,0

SRR8428646	97,1%	45%	24 pb	4,2
SRR8428647	95,6%	46%	24 pb	2,9
SRR8428648	96,9%	46%	24 pb	3,4
SRR8428649	96,2%	45%	24 pb	2,7
SRR8428650	96,8%	47%	25 pb	2,7
SRR8428651	96,3%	46%	24 pb	3,8
SRR8428652	97,6%	48%	26 pb	4,5
SRR8428653	92,6%	50%	24 pb	1,4
SRR8428654 CONTROL 1	96,7%	47%	25 pb	3,3
SRR8428655 CONTROL 2	97,0%	46%	23 pb	2,9
SRR8428656 CONTROL 3	96,3%	45%	24 pb	2,8
SRR8428657 CONTROL 4	96,6%	46%	24 pb	3,1
SRR8428658	97,0%	48%	25 pb	4,0
SRR8428659	96,3%	48%	24 pb	3,5
SRR8428660	96,0%	46%	25 pb	3,2
SRR8428661	96,4%	47%	25 pb	4,5
SRR8428662	96,5%	47%	25 pb	3,4
SRR8428663	96,5%	47%	25 pb	3,1
SRR8428664	96,0%	47%	25 pb	3,1
SRR8428665	95,7%	47%	25 pb	3,0

Tabla 3. Métricas generadas con la herramienta MultiQC

En el histograma de calidad de las secuencias obtenidos gracias al programa MultiQC, como se indica en la Figura 1, podemos ver que el valor de la calidad medio en cada posición de la base de la lectura para las secuencias masculinas, siendo la mayor cantidad de 38,56 en la base 25.

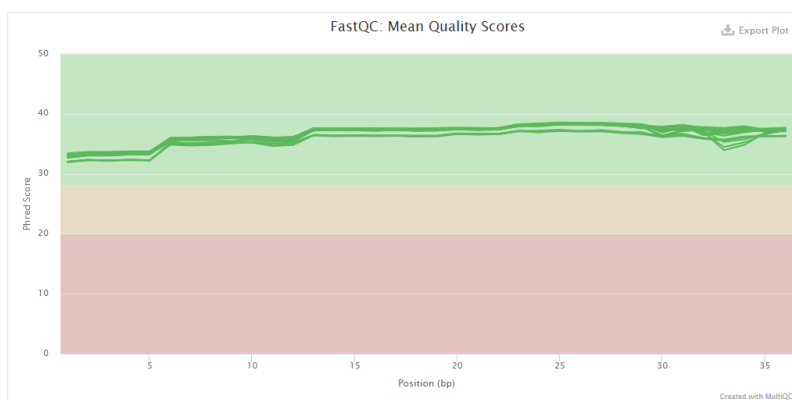


Figura 1. Gráfico de los resultados FastQC para el análisis de las secuencias de miARN en las secuencias masculinas.

De igual forma en la Figura 2, muestra el histograma de calidad de las secuencias obtenidas, podemos ver que el valor de la calidad medio en cada posición de la base de la lectura para las secuencias femeninas varia siendo la mayor cantidad de 38,42 en la base 26. Al analizar los valores medios de calidad a lo largo de las bases se observa un rango óptimo, debido a que en el fondo del gráfico en el eje y, se encuentra en la zona verde indicando que es de muy buena calidad.

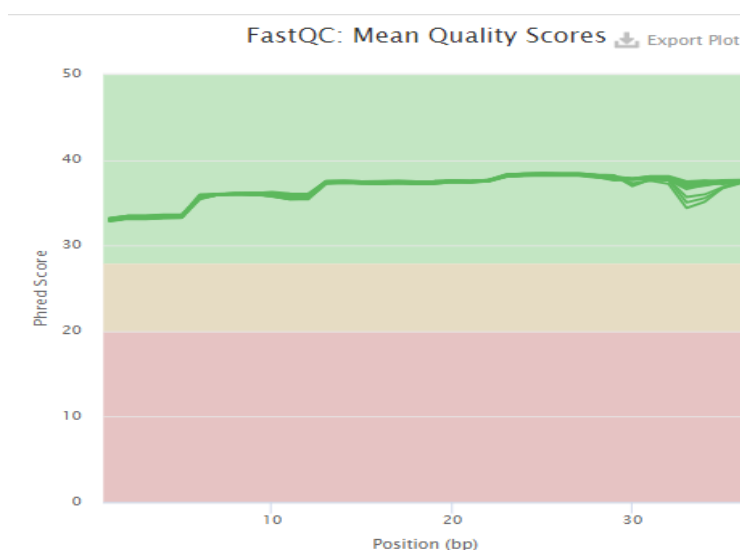


Figura 2. Gráfico de los resultados FastQC para el análisis de las secuencias de miARN, en las secuencias femeninas.

Las secuencias se mapearon sobre el genoma humano GRCh38, permitiendo tener resultados proporcionales al rendimiento general de la comparación con tratamiento de esclerosis múltiple en hombres como mujeres.

