

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



“ROL DE INTERFERONES DE TIPO I EN LA MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE MUC1 Y TLR4 A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL DE LOS NIVELES DE hsa-miR-145-5p EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DANIELA PAZ JARA ARAYA

Directores de Tesis:

Dra. María Julieta González Burgos. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Dr. Ricardo Soto Rifo. Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por la candidata

DANIELA PAZ JARA ARAYA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 02 de Agosto de 2023

Dra. María Julieta González Burgos
Programa de Biología Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Ricardo Soto Rifo
Programa de Virología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Dr. Assaf Katz

Dr. Gloria Vázquez

Dr. Diego Catalán

Dra. Fabiola Osorio
Presidenta Comisión

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biología Celular del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por los proyectos FONDECYT Regular 1210055, 1160015 y 1190156 y la beca de Doctorado ANID 21190214. Todos los individuos participantes en este estudio son pacientes del Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, Reumatólogo de la Clínica INDISA.

"Me enseñaron que el camino del progreso no es ni rápido ni fácil" (Marie Curie)
A mi familia, cuyo infinito amor me sostuvo en las noches más oscuras.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quisiera agradecer a todos los pacientes con síndrome de Sjögren, quienes fueron la motivación para realizar esta tesis y que noblemente decidieron participar de este estudio, confiando en nuestro trabajo y con la esperanza de avanzar en el conocimiento de la enfermedad.

A mi directora de tesis, Dra. María Julieta González Burgos por confiar en mí desde que llegué en el 2016 como estudiante de pregrado, por guiarme en el maravilloso mundo de la ciencia y por mostrarme que puedo ser parte de él. Le agradezco enormemente por contribuir en mi crecimiento personal y profesional con su admirable ética, rigurosidad y pensamiento crítico, pero por sobre todo con su pasión por la ciencia y su infinita curiosidad.

A mi co-director de tesis, Dr. Ricardo Soto Rifo por creer siempre en mis propuestas y confiar en mí para desarrollar un proyecto conjunto. Le agradezco inmensamente su mirada crítica, su constante preocupación y el espacio que generó para la discusión de ciencia, favoreciendo la generación de nuevas importantísimas ideas para este trabajo.

Al Dr. Sergio Aguilera Covarrubias por su irremplazable perspectiva clínica, la cual nos ha permitido enfocar nuestro trabajo hacia el bienestar de los pacientes. Su dedicación es una fuente de inspiración y le agradezco enormemente su contribución al desarrollo de este estudio con su gran experiencia y conocimientos.

A los Dres Diego Catalán, Assaf Katz, Gloria Vásquez y Fabiola Osorio, pues su enorme contribución como comisión evaluadora permitió el desarrollo exitoso de este trabajo. Gracias, pues a través de sus críticas constructivas y a la entrega de conocimientos este trabajo pudo enriquecerse hasta lo que es hoy.

Al Dr. Claudio Molina por su gran disposición y contribución en los aspectos clínicos y estadísticos de este trabajo.

Al Dr. Sergio González por su rigurosa mirada que permitió enriquecer este trabajo, y cuyos cuestionamientos siempre favorecieron el mejoramiento de este.

A la profesora Cecilia Leyton por su apoyo y cariño desde mis años de pregrado, y todos los conocimientos que en esos años y en el desarrollo de mi tesis me entregó.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por la altísima calidad de la formación recibida, a los profesores que participaron en ella y los compañeros que allí conocí. Muy especialmente quiero agradecer a Cecilia Carter, cuyo invaluable trabajo ha permitido el desarrollo de esta tesis y la de todos los estudiantes a quienes ayuda enormemente y con tanto cariño.

A Dn Osvaldo Almeyda por su constante ayuda y disposición. Su trabajo es parte crucial para el armonioso desarrollo de nuestros experimentos.

A cada uno de los integrantes del laboratorio de Virología Molecular y Celular, pues sus comentarios y preguntas, así como las discusiones científicas que tuvimos contribuyeron inmensamente en el desarrollo de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio de Biología Celular en estos años en que desarrollé mi tesis: Isabel, María José, Sergio, Claudio, Carolina, Nicolás, Matilde, Benjamín, Gastón, por su apoyo y contribuir a un grato ambiente de trabajo. Agradezco en especial a Isa, por recibirme desde pregrado y enseñarme con tanto cariño y dedicación, gracias por tu gran disposición y minuciosas revisiones sin las cuales este trabajo no sería el mismo. Agradezco especialmente también a Cote, pues su mirada crítica y grandes preguntas contribuyeron enormemente en mi tesis y a mi desarrollo como científica. Finalmente agradezco a Paty, quien se transformó en una de mis mejores amigas, y ejemplo de esfuerzo, perseverancia y dedicación. Sin su cariño, palabras de aliento y enorme paciencia para responder mis preguntas no habría logrado exitosamente este camino.

A mis amigas del colegio, Constanza, Javiera, María de los Ángeles y María Paz, por creer en mi desde el 2007 hasta hoy. Su amor y preocupación constante me acompañan y dan fuerzas en los días difíciles, y me han permitido llegar hasta aquí.

A mis amigos de la universidad, especialmente a Luciano, Matías, Nicolás, Karina y Constanza, pues siempre me han brindado su apoyo y aliento. Especialmente agradezco a Karina y Constanza que tuvieron que aguantarme en los meses más difíciles, pero supieron entenderme y ayudarme con cariño. Niñas, ¡sus palabras de aliento significaron mucho para mí!

A mis padres Mario Jara y Yolanda Araya, quienes me han apoyado en cada decisión que he tomado y me han alentado a perseguir mis sueños desde niña. Sin su amor y apoyo incondicional no podría haber llegado a la meta. A mi hermana Catalina Jara, mi compañera de vida, mi admiradora número uno. Gracias por tu infinito amor y apoyo, gracias por las risas que llenan mis días y por ser mi motor para seguir. A mis tías, tíos, primos y primas que me llenan de cariños y apoyo. A mis abuelos Gregorio Jara, Julia Aguilar, y Eduardo Araya que me cuidan desde el cielo y a mi abuela Adriana Mercado que cada noche reza por mí. A mis mascotas Cleo, Gus y Fiu, por ser los angelitos que vinieron a cuidarme a la tierra con su infinita ternura.

ÍNDICE

1	LISTA DE ABREVIATURAS	3-5
2	ÍNDICE DE FIGURAS	6-7
3	ÍNDICE DE TABLAS	8
4	RESUMEN	9-10
5	ABSTRACT	11-12
6	INTRODUCCIÓN	13-20
	6.1 El síndrome de Sjögren	13
	6.2 miRNAs	13-14
	6.3 miRNAs en el SS	15
	6.4 hsa-miR-145-5p y sus blancos: MUC1 y TLR4	15-16
	6.5 Interferones de tipo I	16-17
	6.6 Interferones de tipo I y SS	17
	6.7 Regulación de la biogénesis de miRNAs	18-20
7	HIPÓTESIS	21
8	OBJETIVO GENERAL	21
9	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
10	MATERIALES Y MÉTODOS	22-35
	10.1 Pacientes con SS primario e individuos controles	22-23
	10.2 Obtención de glándulas salivales labiales	23
	10.3 Cultivo de células HSG	24
	10.4 Estimulación de células HSG con IFN- α e IFN- β	24
	10.5 Ensayos funcionales en células HSG con imitador e inhibidor de hsa-miR-145-5p	24-25
	10.6 Silenciamiento de ADAR1p150	25
	10.7 Extracción de RNA total	25-26
	10.8 Determinación de los niveles de expresión del hsa-miR-145-5p a través de ensayo Taqman	26-27
	10.8.1 Retro-transcripción del miRNA maduro	27
	10.8.2 PCR en tiempo real de miRNAs	27
	10.9 Determinación de los niveles de expresión del pri-miR-145 a través de ensayo Taqman	27-28
	10.9.1 Retro-transcripción del pri-miRNA	28
	10.9.2 PCR en tiempo real del pri-miRNA	28
	10.10 Determinación de los niveles relativos de transcrito mediante RT-qPCR	28-31