Las lecturas sin procesar de Illumina fueron las primeras preprocesadas cortando la secuencia del adaptador de 3'. Las secuencias con menos de 18 nucleótidos después del recorte fueron eliminadas. Las lecturas restantes se colapsaron, es decir, después de este paso solo se tenían lecturas únicas y su continuidad por muestra. Para los pasos restantes usamos el *pipeline* miRDeep2. El uso de esta herramienta consiste en mapear las lecturas contra el genoma de referencia *Homo sapiens* (hg18) y contra las lecturas obtenidas del precursor de miARN de la versión v18 de miRBase. Esto permitió garantizar que una proporción significativa de miARN fueras secuenciadas. En total, 24 muestras de 16 pacientes (EMRR, femenino y masculino) y 8 controles se analizaron en dos grupos multiplexados. En promedio se obtuvieron entre 1,5 y 2 millones de lecturas de secuenciación de alta calidad por muestra (a un total de 92,28 millones de lecturas), de las cuales hasta el 70% contenían información de miARN.

El análisis continúa con la evaluación de la calidad de las lecturas con la herramienta FastQC que nos dio como resultado secuencias de alrededor de 3.000.000 y una longitud de 18-35

nucleótidos. Para mejorar la calidad de las lecturas mediante Trimmomatic se cortaron las lecturas de baja calidad y también se observó que no tenían adaptadores que afecten a la calidad. Para revisar todas las lecturas de control y los tratamientos después de ejecutar el Cutadapt, se procedió a ejecutar la herramienta MultiQC nuevamente, resultando en la Tabla 4 con los datos del nombre de la muestra, el porcentaje de duplicados, el porcentaje de GC, la longitud y las secuencias totales.

Nombre de la muestra	% duplicados	% GC	Longitud	Secuencias totales
SRR8428642 CONTROL 1	96,90%	46%	23 pb	4.6
SRR8428643 CONTROL 2	96,80%	47%	23 pb	4.5
SRR8428644 CONTROL 3	96,60%	47%	23 pb	2.2
SRR8428645 CONTROL 4	97,60%	47%	23 pb	2.9
SRR8428646	97,60%	46%	23 pb	4.1
SRR8428647	96,20%	47%	23 pb	2.8
SRR8428648	97,30%	47%	23 pb	3.4
SRR8428649	96,80%	46%	23 pb	2.7
SRR8428650	97,20%	48%	25 pb	2.7
SRR8428651	96,90%	47%	23 pb	3.8
SRR8428652	97,90%	49%	25 pb	4.5
SRR8428653	93,50%	51%	24 pb	1.3
SRR8428654 CONTROL 1	97,10%	48%	24 pb	3.3
SRR8428655 CONTROL 2	97,40%	46%	23 pb	2.9
SRR8428656 CONTROL 3	96,80%	46%	23 pb	2.7
SRR8428657 CONTROL 4	97,10%	47%	23 pb	3.1
SRR8428658	97,40%	49%	25 pb	3.9
SRR8428659	96,80%	49%	24 pb	3.5
SRR8428660	96,50%	47%	24 pb	3.2
SRR8428661	96,90%	48%	25 pb	4.5
SRR8428662	97,00%	48%	24 pb	3.4
SRR8428663	96,90%	47%	24 pb	3.1
SRR8428664	96,50%	48%	24 pb	3.1
SRR8428665	96,20%	48%	24 pb	3.0

Tabla 4. Cuadro de muestras control y tratamiento en la herramienta MultifastQC una vez ejecutada el Cutadapt.

En la Figura 3 se muestra el total número de lecturas divididas en únicas y duplicadas. Podemos ver que de color azul tenemos las secuencias únicas y de color gris tenemos las secuencias duplicadas.

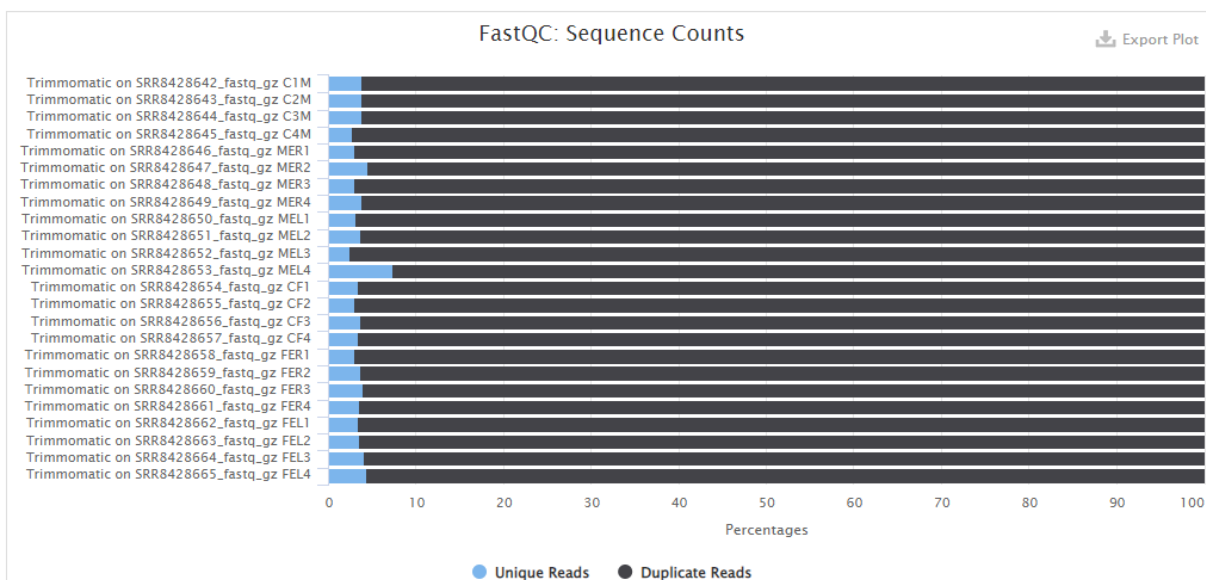


Figura 3. Informe de MultiQC para conteo de secuencias de las muestras.

Después de alinear las secuencias de control y tratamiento con el genoma humano de referencia con HISAT2 y cuantificar las lecturas con StringTie2, se ejecutó un análisis de la expresión diferencial mediante la herramienta DESeq2 para ver cuántas lecturas se alinearon con un determinado gen. La herramienta utiliza una distribución binomial negativa, proporcionando un buen equilibrio entre sensibilidad y especificidad. Los gráficos PCA generados por DESeq2 es un gráfico de análisis de componentes principal que proporciona la asociación de las muestras. Está representada con la Figura 4, donde nos muestra la varianza que se ve representada principalmente en el eje X (PC1: 33%) y el eje Y (PC2: 13%). Así podemos concluir que las muestras tienden a agruparse y los valores positivos se encuentran en el eje X positivo, por lo que no existen genes expresados diferencialmente.

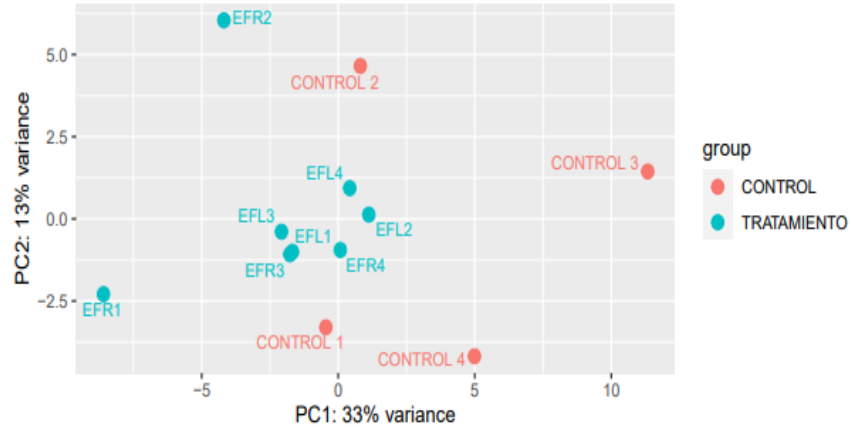


Figura 4. Gráfico PCA de las muestras de estudio. Ruta de análisis de componentes principales obtenida por DESeq2 con la muestra de mujeres con tratamiento y control. De color rojo están representadas las muestras control y de color azul las muestras de tratamiento.

El gráfico de análisis de componentes (Figura 5) manifiesta la varianza de las muestras masculinas, siendo representada por el eje X (PCA: 31%) y el eje Y (PCA: 20%). En este gráfico podemos ver que la mayoría de las muestras con tratamiento y controles no presentan una separación de grupos. Las muestras con tratamiento, es decir con interferón beta, muestran valores positivos en el eje X, mientras que las muestras control tienen un valor negativo.

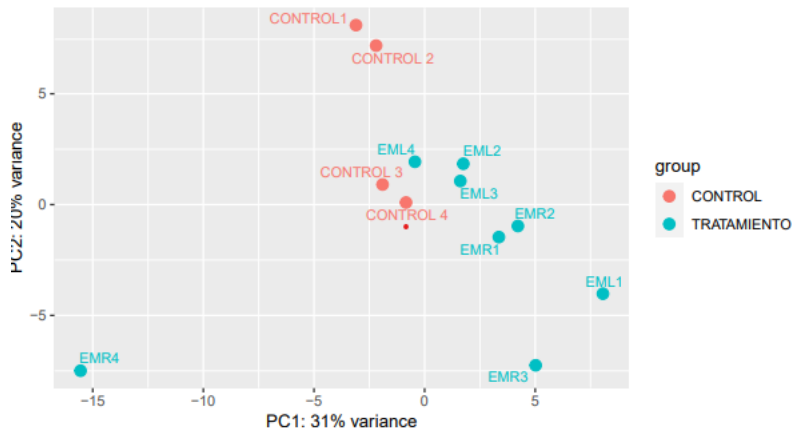


Figura 5. Ruta de análisis de componentes principales obtenida por DESeq2 con la muestra de hombres comparando control y tratamiento. De color rojo están representadas las muestras control y de color azul las muestras de tratamiento.

Otra gráfica que se obtiene de DESeq2 son los mapas de calor de distancia para revelar las similitudes y diferencias entre las muestras (Figura 6). Aquí se muestra la normalización de los valores de recuento de lectura con agrupamiento jerárquico. En la gráfica del lado izquierdo representado las muestras femeninas podemos ver las muestras con tratamiento de esclerosis múltiple tienen una gran similitud principalmente EFL1, EFR3 y EFL3, mientras que en las muestras masculinas la que presento mayor similitud fueron EMR2 y EMR3.