10.10.1 Síntesis de cDNA	28
10.10.2 Diseño de partidores específicos	29-30
10.10.3 PCR en tiempo real	30-31
10.11 Cálculo de puntaje de IFNs I	31
10.12 Determinación de los niveles relativos de proteína mediante Western Blot	32-34
10.12.1 Extracción de proteínas	32
10.12.2 Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot	32-34
10.13 Inmunofluorescencia	34
10.14 Obtención de microfotografías	35
10.15 Análisis estadístico	35
11 RESULTADOS	36
11.1 Objetivo específico 1: Evaluar el rol del hsa-miR-145-5p en la regulación de los niveles de MUC1 y TLR4 en GS de pacientes con SS y células HSG.	36-42
11.2 Objetivo específico 2: Evaluar el rol de IFNs I en los niveles del hsa-miR-145-5p y pri-miR-145 en GS de pacientes con SS y células HSG.	43-48
11.3 Objetivo específico 3: Evaluar el rol de la maquinaria enzimática de m6A y ediciones de adenosinas en los niveles del hsa-miR-145-5p y su asociación a IFNs I en GS de pacientes con SS y células HSG	49-63
12 DISCUSIÓN	64-76
13 CONCLUSIÓN	77
14 PROYECCIONES	78
15 PRODUCTOS GENERADOS	79-81
16 REFERENCIAS	82-89
17 ANEXOS	90-96

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAR1	Adenosina Desaminasa específica de RNA 1	Adenosine deaminase RNA specific 1
ADAR2	Adenosina Desaminasa específica de RNA 2	Adenosine deaminase RNA specific 2
AGO	Argonauta	Argonaute
ALKBH5	Desmetilasa de RNA, Homólogo 5 de AlkB	AlkB homolog 5, RNA demethylase
ANA	Anticuerpos antinucleares	Antinuclear antibodies
AR	Artritis reumatoide	Rheumatoid arthritis
CXCL16	Quimioquina (motivo C-X-C) ligando 16	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16
DAMP	Patrón molecular asociado a daño	Damage-associated molecular pattern
DE	Desviación estándar	Standard deviation
DGR8	Región crítica del gene 8 para síndrome DiGeorge	DiGeorge syndrome Critical region gene 8
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
dsRBDs	Dominios de unión a RNA de doble hebra	double-stranded RNA-binding domain
ESSDAI	Índice EULAR de actividad del Síndrome de Sjögren	EULAR Sjögren's syndrome disease activity index
ES	Esclerosis sistémica	Systemic sclerosis
EULAR	Liga europea contra el reumatismo	European league against rheumatism
FSCN1	Proteína Fascina 1 que agrupa actina	Fascin Actin-Bundling Protein 1
FSNE	Flujo salival no estimulado	Unstimulated saliva flow
FTO	Asociado a masa grasa y obesidad	Fat Mass and obesity associated
GAS	Secuencia activada por interferón gamma	Gamma activated sequence
GS	Glándulas salivales	Salivary glands
GSL	Glándulas salivales labiales	Labial salivary glands
hnRNPA1B1	Ribo nucleoproteína heterogénea nuclear A2/B1	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2/B1
HSG	Glándula submandibular humana	Human submandibular gland
IFI44	Proteína inducida por interferón 44	Interferon Induced Protein 44
IFI44L	Proteína similar a inducida por interferón 44	Interferon Induced Protein 44 Like
IFIT1	Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFIT3	Proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 3	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3
IFITM1	Proteína 1 de transmembrana inducida por interferón	Interferon induced transmembrane protein 1
IFNs I	Interferones de tipo I	Type I interferons
IFN-α	Interferón alfa	Interferon alpha
IFN-β	Interferón beta	Interferon beta
IFN-γ	Interferón gamma	Interferon gamma
IFNAR	Receptor de interferones α/β	Interferon- α/β receptor
IL-1β	Interleuquina 1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleuquina 6	Interleukin 6
IL-2	Interleuquina 2	Interleukin 2
IRF1	Factor regulador de interferón 1	Interferon regulatory factor 1
IRF3	Factor regulador de interferón 3	Interferon regulatory factor 3
IRF7	Factor regulador de interferón 7	Interferon regulatory factor 7

IRF9	Factor regulador de interferón 9	Interferon regulatory factor 9
ISGF3	Factor 3 del gen estimulado por interferón	Interferon Stimulated Gene Factor 3
ISGs	Genes estimulados por interferón	Interferon stimulated genes
ISR	Respuesta integrada al estrés	Integrated stress response
ISRE	Elementos de respuesta susceptibles a IFN	Interferon-stimulated response elements
JAK	Quinasa janus	Janus kinase
lncRNAs	RNAs no codificantes largos	Long non-coding RNAs
LPS	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharide
LES	Lupus eritematoso sistémico	Systemic lupus erythematosus
m6A	N6 metiladenosina	N6-Methyladenosine
MDA5	Proteína 5 asociada a la diferenciación de melanoma	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
MEC	Matriz extracelular	Extracellular matrix
METTL3	Metiltransferasa 3	Methyltransferase 3
METTL14	Metiltransferasa 14	Methyltransferase 14
mRNA	RNA mensajero	Messenger RNA
miRNA	microRNA	microRNA
MUC1	Mucina 1	Mucin 1
MUC5b	Mucina 5b	Mucin 5b
MUC7	Mucina 7	Mucin 7
Mx-1	Proteína de resistencia al mixoma 1	Myxoma Resistance Protein 1
ncRNA	RNA no codificante	Noncoding RNA
NF-κB	Factor nuclear kappa B	Nuclear Factor Kappa B
OSS	Puntuación de tinción ocular	Ocular Staining Score
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida	polyacrylamide gel electrophoresis
PCAT	Transcrito 1 asociado a cáncer de próstata	Prostate cancer associated transcript 1
PVT1	Variante de traslocación 1 de plasmocitoma	Plasmacytoma variant translocation 1
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica	Peripheral Blood Mononuclear Cell
Pre-miRNA	microRNA precursor	Precursor microRNA
Pri-miRNA	microRNA primario	Primary microRNA
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	quantitative polymerase chain reaction
RE	Retículo endoplásmico	Endoplasmic reticulum
RIG-1	Proteína del gen I inducible por ácido retinoico	Retinoic acid-inducible gene I protein
RISC	Complejo silenciador inducido por RNA	RNA-induced silencing complex
RNA	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
SBF	Suero fetal bovino	Bovine serum fetal
sRNAs	RNAs pequeños	Small RNAs
SDS	Dodecilsulfato sódico	Dodecyl sodium sulfate
SS	Síndrome de Sjögren	Sjögren's syndrome
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1	Signal transducer and activator of transcription 1
STA2	Transductor de señal y activador de la transcripción 2	Signal transducer and activator of transcription 2
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa	Tumor necrosis factor Alpha
TLR3	Receptor de tipo Toll 3	Toll like receptor 3
TLR4	Receptor de tipo Toll 4	Toll like receptor 4

TLR7/8	Receptor de tipo Toll 7/8	Toll like receptor 7/8
TLR9	Receptor de tipo Toll 9	Toll like receptor 9
TRBP	Proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación	Trans-Activation Responsive RNA-Binding Protein
UTR	Región no traducida	Untranslated region
XPO5	Exportina 5	Exportin 5