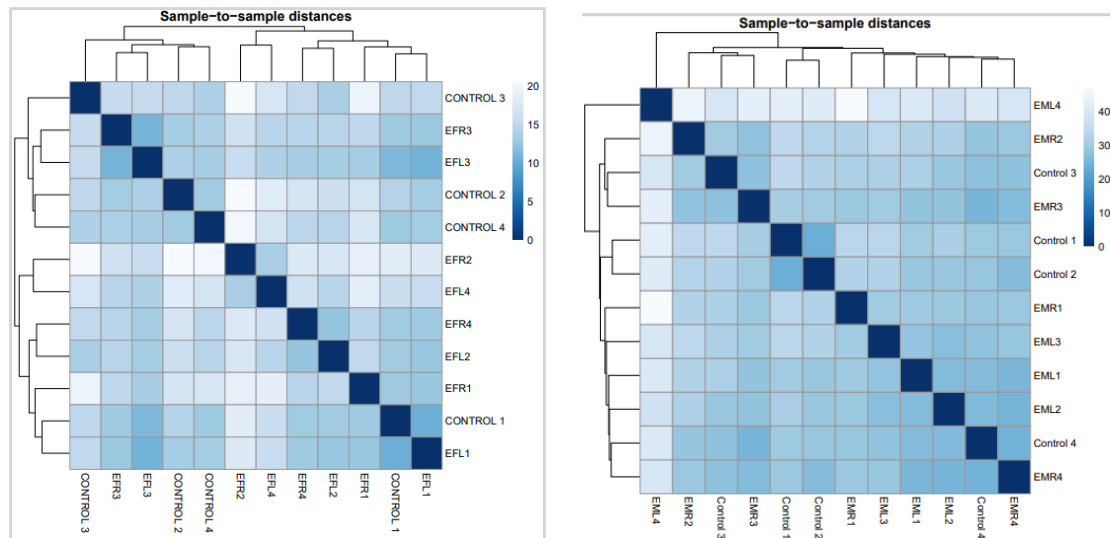


Figura 6. Gráficas de distancias por colores para hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Existe un rango de colores en tonalidad azul que va de 0 a 20. La distancia entre las muestras permite usar conteos normalizados, donde el azul significa una distancia más corta, lo que representa que tiene una gran similitud. Se trabajó con los controles y con 8 lecturas de pacientes con tratamiento.

El diagrama de dispersión y alternativas de ajuste generado por DESeq2 permite obtener un diagnóstico útil. Nos permite verificar el ajuste del modelo a nuestros datos. En la Figura 7 podemos ver que ambas muestras para hombres y mujeres tienen un modelo no lineal con buen ajuste en el que hay una correlación negativa. Esto quiere decir que a medida que aumenta el valor de la dispersión, disminuye el número de cuentas normalizadas. Esto permitió prestar atención al crecimiento de X, donde se observa una tendencia a disminuir en Y.

Los puntos por debajo de la línea roja se deben a los individuos estudiados, pues asigna a cada gen la dispersión máxima posible, de modo que entre más cerca se encuentren los puntos de la línea roja, tienen mayor ajuste, y si se alejan, tienen un valor atípico.

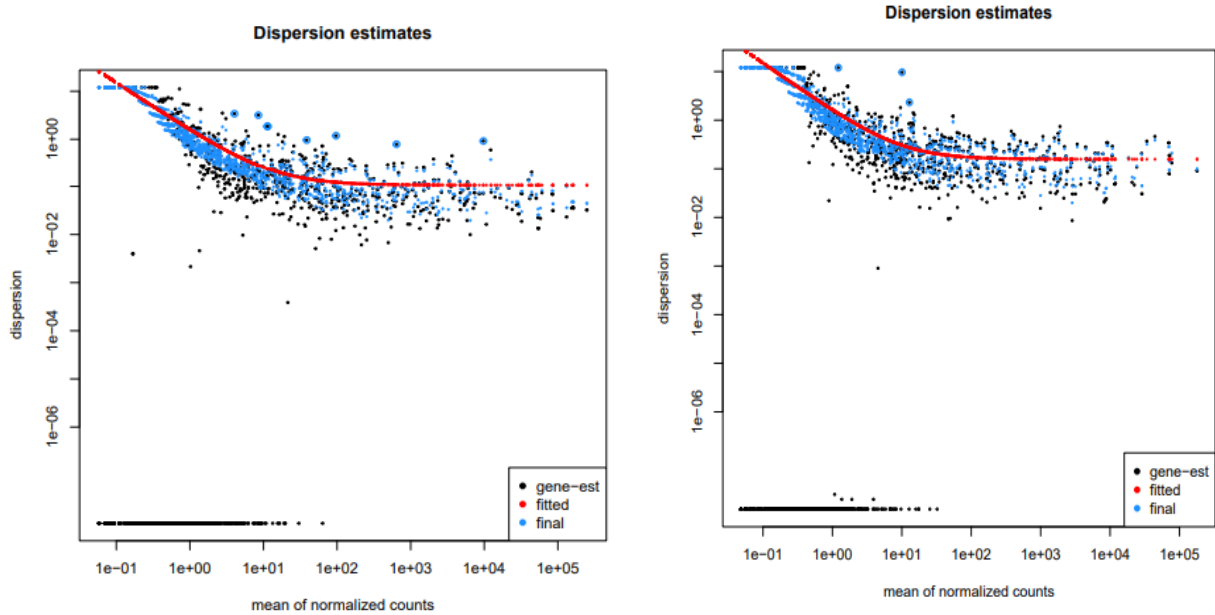


Figura 7. Gráfica de estimación de dispersión para hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Estimaciones de dispersión: estimaciones genéticas (negro), los valores ajustados (rojo) y las estimaciones finales máximas a posteriori utilizadas en las pruebas (azul). Las muestras femeninas se ubican al lado izquierdo y las muestras masculinas al lado derecho.