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Biogénesis canónica de miRNAs.	14
Figura 2.	Sistema de promotores alternativos de ADAR1 y dominios de sus isoformas.	19
Figura 3.	Niveles de hsa-miR-145-5p y niveles de transcrito de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	37
Figura 4.	Niveles de proteína de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	37
Figura 5.	Localización de MUC1 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	38
Figura 6.	Localización de TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	39
Figura 7.	Niveles de hsa-miR-145-5p y del transcrito de FSCN1 en células HSG transfectadas con mimic o inhibidor del hsa-miR-145-5p.	40
Figura 8.	Niveles de transcrito y proteína de MUC1 en células HSG transfectadas con mimic o inhibidor del hsa-miR-145-5p.	41
Figura 9.	Niveles de transcrito y proteína de TLR4 en células HSG transfectadas con mimic o inhibidor del hsa-miR-145-5p.	42
Figura 10.	Niveles de transcrito de IFN- α e IFN- β en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	43
Figura 11.	Niveles de transcrito de ISGs y puntaje de IFNs I en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	44
Figura 12.	Niveles de transcrito de ISGs en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	46
Figura 13.	Niveles de hsa-miR-145-5p y niveles de transcrito de MUC1 y TLR4 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	47
Figura 14.	Niveles de proteína de MUC1 y TLR4 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	47
Figura 15.	Niveles de pri-miR-145 en GS de pacientes con SS e individuos controles.	48
Figura 16.	Distribución de los sitios metilables predichos en la secuencia del pri-miR-145 obtenidos por SRAMP y su puntaje de confiabilidad.	49
Figura 17.	Niveles de transcrito y proteína de las metiltransferasas METTL3 y METTL4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	50
Figura 18.	Localización de las metiltransferasas METTL3 y METTL4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	51
Figura 19.	Niveles de transcrito y proteína de las desmetilasas ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	53
Figura 20.	Localización de las desmetilasas ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	54
Figura 21.	Niveles de proteína de la lectora hnRNPA2B1 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	55
Figura 22.	Niveles de transcrito y proteína de las isoformas de ADAR1 ADAR1p110 y ADAR1p150 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	57
Figura 23.	Localización de la desaminasa ADAR1 en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	58
Figura 24.	Niveles de transcrito y proteína de las metiltransferasas METTL3 y METTL4 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	59

Figura 25.	Niveles de transcrito y proteína de las metiltransferasas ALKBH5 y FTO en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	60
Figura 26.	Niveles de proteína de la lectora de m6A hnRNPA2B1 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	60
Figura 27.	Niveles de transcrito y proteína de las isoformas de ADAR1 ADAR1p110 y ADAR1p150 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .	61
Figura 28.	Niveles de transcrito de las isoformas de ADAR1 ADAR1p110 y ADAR1p150 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β y silenciadas con siRNA siADAR1p150 .	62
Figura 29.	Niveles de hsa-miR-145-5p y niveles de transcrito de FSCN1, MUC1 y TLR4 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β y silenciadas con siRNA siADAR1p150.	63
Figura 30.	Mecanismo propuesto para la regulación postranscripcional del hsa-miR-145-5p a través de la modulación dependiente de IFNs I de ADAR1p150 y su rol en la modulación de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Criterio de clasificación de SS primario del <i>American College of Rheumatology/European League against Rheumatism</i> de 2016.	22
Tabla 2.	Características demográficas, histológicas y serológicas de los pacientes con SS e individuos controles.	23
Tabla 3.	Secuencias de partidores utilizados para PCR en tiempo real.	29-30
Tabla 4.	Anticuerpos utilizados para Western Blot e inmunofluorescencia.	33-34
Tabla 5.	Correlaciones entre niveles de hsa-miR-145-5p, activación de la vía de IFNs I y parámetros clínicos.	45
Tabla 6.	Resumen de la localización de la maquinaria enzimática de m6A y A->I en GSL de pacientes con SS e individuos controles.	52
Tabla 7.	Correlaciones entre los niveles de enzima metiltransferasas y desmetilasas con parámetros clínicos.	55
Tabla 8.	Correlación entre los niveles de enzima ADAR1p150 con parámetros clínicos.	58

RESUMEN

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune e inflamatoria que afecta principalmente a las glándulas salivales (GS). Se caracteriza por una sobreactivación de la vía de interferones de tipo I (IFNs I), citoquinas capaces de regular los niveles de diversos microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son RNAs no codificantes pequeños que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. Al analizar secuenciaciones masivas de RNAs pequeños se ha observado una disminución del hsa-miR-145-5p en GS de pacientes con SS. Este miRNA tiene como blancos predichos los transcritos de MUC1 y TLR4, los cuales están sobreexpresados en las GS de estos pacientes. Estas sobreexpresiones contribuyen, a través de diversos mecanismos, al estado inflamatorio y la disfunción glandular en esta enfermedad.

Niveles elevados de IFNs I como los reportados en el SS, pueden disminuir la interacción del complejo microprocesador con los transcritos primarios de diversos miRNAs (pri-miRNAs), lo que lleva a una disminución en su procesamiento y de los niveles de miRNA maduro. Además, se ha observado que la interacción entre el complejo microprocesador y el pri-miRNA puede ser modulada por modificaciones en el RNA, como la metilación de las adenosinas en la posición N6 (m6A) o ediciones como la desaminación de adenosinas y la formación resultante de inosinas (A->I). La maquinaria enzimática que cataliza ambas modificaciones está alterada en enfermedades autoinmunes que presentan niveles elevados de IFNs I. Considerando estos antecedentes, es interesante preguntarse si ¿podrían los IFNs I modular el procesamiento del pri-miR-145 y los niveles del hsa-miR-145-5p mediante la maquinaria de m6A y ediciones de adenosinas por inosinas, y así mantener niveles aumentados de MUC1 y TLR4? Para responder a esta pregunta se propuso la siguiente hipótesis: Interferones de tipo I aumentan los niveles de MUC1 y TLR4 a través de la disminución del procesamiento postranscripcional del hsa-miR-145-5p debido a alteraciones en la maquinaria enzimática de m6A o ediciones de adenosinas por inosinas en GS de pacientes con SS. Para probar esta hipótesis, se determinaron los niveles del hsa-miR-145-5p y de sus blancos predichos MUC1 y TLR4 en GS de pacientes con SS y células HSG estimuladas con IFNs I, y se evaluó el efecto de este miRNA sobre los niveles de sus blancos a través de ensayos funcionales. Se determinaron también los niveles del pri-miR-145 y se caracterizó la maquinaria enzimática de m6A (METTL3, METTL14, FTO, ALKBH5 y hnRNPA2B1) y A->I (ADAR1p110 y ADAR1p150) en las GS de estos pacientes y en células HSG estimuladas con IFNs I. Luego, se silenció ADAR1p150 en células HSG estimuladas con IFNs I y se evaluó su efecto en los niveles de hsa-miR-145-5p. Los resultados evidenciaron niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p en las GS de pacientes con SS que correlacionaron de manera inversa con los niveles de MUC1 y TLR4. Esta asociación fue corroborada a través de ensayos funcionales en células HSG. Además, se encontró una asociación inversa entre la activación de la vía de IFNs I con los niveles de hsa-miR-145-5p en GS de pacientes con SS, que se reprodujo en células HSG

estimuladas con IFNs I. En las GS, la activación de la vía de IFNs I correlacionó de manera directa con los niveles del pri-miR-145 y de transcrito de METTL3, ALKBH5 y ADAR1p150, y de manera inversa con los niveles proteína de METTL3. Sin embargo, en células estimuladas con IFNs I solo se observó un aumento en los niveles de transcrito y proteína de ADAR1p150. Finalmente, al silenciar ADAR1p150, la disminución del hsa-miR-145-5p inducida por IFNs I pudo ser revertida, sugiriendo un rol de la isoforma inducible por IFNs I en el proceso. Los mecanismos a través de los cuales ADAR1p150 modula los niveles del hsa-miR-145-5p, de manera dependiente de IFNs I, aún deben ser determinados. Sin embargo, es posible postular una disminución del procesamiento del pri-miR-145 debido a un bloqueo de la interacción con el complejo microprocesador por la unión de ADARp150 o ediciones A->I. Ambos mecanismos conducirían a una acumulación del pri-miRNA y una disminución del miRNA maduro, tal como se observa en GS de pacientes con SS.

En conclusión, los IFNs I inducen una disminución del hsa-miR-145-5p que favorecería la sobreexpresión de MUC1 y TLR4 y podría tener su origen en un procesamiento disminuido del pri-miR-145 dado el aumento de ADAR1p150. Estos hallazgos aportan a la comprensión de los mecanismos que regulan los niveles del hsa-miR-145-5p en el SS y el impacto que podría tener la desregulación de este miRNA en la inflamación y disfunción glandular, a través de la modulación de MUC1 y TLR4. Esto ayudará al desarrollo futuro de posibles nuevas intervenciones terapéuticas que permitan recobrar la homeostasis glandular y con ello, mejorar la calidad de vida de los pacientes con SS.

ABSTRACT

Sjögren's syndrome (SS) is an autoimmune and inflammatory disease that mainly affects the salivary glands (SG). It is characterized by overactivation of the type I interferon pathway (IFNs I), cytokines capable of regulating the levels of various microRNAs (miRNAs). miRNAs are small non-coding RNAs that play an important role in regulating gene expression at the post-transcriptional level. When analyzing mass sequencing of small RNAs, a decrease in hsa-miR-145-5p has been observed in the SG of patients with SS. The predicted targets of this miRNA are the MUC1 and TLR4 transcripts, which are overexpressed in the SG of these patients. This overexpression contributes, through various mechanisms, to the inflammatory state and glandular dysfunction in this disease.

High levels of IFNs I, such as those reported in SS, can decrease the interaction of the microprocessor complex with the primary transcripts of various miRNAs (pri-miRNAs), which decreases their processing and mature miRNA levels. In addition, the interaction between the microprocessor complex and pri-miRNAs can be modulated by RNA modifications, such as methylation of adenosines at position N6 (m6A) or RNA editing such as adenosine deamination and the resulting formation of inosines (A->I). The enzymatic machinery that catalyzes both modifications is altered in autoimmune diseases that present high levels of IFNs I. Considering this background, it is interesting to ask if IFNs I could modulate pri-miR-145 processing and hsa-miR-145-5p levels through the m6A and adenosine to inosine editing enzymatic machine, and thus altering MUC1 and TLR4 levels? To answer this question, the following hypothesis was formulated: type I interferons increase MUC1 and TLR4 levels by decreasing post-transcriptional processing of hsa-miR-145-5p due to alterations in the m6A or adenosine to inosine editing enzymatic machinery in the SG from patients with SS. To test this hypothesis, hsa-miR-145-5p levels and its predicted targets MUC1 and TLR4 were determined in the SG from patients with SS and HSG cells stimulated with IFNs I, and functional assays were performed. pri-miR-145 levels were also determined and the enzymatic machinery of m6A (METTL3, METTL14, FTO, ALKBH5 and hnRNPA2B1) and A->I (ADAR1p110 and ADAR1p150) was characterized in the SG of these patients and in HSG cells stimulated with IFNs I. ADAR1p150 was then silenced in HSG cells stimulated with IFNs I and its effect on hsa-miR-145-5p levels was evaluated. The results showed decreased hsa-miR-145-5p levels that correlated inversely with MUC1 and TLR4 in the SG of patients with SS and was then corroborated using functional assays. In addition, an association was found between the activation of the IFNs I pathway and hsa-miR-145-5p levels in the SG of patients with SS, which was reproduced in HSG cells stimulated with IFNs I. In SG, activation of the IFNs I pathway correlated directly with pri-miR-145 levels and METTL3, ALKBH5, and ADAR1p150 transcripts, and inversely with METTL3 protein levels. However, in cells stimulated with IFNs I, only an increase in ADAR1p150 transcript and protein levels was observed. Finally, by silencing ADAR1p150, the IFNs I-induced decrease in hsa-miR-145-5p could be reversed, suggesting a role for the IFNs I-inducible isoform in the process. The

mechanisms through which ADAR1p150 modulates hsa-miR-145-5p levels in an IFNs I-dependent manner remain to be determined. However, it is possible that decreased processing of pri-miR-145 is due to a blockage of the interaction with the microprocessor complex by ADARp150 binding or A->I editing. Both mechanisms would lead to an accumulation of pri-miRNA and a decrease in mature miRNA, as observed in the SG of SS patients.

In conclusion, IFNs I decrease hsa-miR-145-5p levels, which favors MUC1 and TLR4 overexpression and could be caused by reduced processing of pri-miR-145 given the increase in ADAR1p150. These findings contributed to the understanding of the mechanisms that regulate hsa-miR-145-5p levels in the SS and the impact that the diminished has-miR-145-5p levels could have on inflammation and glandular dysfunction, by modulating MUC1 and TLR4. This will help the future development of new therapeutic interventions that will allow the recovery of glandular homeostasis and with it, improve the quality of life of patients with SS.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Sjögren

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune e inflamatoria que afecta a las glándulas exocrinas, principalmente a las glándulas salivales (GS) y lacrimales, lo que conduce a una disfunción secretora [1]. En las GS, esta disfunción se caracteriza por alteraciones en la cantidad y calidad de la saliva que genera la sensación de sequedad bucal (xerostomía) característica de la enfermedad [2]. Hasta un 75% de los pacientes pueden presentar un amplio espectro de manifestaciones sistémicas, dando cuenta de la complejidad y heterogeneidad de este síndrome [3]. Dentro de estas manifestaciones se incluyen alteraciones vasculares y de órganos extra-glandulares, afecciones inespecíficas como fatiga y dolores en las articulaciones, y en un 5 a 10% de los pacientes el desarrollo de linfoma no-Hodgkin [1, 4, 5].

Dada la naturaleza autoinmune de la enfermedad, los pacientes presentan autoanticuerpos circulantes como anti-Ro/SSA y anti-La/SSB y un infiltrado inflamatorio linfocítico periductal en las GS [1]. En concordancia con sus características inflamatorias, los pacientes exhiben niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias a nivel sistémico y en las GS, en dónde son producidas tanto por las células inflamatorias como por células del epitelio glandular [6-8]. Dentro de estas citoquinas destacan los **interferones de tipo I (IFNs I)** con una creciente evidencia que resalta su rol en la iniciación y progresión del SS [9].

Esta enfermedad afecta principalmente a mujeres de mediana edad, en una relación 9:1 con respecto a los hombres, y es la segunda enfermedad autoinmune reumática más prevalente en el mundo luego de la artritis reumatoide (AR) [5, 10]. En Chile no hay estudios de prevalencia. Además, el SS tiene un carácter crónico, progresivo y debilitante, lo que afecta gravemente la calidad de vida de los pacientes [3]. Estos antecedentes realzan la necesidad de realizar investigaciones que aumenten la comprensión de la etiopatogenia del SS y permita el desarrollo de alternativas terapéuticas que beneficien a los pacientes. Aunque la etiología del SS no ha sido dilucidada, se considera una enfermedad multifactorial cuyo desarrollo involucra una compleja interconexión de factores que incluyen predisposición genética, determinantes ambientales, mecanismos epigenéticos y asociados a RNAs no codificantes como miRNAs [1, 5].

miRNAs

Los miRNAs son RNAs no codificantes de hebra simple, de 18 a 25 nucleótidos [11, 12]. De acuerdo con el tipo celular y el contexto fisiológico, presentan distintos niveles de expresión y regulan la mayoría de los procesos celulares, incluyendo la homeostasis inmune y la respuesta inflamatoria [11, 13]. Los miRNAs regulan la expresión de muchos genes a nivel postranscripcional, mediante la unión complementaria de su “secuencia semilla” a una región específica del 3’ UTR de sus RNA mensajeros (mRNAs) blancos. La “secuencia semilla”

corresponde a una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' del miRNA que va desde el nucleótido 2 al 7/8 y que tiene como función reconocer al mRNA blanco mediante el apareamiento de bases. Esta unión detiene la traducción del mensajero y promueve su degradación a través del reclutamiento de complejos que remueven la cola poli(A) en el extremo 3' y la estructura CAP en el 5' [11].

Los miRNAs son transcritos desde secuencias intragénicas e intergénicas por la RNA polimerasa II, generando un transcrito largo de aproximadamente 1Kb denominado miRNA primario o **pri-miRNA**, el cual se pliega formando una horquilla que contiene al futuro miRNA maduro [11, 14]. En el núcleo, este pri-miRNA es procesado por el complejo microprocesador compuesto por la proteína de reconocimiento del pri-miRNA DGCR8, y la endonucleasa Drosha, generando el pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos que es exportado fuera del núcleo por la proteína exportina 5 (XPO5) [14]. Ya en el citoplasma, este pre-miRNA es procesado por un complejo formado por las proteínas de unión a RNA de doble hebra TRBP y PACT y la endonucleasa Dicer, que corta el *loop* de la horquilla, generando un miRNA de doble hebra o dúplex. De este dúplex, una hebra (hebra guía o miRNA maduro) será cargada al complejo silenciador inducido por RNA (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*) compuesto por las proteínas AGO (del inglés *Argonaute*) [14]. Finalmente, el miRNA maduro guía al complejo RISC hacia el mRNA blanco para promover su silenciamiento [11, 14, 15] (**Figura 1**).