En el histograma de valor p de DESeq2 se debe examinar la distribución de los valores de p. Una distribución plana con valores de p del 5 % por debajo de 0,05 indica que no hay una diferencia real. En este caso, cualquier ajuste razonable al valor p haría que todos los hallazgos fueran irrelevantes. Por otro lado, la sobreestimación de valores significativos (superiores al 5% a $p < 0,05$) indica una diferencia real. (Figura 8) contiene valores de p superiores a 0,05 indicando que hay diferencia real y los datos continuos discretizados, muestra cuáles datos son severamente anormales.

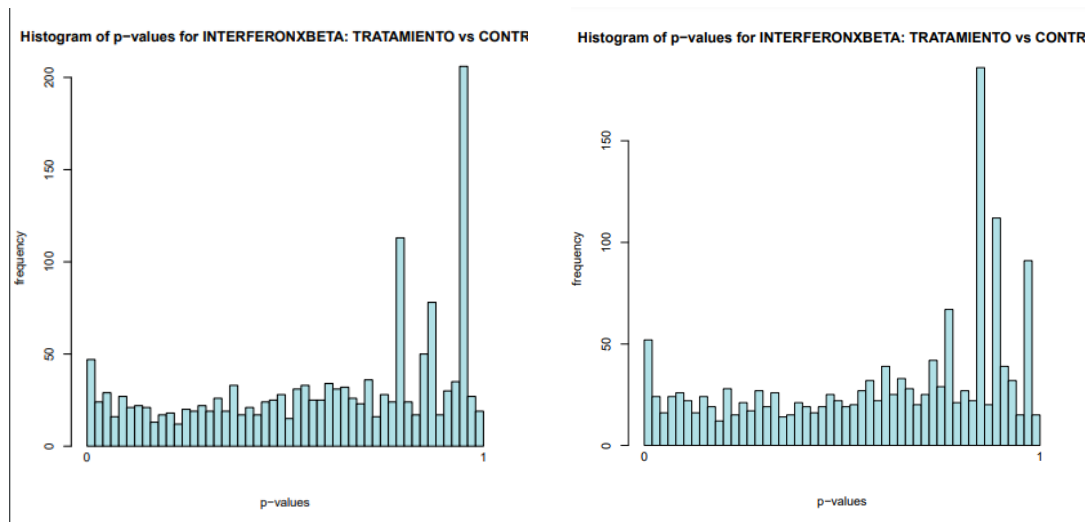


Figura 8. Histograma del punto de valor p para hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Un valor p superior al 0,05 indica una diferencia real, así que más genes se expresaron significativamente de manera diferencial.

El diagrama MA-plot compara el cambio de escala en logaritmos de base 2 contra la media de los recuentos normalizados. En la figura 9 podemos ver mayor cantidad de puntos agrupados que en la muestra de hombres a diferencia del grafico MA-plot de mujeres.

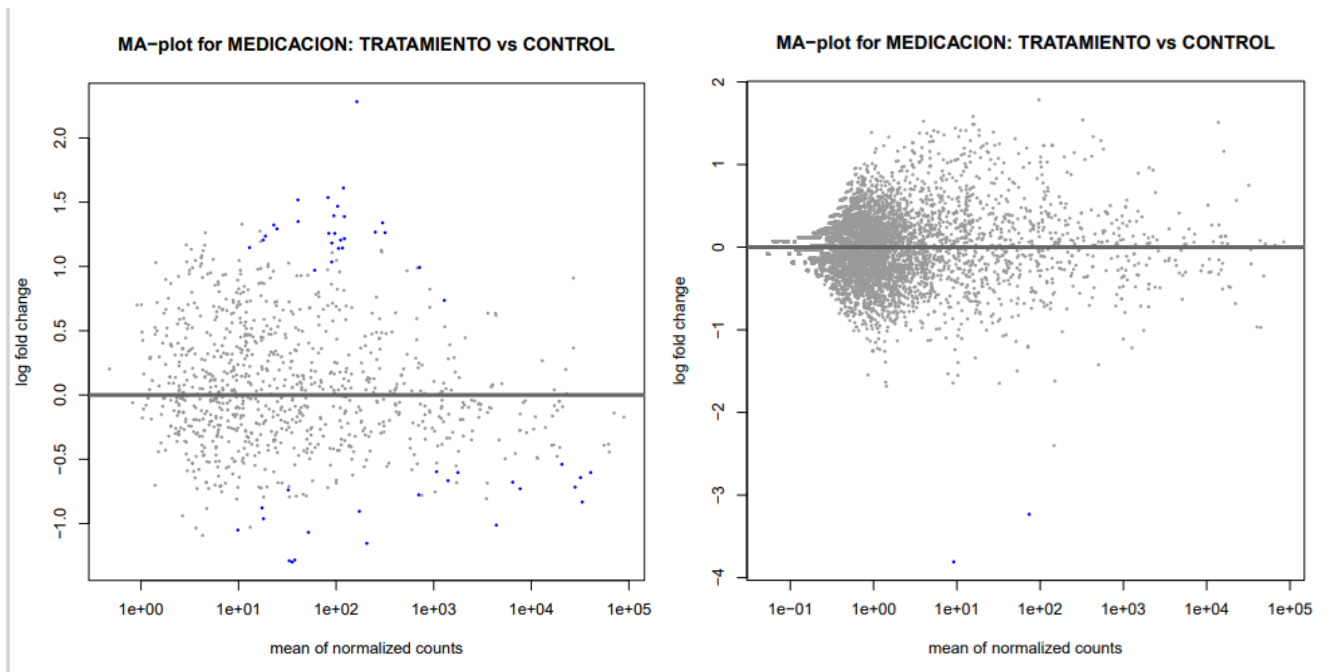


Figura 9. Diagrama de puntos. A la izquierda el diagrama para hombres y a la derecha el diagrama para mujeres. Cada punto azul representa a un gen o característica. Los puntos en

azul son aquellos que tienen un valor de p ajustado menor que alfa del 0,05 Los puntos más dispersos indican que hay poca presencia de genes.