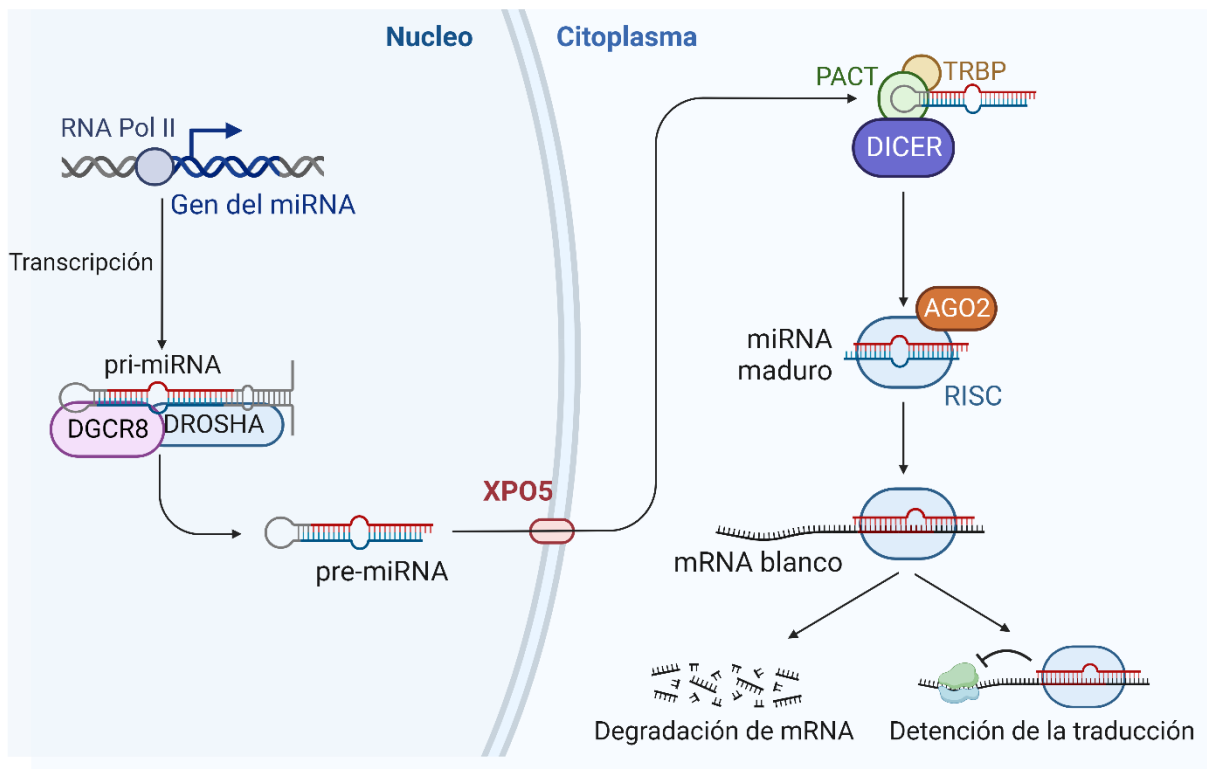


Figura 1. Biogénesis canónica de miRNAs. La biogénesis canónica de los miRNAs comienza con su transcripción desde el genoma por la RNA polimerasa II, generando un miRNA primario (pri-miRNA). El pri-miRNA forma una horquilla compuesta por un *loop*, un segmento doble hebra o tallo que contiene al que será el miRNA maduro (señalado en rojo) y dos extremos simple hebra. Este pri-miRNA es

procesado en el núcleo por el complejo microprocesador compuesto por la proteína de unión a RNA de doble hebra DGCR8, y la RNAsa III Drosha, quien procesa el tallo para eliminar los extremos simple hebra. El producto de procesamiento resultante (pre-miRNA), se exporta mediante exportina 5 (XPO5) hacia el citoplasma. En el citoplasma, este pre-miRNA es procesado por el complejo Dicer/TRBP/PACT generando un dúplex sin el *loop* de la horquilla. La hebra funcional de miRNA maduro (mostrada en rojo) se une a la proteína Argonauta 2 (Ago2) y forma el complejo RISC para silenciar los mRNA blanco mediante la represión traduccional o la degradación del mRNA. Creado con BioRender.

miRNAs en el SS

Se han reportado niveles alterados de miRNAs tanto a nivel de células inmunes sanguíneas, como en las GS de pacientes con SS [13, 16, 17]. La mayoría de los trabajos han estudiado estas alteraciones en PBMCs (del inglés *peripheral blood mononuclear cell*) o en subtipos específicos de células inmunes, como linfocitos T o linfocitos B, con enfoque en la búsqueda de biomarcadores y miRNAs diferencialmente expresados. Si bien se ha demostrado la expresión diferencial de miRNAs en GS de pacientes con SS con respecto a individuos controles, sigue siendo necesario profundizar en los mecanismos que llevan a su desregulación y los efectos biológicos de estas alteraciones. Esto aumentará la comprensión respecto al impacto de estas modificaciones en la patogénesis del SS, favoreciendo el hallazgo de posibles nuevos puntos de intervención terapéutica.

Entre los miRNAs que se han encontrado diferencialmente expresados en GS de pacientes con SS con respecto a individuos controles, destaca el **hsa-miR-145-5p**, miRNA que ha sido vinculado a la homeostasis del sistema inmune y que se ha reportado disminuido en contextos inflamatorios como colitis ulcerosa [19]. Además, el aumento de sus niveles inhibe la liberación de IL-6 en células de músculo liso de la vía aérea y la expresión de quimioquinas como CXCL16, lo que ha llevado a sugerir efectos anti-inflamatorios para este miRNA [18, 19]

hsa-miR-145-5p y sus blancos: MUC1 y TLR4

El hsa-miR-145-5p es transcrito desde un gen situado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q32-33) y su hebra madura tiene un largo de 23 nucleótidos [20]. Se han descrito niveles disminuidos de este miRNA en células T de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) así como en biopsias de piel y fibroblastos de pacientes con Esclerosis Sistémica (ES), en vasculatura renal dañada de pacientes con nefritis lúpica y en PBMCs de pacientes con *miastenia gravis* autoinmune [21-25]. Por otro lado, han reportado niveles aumentados de este miRNA en PBMCs de pacientes con LES, AR y ES, y en tejido sinovial de pacientes con AR [26-29]. En SS no se ha estudiado este miRNA en profundidad, pero si se ha encontrado niveles disminuidos en GS y elevados en PBMCs de pacientes con SS, como parte de los hallazgos asociados a *screening* masivo de miRNAs [30, 31]. En nuestro laboratorio hemos encontrado niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p en GS de pacientes con SS por medio de secuenciación masiva de RNAs pequeños (sRNAs) [32]. Sin embargo, ninguno de estos hallazgos en *screening* masivos ha sido validado.

Sumado a estos antecedentes, resulta interesante estudiar este miRNA debido a que tiene como blancos predichos los transcritos de **MUC1** y **TLR4**. Estudios previos de nuestro laboratorio evidencian niveles elevados de transcrito y proteína de MUC1 y niveles elevados de transcrito TLR4 las GS de pacientes con SS [33, 34]. MUC1 es una mucina clave en la mantención de la hidratación de las mucosas y que a pesar de estar sobreexpresada en las GS de pacientes con SS, es retenida en el citoplasma de las células acinares, lo que se asocia a disfunción secretora [35]. Además, los altos niveles de las isoformas MUC1-SEC y MUC1-Y reportados en esta enfermedad pueden favorecer la síntesis de citoquinas a través del péptido “*immuno-enhancing*” de MUC1-SEC o a través de la formación de un complejo MUC1-SEC/MUC1-Y [36], lo que sugiere la existencia de una regulación entrecruzada entre las citoquinas y las mucinas que podrían perpetuar la inflamación en pacientes con SS [33, 37]. Por otro lado, TLR4 es un receptor del sistema inmune innato que además de reconocer moléculas bacterianas como LPS, es activado por mucinas secretadas ectópicamente en las GS de los pacientes con SS [34]. Esta activación induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias entre las que se incluyen los IFNs I [34], por lo que un aumento en su expresión podría contribuir a la mantención de la inflamación de las GS en pacientes con SS.

Considerando la relevancia de MUC1 y TLR4 para la homeostasis glandular y el posible rol de hsa-miR-145-5p en su modulación, resulta relevante comprender los mecanismos que llevarían a una desregulación de este miRNA. Se han propuesto varios mecanismos que en conjunto determinarían los niveles del hsa-miR-145-5p, entre los que se incluyen la metilación de su promotor y la unión de factores de transcripción [38]. **Interesantemente, se ha reportado también que los niveles de este miRNA podrían estar regulados por IFNs I [39], citoquinas cuyas vías se encuentran activadas en un 50 a 80% de los pacientes con SS [40, 41].**

Interferones de tipo I

Los IFNs I son un conjunto de citoquinas pro-inflamatorias estructuralmente similares, dentro de las cuales las de mayor relevancia e interés inmunológico son los 13 subtipos de IFN- α e IFN- β [42, 43]. Son secretados como parte de la respuesta inmune innata principalmente ante una infección viral. Su expresión es inducida por la unión de distintos tipos de ácidos nucleicos a receptores citoplasmáticos y ubicuos como RIG-1 (del inglés *retinoic acid inducible gene 1*) y MDA5 (del inglés *melanoma differentiation-associated protein 5*), y a receptores endosomales como los TLR (del inglés *toll-like receptor*) 3, 7/8 y 9, expresados preferentemente en células dendríticas y macrófagos [42]. La unión al ácido nucleico viral desencadena una cascada de señalización que comienza con la unión de proteínas adaptadoras específicas, las cuales reclutan quinasas que fosforilan y activan a los factores de transcripción IRF3 e IRF7, los que inducen la transcripción de IFN- α /IFN- β [42]. La

activación del receptor de membrana plasmática TLR4 por estímulos bacterianos como LPS también puede desencadenar la producción de IFNs I [42].

Ambos, IFN- α e IFN- β se unen al receptor de interferones de tipo I (IFNAR) e inducen la dimerización de las subunidades del receptor [43]. Esta dimerización promueve la activación de las tirosinas quinasas citoplasmáticas asociadas con el consecuente reclutamiento y fosforilación de STAT1 y STAT2 [43, 44]. Ambas proteínas se liberan del receptor como un heterodímero que se une a IRF9 formando un complejo denominado ISGF3 (del inglés *interferon-stimulated gene factor 3*) [43]. Este se destina al núcleo y se une a secuencias consenso denominadas ISRE (del inglés *IFN-stimulated response elements*) en promotores de genes inducidos por IFN I o ISGs (del inglés *interferon-stimulated genes*), desencadenando la transcripción de genes de la respuesta antiviral [42, 43]. STAT1 fosforilado también puede formar homodímeros que en el núcleo se unen a secuencias consenso denominadas GAS (del inglés *gamma-activated sequence*), desencadenando la transcripción de genes pro-inflamatorios [42, 43].

Los IFNs I tienen un rol clave en la inmunidad pues, además de mediar la respuesta antiviral, actúan como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa debido a sus múltiples efectos inmunomoduladores [45]. Estos efectos incluyen el aumento de la presentación antigénica, la activación de linfocitos T y el aumento de la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas [40, 45]. En este sentido, la desregulación de los niveles de IFNs I puede conducir al desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, incluida la ES, la AR, el LES y el SS [45].

Interferones de tipo I y SS

Un número creciente de evidencias sugiere una sobreactivación de la vía de IFNs I en pacientes con SS [40, 41]. Aunque algunos reportes presentan discrepancias [46-49], mediante el uso de ensayos en que se mide la capacidad del plasma para inducir la expresión de los genes inducidos por IFNs I en células reporteras, se ha observado de manera consistente una actividad aumentada de IFNs I en el plasma de pacientes con SS [50-52]. En conjunto con estos hallazgos, un gran número de pacientes con SS presentan lo que se conoce como una “firma de interferón” (del inglés, “*IFN signature*”), o la expresión elevada de genes inducidos por IFNs I, tales como IFIT3 (del inglés *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3*) y Mx-1/MxA (del inglés *Myxovirus-resistance protein 1*) [40, 41]. Esta marca se ha detectado en diversos tipos de células inflamatorias circulantes, así como en GS de pacientes con SS, incluyendo un trabajo de microarreglos, de nuestro laboratorio, en el cual se detectaron expresados diversos ISGs [40, 41, 53].

Los IFNs I pueden modular los niveles de miRNAs a través de la regulación de distintas etapas de su biogénesis [54] proceso que está bajo un estricto control temporal y espacial [55].

Regulación de la biogénesis de miRNAs

La regulación de la biogénesis de miRNAs ocurre en todas las etapas de este proceso e involucra tanto mecanismos transcripcionales asociados a la regulación de la expresión de miRNAs desde sus secuencias génicas, como mecanismos postranscripcionales asociados al procesamiento y maduración del miRNA [14, 55]. Una etapa clave en la determinación de los niveles de miRNA maduros es el procesamiento del **pri-miRNA** a través del reconocimiento y corte por el complejo microprocesador [56]. Este proceso depende de su interacción con la maquinaria de procesamiento, lo que a su vez depende de los niveles, disponibilidad y actividad de las proteínas de la maquinaria, como de la secuencia nucleotídica del pri-miRNA [14, 55]. Múltiples vías de señalización pueden incidir en la regulación postranscripcional de la biogénesis de miRNAs, incluida la de los IFNs I.

Wiesen y colaboradores reportaron que niveles elevados de IFN- α reducen los niveles proteicos de Dicer, lo que altera el procesamiento de los pre-miRNAs [57]. En esta misma línea, Witteveldt y colaboradores demostraron que la activación de la vía de IFNs I disminuye la unión del complejo microprocesador al pri-miRNA [58]. Esto reduce las tasas de procesamiento, generando la acumulación de pri-miRNAs y la disminución de los niveles de distintos miRNA maduros [58]. Si bien en el SS se ha descrito tanto la sobreactivación de la vía de IFNs I, como la expresión alterada de miRNAs con respecto a individuos controles, el mecanismo por el cual estas citoquinas podrían modular los niveles miRNAs en el SS aún requiere ser explorado.

La interacción entre el complejo microprocesador y los pri-miRNAs está mediada entre otros factores, por modificaciones del RNA o marcas epitranscriptómicas como la **metilación de las adenosinas en la posición N6 (m6A)** [59] o **ediciones del pri-miRNA que cambian adenosinas por inosinas** [55].

La **metilación de las adenosinas en la posición N6 (m6A)** en los pri-miRNA es una modificación que promueve su procesamiento a través del reclutamiento del complejo microprocesador, contribuyendo a aumentar los niveles de miRNA maduros [59, 60]. Alarcón y colaboradores reportaron *in vitro* e *in vivo* que la acumulación co-transcripcional de m6A en el pri-miRNA promueve su reconocimiento por DGCR8, proteína que es parte del complejo microprocesador, favoreciendo su procesamiento [59]. La metilación de las adenosinas en el RNA es catalizada en el núcleo por un dímero formado por las metiltransferasas METTL3 y METTL14 y puede ser removida mediante reacciones oxidativas catalizadas por las desoxigenasas FTO y ALKBH5 [61-63]. Los efectos funcionales de m6A son mediados por proteínas lectoras que reconocen la modificación en el contexto específico en dónde es colocada, generando los efectos río abajo [64]. Dentro de estas proteínas lectoras se encuentra HNRNPA2B1, que actuaría como puente entre DGCR8 y m6A en el pri-miRNA [60]. Recientemente, se reportaron alteraciones en los niveles de METTL3 en PBMCs de pacientes con AR y de METTL14 en PBMCs de pacientes con LES, ambas enfermedades que, al igual que el SS, presentan una

sobreactivación de la vía de IFNs I [65, 66]. La alteración en los niveles de METTL3 en AR se asoció a cambios en los niveles de m6A totales, sin embargo, no se estudió el efecto específico de esta desregulación en el procesamiento de pri-miRNAs. En el SS no existen trabajos que estudien el rol de esta modificación y su maquinaria en la biogénesis de miRNAs.