Finalmente, con el *volcano plot* generado por VolcanoR se analizó la expresión de genes significativos (Figura 10). Observamos que hay genes que están regulados al alza en color rojo. En un diagrama de volcán, los genes más regulados al alza están hacia la derecha, los genes más regulados a la baja están hacia la izquierda y los genes estadísticamente más significativos están arriba. Los principales genes expresados diferencialmente en las muestras masculinas fueron las siguientes: hsa-miR-409-5p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-379-3p, hsa-miR-1185-5p, hsa-miR-1185-5p.1, hsa-miR-654-3p, mientras que, en las mujeres, en cambio, se obtuvieron varios genes que no tuvieron significancia como en el gráfico.

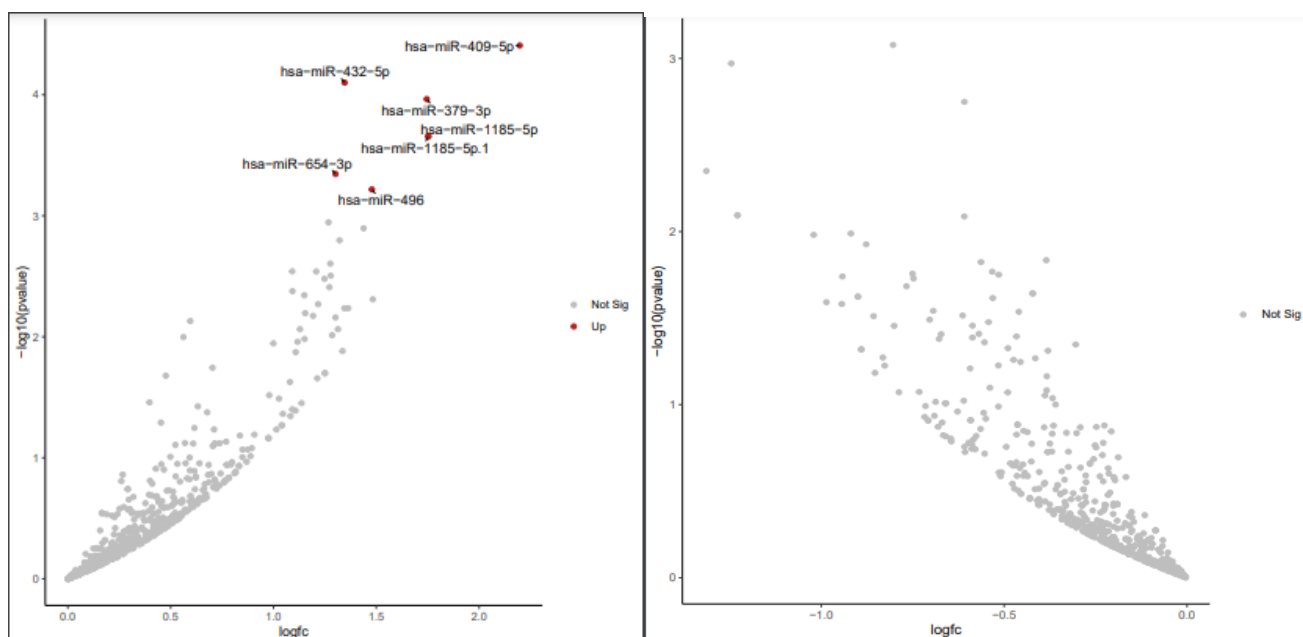


Figura 10. Volcano plot para hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Se detallan mediante colores los genes que superan el umbral FDR y log fold change. Los puntos son rojos si son genes regulados al alza y azules si están regulados a la baja.

DISCUSIÓN Y CONCLUSION

Las funciones de los miARN, especialmente en enfermedades sin cura, aún están empezando a ser investigadas. Debido al limitado número de perfiles de expresión de miARN públicos de la EM, deja como incertidumbre el papel fundamental que cumple los miARN en esta enfermedad crónica. (Freiesleben *et al.* 2016). Con el presente estudio se plantea crear un perfil de expresión que indique la eficacia del tratamiento de interferón beta tanto en hombres como mujeres obtenido mediante secuenciación. Los resultados que logramos obtener fue que se localizaron 270 miARN en personas con tratamiento de IFN-beta, pero los más

significativos fueron 7 miARN en pacientes hombres, a diferencia de las muestras en mujeres que no dieron ningún resultado estadísticamente significativo.

Los miARN son una gran oportunidad en ofrecer una terapia individualizada a los pacientes con EM. En estudios anteriores indican que juega un papel importante el mir-146 y miR-155 (Li *et al.*, 2017). De este estudio se encontró que los genes expresados diferencialmente en las muestras masculinas fueron las siguientes: hsa-mir-409-5p, hsa-mir-432-5p, hsa-mir-379-3p, hsa-mir-1185-5p, hsa-miR-1185-5p.1, hsa-miR-654-3p. Basándose en la bibliografía, los genes expresados todavía no han sido estudiados detalladamente y la poca información que se maneja es porque están involucrado en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, incluido el cáncer. (Nazarizadeh *et al.*, 2020)

En las mujeres, en cambio, se obtuvieron varios genes que no tuvieron significancia en el gráfico: hsa-miR-142-5p, hsa-miR-146a-5, hsa-miR-873-3p, hsa-miR-299-3p y hsa-miR-323a-3p. Principalmente, hsa-miR-142-5p se sobreexpresa en condiciones patológicas como el cáncer, trastornos inmunológicamente relacionados, inflamación del intestino delgado, insuficiencia renal, fibrosis donde se produce inflamación y en biopsias de pacientes trasplantados renales con rechazo agudo (Tsang *et al.*, 2015).