Por otro lado, los niveles de miRNA maduros pueden ser regulados postranscripcionalmente a través de la **edición del pri-miRNA, específicamente a través de la conversión de adenosinas en inosinas mediante desaminación hidrolítica** [55]. Se ha reportado que la edición de pri-miRNAs disminuye su procesamiento a través de la disminución del reconocimiento por el complejo microprocesador, lo que genera una disminución en los niveles del miRNA maduro [67]. Esta reacción de desaminación es catalizada en regiones de RNA doble hebra, principalmente en regiones intrónicas, regiones no traducidas, elementos repetitivos como Alu (SINE) y RNAs no codificantes, incluidos los pri-miRNAs, por las proteínas ADAR1 y ADAR2, miembros de la familia de enzimas ADAR (del inglés *adenosine deaminase acting on RNA*) [68, 69]. ADAR1 es la más abundante y presenta dos isoformas enzimáticamente activas de distinto peso molecular generadas por el uso de promotores alternativos [68, 69] (**Figura 2**). La isoforma corta (ADAR1 110p) está truncada hacia el N-terminal, se expresa de manera constitutiva y se localiza en el núcleo [69]. La isoforma larga (ADAR1p150) se localiza principalmente en el citoplasma, pero puede translocar al núcleo y su expresión está regulada por IFNs I a través de elementos ISREs en su promotor [55, 69].(**Figura 2**)

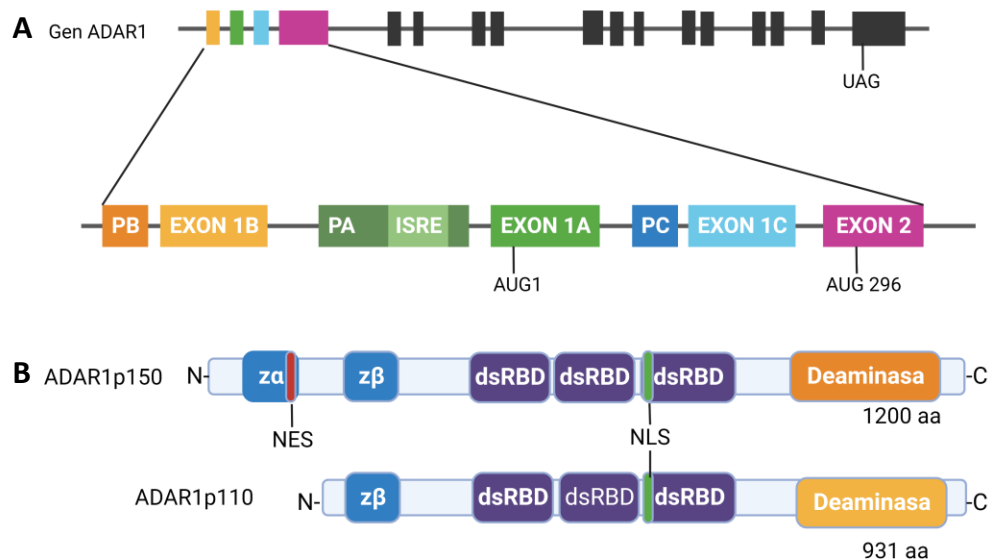


Figura 2. Sistema de promotores alternativos de ADAR1 y dominios de sus isoformas (A). Un único gen que contiene 17 exones (barras negras y color) codifica para ambas isoformas de ADAR1. El gen es regulado por 3 promotores, de los cuales dos regulan la expresión constitutiva de la isoforma ADAR1p110 y 1 regula la expresión de la isoforma ADAR1p150. Cada promotor genera transcritos con exones 1 distintos (1A, B y C). El promotor inducible por IFN I (PA) tiene elementos ISRE y genera un transcrito con el exón 1 1A, que tiene un codón de inicio AUG1 en marco correcto de lectura, y codifica la isoforma ADAR1p150. Los promotores constitutivos (PB y PC) generan transcritos con exón 1B o 1C, los cuales no tienen codón de inicio en marco correcto de lectura por lo que parten su traducción en el exón 2, codificando la isoforma ADAR1p110 (**B**) Hacia c-terminal ADAR1p110 y ADAR1p150 tienen una estructura proteica similar, teniendo ambas un dominio desaminasa, tres dominios de unión a RNA de doble hebra (dsRBD del inglés *double strand RNA binding*

domain), una secuencia de localización nuclear (NLS del inglés *nuclear localization signal*) y un dominio de unión a Z-DNA Z β . Hacia n-terminal las diferencia un segmento de 269 aminoácidos extra en la isoforma ADAR1p150 que contiene otro dominio de unión a Z-DNA Z α y una secuencia de exporte nuclear (NES del inglés *nuclear export signal*). Creado con Biorender

En tejido sinovial y en PBMCs de pacientes con AR se han detectado niveles elevados de la isoforma inducida por interferón, lo cual se asoció a un aumento en la edición del RNA [70]. En esta misma línea, en LES se han encontrado niveles elevados de ADAR1p150 en linfocitos T, lo cual indujo a su vez un aumento en la edición de RNAs totales replicable *in vitro* a través de la estimulación con IFN- α [71]. En ninguno de estos trabajos se estudió el efecto de la edición en el procesamiento de pri-miRNAs. En SS han reportado niveles elevados de ADAR1 en PBMCs de pacientes con SS [49], y en nuestro laboratorio hemos encontrado niveles elevados de transcritos de ADAR1 en GS de pacientes con SS [53], sin embargo, hasta ahora no se han estudiado ambas isoformas por separado, ni se ha evaluado su rol en la biogénesis de miRNAs.

En conjunto, los siguientes antecedentes permiten postular la hipótesis de este trabajo:

- Los pacientes con SS presentan una sobreactivación de la vía de **IFNs I** y niveles alterados de **miRNAs** en sus GS.
- Entre estos miRNAs destaca el **hsa-miR-145-5p**, miRNA que se ha encontrado **disminuido** en secuenciacines masivas de RNAs pequeños en GS de pacientes con SS.
- El hsa-miR-145-5p tiene como blancos predichos los transcritos de **MUC1** y **TLR4**, moléculas que se han encontrado **sobreexpresadas** en GS de pacientes con SS y que promueven la inflamación y disfunción glandular.
- Los **IFNs I** pueden **disminuir el procesamiento de pri-miRNAs al alterar su interacción con el complejo microprocesador**, generando niveles disminuidos de miRNA maduro.
- La interacción entre el complejo microprocesador y el pri-miRNA puede ser mediada por las marcas epitranscriptómicas **m6A** y **A->I**.
- La **maquinaria enzimática** asociada a m6A y A->I **presenta niveles alterados en enfermedades autoinmunes** que también muestran sobreactivación de la vía de IFNs I.