Según Waschbisch *et al.* (2013), no se encontraron correlaciones significativas entre la expresión de miARN en relación con la edad y el sexo. Sin embargo, según los datos adquiridos en este estudio, si existe una correlación significativa con el sexo. La progresión de la enfermedad es más veloz y severa en hombres, ya que el tiempo transcurrido padeciendo los distintos subtipos progresivos de esclerosis múltiple es más corto (Voskuhl, 2020).

Basándonos en estudios anteriores, la principal tecnología usada fue PCR en tiempo real y microarreglos, lo que ha generado la regulación positiva de los genes sensibles a IFN-beta. En este se incluyen miembros de la familia mir-29 que sirven como biomarcadores que indican que la EM se encuentran en edad adulta temprana (Hecker *et al.*, 2013). En este caso, se pudo verificar que en mujeres presenta mayor prevalencia que en los hombres. En cuanto a los subtipos de EM, los hombres son más propensos a padecer PPMS, y, por tanto, discapacidad desde el inicio (Thompson *et al.*, 2018).

Los miARN se han propuesto como biomarcadores que mostrarían el grado de daño neurogenerativo, el comienzo de la remielización y la exacerbación de células y moléculas (Sánchez-Chaparro *et al.*, 2015). Con esto, han justificado tener un papel crítico en varias enfermedades autoinmunes. Según Wang *et al.* (2018), en su estudio habla sobre modelos experimentales en encefalitis autoinmune

A pesar de la multitud de terapias modificadoras de la enfermedad actualmente disponibles, la utilización de la terapia con interferón beta sigue siendo importante en el tratamiento de pacientes con EM. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, si bien los pacientes con EMRR pueden experimentar resultados favorables con el tratamiento con interferón, la respuesta individual, tanto en términos de efectividad como de eventos adversos, sigue siendo

incierto. Con esto queremos aportar con base de datos para futuras investigación y así ser más preciso en el tratamiento de pacientes con EM.

Con esta investigación se pretende generar una oportunidad para identificar biomarcadores que pueden usarse para rastrear la respuesta biológica a la terapia y predecir la progresión y la actividad de enfermedades individuales. Además, estos perfiles de miARN pueden contribuir a una comprensión más profunda de los mecanismos detrás de la progresión de la enfermedad y ayudar en la optimización de las estrategias de tratamiento para la EM. Los hallazgos de nuestro estudio establecen una base para futuras investigaciones que involucren multitudes más grandes de personas con EM.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, P., Pérez, M., Castro, E., Alarcón, T., Santibáñez, R., & Díaz, F. (2010). Prevalencia de esclerosis múltiple en Ecuador [Prevalence of multiple sclerosis in Ecuador]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 25(5), 309–313.
- Baulina, N., Osmak, G., Kiselev, I., Popova, E., Boyko, A., Kulakova, O., & Favorova, O. O. (2019). MiRNAs from DLK1-DIO3 imprinted locus at 14Q32 are associated with multiple sclerosis: Gender-Specific expression and regulation of receptor tyrosine kinases signaling. *Cells*, 8(2), 133. <https://doi.org/10.3390/cells8020133>
- Bizzoco, E., Lolli, F., Repice, A. M., Hakiki, B., Falcini, M., Barilaro, A., Taiuti, R., Siracusa, G., Amato, M. P., Biagioli, T., Lori, S., Moretti, M., Vinattieri, A., Nencini, P., Massacesi, L., & Matà, S. (2009). Prevalence of neuromyelitis optica spectrum disorder and phenotype distribution. *Journal of Neurology*, 256(11), 1891-1898. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5171-x>
- Bolger, A., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bruno, A., Dolcetti, E., Rizzo, F., Fresegna, D., Musella, A., Gentile, A., De Vito, F., Caioli, S., Guadalupi, L., Bullitta, S., Vanni, V., Balletta, S., Sanna, K., Buttari, F., Bassi, M. S., Centonze, D., & Mandolesi, G. (2020). Inflammation-Associated Synaptic Alterations as Shared Threads in Depression and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00169>
- Correa-Díaz, Edgar Patricio, Jácome-Sánchez, Elisa Carolina, Torres Herrán, Germaine Eleanor, Buestán Zumba, María Eugenia, Altamirano-Brito, María José, Caiza-Zambrano, Francisco José, Ortega Heredia, Andrés Damián, Sánchez Cedillo, Verónica Tatiana, García-Castillo, María Ariana, Rodríguez-Díaz, Roberto J, & Jiménez Zambrano, Joyce Antonella. (2019). El Perfil Epidemiológico Y Clínico De La Esclerosis Múltiple En El Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Neurología*, 28(2), 59-70. Recuperado en 21 de julio de 2023, de http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2631-25812019000200059&lng=es&tlng=es

- Freiesleben, S., Hecker, M., Zettl, U. K., Fuellen, G., & Taher, L. (2016). Analysis of microrna and Gene Expression Profiles in multiple sclerosis: Integrating Interaction Data to uncover regulatory mechanisms. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep34512>
- Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. (2011). MIRDEEP2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 37-52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr688>
- Goedhart, J., & Luijsterburg, M. S. (2020). VolcanoR is a web app for creating, exploring, labeling and sharing volcano plots. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76603-3>
- Gourraud, P., Harbo, H. F., Hauser, S. L., & Baranzini, S. E. (2012). The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological Reviews*, 248(1), 87-103. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2012.01134.x>
- Hecker, M., Thamilarasan, M., Koczan, D., Schröder, I., Flechtner, K., Freiesleben, S., Füllen, G., Thiesen, H., & Zettl, U. K. (2013). MicroRNA expression changes during Interferon-Beta treatment in the peripheral blood of multiple sclerosis patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16087-16110. <https://doi.org/10.3390/ijms140816087>
- Honardoost, M. A., Kiani-Esfahani, A., Ghaedi, K., Etemadifar, M., & Salehi, M. (2014). miR-326 and miR-26a, two potential markers for diagnosis of relapse and remission phases in patient with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Gene*, 544(2), 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.069>
- Jagot, F., & Davoust, N. (2016). Is it worth considering circulating microRNAs in multiple sclerosis? *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00129>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C. H., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907-915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Kovaka, S., Zimin, A. V., Pertea, G., Razaghi, R., Salzberg, S. L., & Pertea, M. (2019). Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1910-1>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2018). Mirbase: From microrna sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krueger, F. (2021). Trim Galore. In GitHub repository. GitHub. <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore.com/fenderglass/Flye>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-SEQ data with DESEQ2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Macías, V. del C.. (2021). Determinación del perfil de miRNAs circulantes en el primer trimestre del embarazo asociados con Diabetes Mellitus Gestacional. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado 3 de mayo de 2023, de <http://eprints.uanl.mx/24053/1/1080328620.pdf>

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Miller, D., Chard, D. T., & Ciccarelli, O. (2012). Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurology*, 11(2), 157-169. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(11\)70274-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(11)70274-5)
- Milo, R., & Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: Geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews*, 9(5), A387-A394. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.010>
- Milo, R., & Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews*, 9(5), A387-A394. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.010>
- Minutti-Zanella, C., Bojalil-Álvarez, L., García-Villaseñor, E., López-Martínez, B., Pérez-Turrent, M., Murrieta-Alvarez, I., Ruiz-Delgado, G. J., & Gómez-Almaguer, D. (2022). miRNAs in multiple sclerosis: A clinical approach. *Multiple sclerosis and related disorders*, 63, 103835. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103835>
- Nazarizadeh, A., Mohammadi, F., Alian, F., Faraji, P., Nourbakhsh, M., & Alizadeh-Fanalou, S. (2020). microrna-154: A novel candidate for diagnosis and therapy of human cancers. *OncoTargets and Therapy*, Volume 13, 6603–6615. <https://doi.org/10.2147/ott.s249268>
- Pérez, M. M. G., & Eisele, S. J. G. (2022). MicroRNAs as a possible biomarker in the treatment of multiple sclerosis. *IBRO Neuroscience Reports*, 13, 492-499. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.11.001>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). EDGER: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Sánchez-Chaparro, M., Rodríguez-Sánchez, I. P., Barrera-Saldaña, H. A., Martínez-Villarreal, L. E., Reséndez-Pérez, D., & Gámez-Escobedo, I. A. (2015). MicroARN y sus mecanismos neuroinmuno reguladores en la esclerosis múltiple. Desarrollo de biomarcadores para su diagnóstico. *Revista De Neurologia*. <https://doi.org/10.33588/rn.6012.2014357>
- Sospedra, M. (2005). Inmunoterapias en esclerosis múltiple. University Clinic Eppendorf (UKE). <https://www.esteve.org/wp-content/uploads/2018/01/136934.pdf>
- Tsang, F. H., Au, S. L., Wei, L., Fan, D. S. P., Lee, J. M., Ng, I. O., & Wong, C. (2015). MicroRNA-142-3p and microRNA-142-5p are downregulated in hepatocellular carcinoma and exhibit synergistic effects on cell motility. *Frontiers of Medicine*, 9(3), 331-343. <https://doi.org/10.1007/s11684-015-0409-8>
- Tsitsiou, Eleni & Lindsay, Mark. (2009). MicroRNAs and the immune response. *Current opinion in pharmacology*. 9. 514-20. [10.1016/j.coph.2009.05.003](https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.003).
- Tufekci, K. U., Oner, M. G., Genc, S., & Genc, S. (2011). MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Diseases*, 2011, 1-27. <https://doi.org/10.4061/2011/807426>
- Voskuhl, R. R. (2020). The effect of sex on multiple sclerosis risk and disease progression. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(5), 554-560. <https://doi.org/10.1177/1352458519892491>

- Wang, P., Zhao, G., Ji, Y., Zhang, P., Zhang, X., Gong, J., Zhao, L., Yan, Z., Yin, M., Jiang, Z., Shen, L., Yang, X., Fang, J., Tian, S., Tong, J., Wang, Y., Zhu, X., Zhang, X., Wei, Q., . . . Li, H. (2018). Wang et al. *Nature Medicine*, 24(6), 700-701. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0063-1>
- Waschbisch, A., Atiya, M., Linker, R. A., Potapov, S., Schwab, S., & Derfuss, T. (2011). Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024604>