HIPÓTESIS

Interferones de tipo I aumentan los niveles de MUC1 y TLR4 a través de la disminución del procesamiento postranscripcional del hsa-miR-145-5p debido a alteraciones en la maquinaria enzimática de m6A o ediciones de adenosinas por inosinas en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de interferones de tipo I en el procesamiento del pri-miR-145 y niveles del hsa-miR-145-5p a través la maquinaria enzimática de m6A o ediciones de adenosinas por inosinas, y cómo el hsa-miR-145-5p regula los niveles de MUC1 y TLR4 en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren y células HSG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el rol del hsa-miR-145-5p en la regulación de los niveles de MUC1 y TLR4 en GS de pacientes con SS y células HSG.
2. Evaluar el rol de IFNs I en los niveles del hsa-miR-145-5p y pri-miR-145 en GS de pacientes con SS y células HSG.
3. Evaluar el rol de la maquinaria enzimática de m6A y ediciones de adenosinas en los niveles del hsa-miR-145-5p y su asociación a IFNs I en GS de pacientes con SS y células HSG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes con SS primario e individuos controles

Para este estudio se utilizaron glándulas salivales labiales (GSL) de 9 pacientes diagnosticados con SS primario y que cumplían con el criterio de clasificación del American College of Rheumatology/European League against Rheumatism (ACR/EULAR) de 2016 [72]. Según este criterio de clasificación de consenso, se consideran pacientes con SS primario a los sujetos que tienen una puntuación total ≥ 4 al sumar los puntajes asignados a cada ítem positivo de 5 parámetros que reflejan evidencia objetiva de compromiso glandular ocular, salival y la presencia del auto-anticuerpo Anti-SSA (Ro), según se detalla en la **Tabla 1**. Los criterios de exclusión comprenden el uso de fármacos anticolinérgicos, los cuales deben ser suspendidos previo a las pruebas de sequedad oral y ocular, y cualquiera de las siguientes condiciones que podrían presentar características clínicas superpuestas con el SS: antecedentes de radioterapia de cabeza y cuello, infección activa por hepatitis C (con PCR positiva), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), sarcoidosis, amiloidosis, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad relacionada con IgG4.

Tabla 1. Criterio de clasificación de SS primario del *American College of Rheumatology/European League against Rheumatism* de 2016

Parámetro	Puntaje
Biopsia de GSL con sialoadenitis linfocítica focal y score de foco ≥ 1 foco/4 mm² de tejido glandular. Un foco equivale a la acumulación de más de 50 células inflamatorias mononucleares periductales.	3
Anti-SSA (Ro) positivo	3
Tinción ocular: Score de tinción ocular OSS ≥ 5 o score de van Bijsterveld ≥ 4 en al menos un ojo	1
Test de Schirmer: ≤ 5 mm / 5 min en al menos un ojo	1
Flujo salival no estimulado: $\leq 0,1$ mL /5 min	1

OSS: *Ocular Staining Score*

Como controles se utilizaron GSL de 6 individuos que consultaron al reumatólogo por sensación de sequedad oral y/u ocular, sospechando de un posible SS, pero que no cumplieron los criterios de clasificación. Además, estos individuos no padecían enfermedades sistémicas y sus biopsias de GSL no presentaron infiltrado linfocitario o presentaron infiltrado linfocitario difuso (sialoadenitis crónica leve), además de parénquima glandular conservado y ausencia de signos clínicos o serológicos de SS. Los datos demográficos, serológicos e histológicos de los individuos incluidos en este estudio se detallan en la **Tabla 2**. A todos ellos se les informó de

los alcances del estudio a través de un consentimiento informado el cual fue aprobado, en conjunto con la metodología de este estudio, por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile ([Anexo](#). Acta de aprobación y consentimiento informado).

Tabla 2. Características demográficas, histológicas y serológicas de los pacientes con SS e individuos controles

	Individuos controles	Pacientes con SS
N° de individuos	6	9
Sexo, femenino / masculino	4/2	8/1
Edad, promedio (rango), años	40 (29-56)	37 (20-59)
Score de foco †		
1	0	2
2	0	4
3	0	3
FSNE mL/15 min, promedio (rango)	3.8 (1.2-7.5)	2.0 (0-4.5)
Test de Schirmer ≤ 5 mm/5 min al menos en un ojo N° (%)	0 (0 %)	4 (44 %)
Anticuerpos anti-Ro N° (%)	0 (0 %)	9 (100 %)
Anticuerpos anti-LA N° (%)	0 (0 %)	5 (56 %)
Anticuerpos anti-ANA N° (%)	1 (17 %)	8 (100 %)
Factor reumatoideo anti-N° (%)	0 (0 %)	4 (44 %)
ESSDAI, promedio ± DE (rango)	-	13 ± 6 (5-19)

N°: número, †Número de focos/4 mm² de tejido, FSNE: Flujo salival no estimulado, %: porcentaje, DE: desviación estándar., ANA: antinuclear antibodies, ESSDAI: EULAR Sjögren syndrome disease activity index; EULAR, European League against Rheumatism [72]

Obtención de glándulas salivales labiales

Las GSL se obtuvieron mediante la técnica operatoria descrita por Daniels [73]. Bajo anestesia local infiltrativa se realizó una incisión de 1,5 a 2 cm de longitud en la cara interna del labio inferior paralelo al borde bermellón y lateral a la línea media. Luego se llevó a cabo la disección roma de los márgenes de la incisión y se extrajeron las GSL. Finalmente, los bordes se suturaron con seda 4-0, la cual se retiró al cabo de 5-7 días. Inmediatamente después de la extracción se realizó el procesamiento de las biopsias para sus análisis posteriores, bajo estrictas condiciones libres de RNAsas. Aquellas glándulas que se utilizaron para el diagnóstico se fijaron durante 6 h en solución fijadora de Bouin, mientras que aquellas utilizadas para inmunofluorescencia se fijaron por 6 h en paraformaldehído al 1% p/v. Ambas fueron fijadas a temperatura ambiente y posteriormente incluidas en parafina (Histosec, Merck). Las glándulas utilizadas para las determinaciones de los niveles de RNAs/miRNAs y proteínas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de la extracción.

Cultivo de células HSG

En este trabajo se emplearon células derivadas de glándula submandibular humana (HSG, del inglés *human submandibular gland*) gentilmente donadas por el Profesor Dr. Bruce Baum (NIDCR, NIH, Bethesda, MD, EEUU). Las células HSG son de origen epitelial transformadas y aisladas desde células ductales intercalares de una glándula submandibular humana irradiada [74]. Las células se cultivaron a 37 °C y 5 % CO₂ en medio de cultivo DMEM F-12 suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino (SFB), penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL. Posteriormente, se cosecharon utilizando tripsina/EDTA 0,25 % v/v y se suspendieron en medio de cultivo con 5 % v/v SFB. De esta suspensión se sembraron 200.000 o 400.000 células por pocillo en placas de cultivo de 12 o 6 pocillos respectivamente. A cada pocillo se le agregó 1 o 2 mL de DMEM-F12 5 % SFB, y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ durante 24 h. Posteriormente el medio fue reemplazado por DMEM-F12 sin suero y sometido a las diferentes condiciones experimentales.

Estimulación de células HSG con IFN- α e IFN- β

Para evaluar el efecto de los IFNs I en los niveles del hsa-miR-145-5p y los blancos de este miRNA se estimularon células HSG con IFN- α humano recombinante (BioLegend, CA, EEUU) o IFN- β humano recombinante (RyD, Mn, EEUU). Para esto, se sembraron 400.000 células en placas de cultivo de 6 pocillos con 2 mL de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 5 % SFB durante 24 h. Cuando las células llegaron a un 80 % de confluencia se privaron de suero por 24 h y luego se incubaron con 1 o 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β preparados en medio DMEM F12 sin suero, por 24 h. Posteriormente, las células se lisaron para extraer RNAs totales o proteínas según el protocolo descrito más adelante.

Ensayos funcionales en células HSG con imitador e inhibidor de hsa-miR-145-5p

Para evaluar el efecto de los niveles del hsa-miR-145-5p en los niveles de transcrito y proteína de sus blancos, se transfectaron células HSG con un imitador comercial (*mimic*) o inhibidor comercial (*inhibitor*) del miRNA. Los *mimic* corresponden a moléculas pequeñas de RNA de doble hebra, químicamente modificadas y diseñadas para imitar miRNAs endógenos maduros, generando la disminución de sus blancos. Por otra parte, los *inhibitor* corresponden a moléculas de RNA de hebra simple, químicamente modificadas y diseñadas para unirse al miRNA maduro e inducir su degradación, provocando el aumento de sus blancos. Para este ensayo se sembraron 200.000 células en placas de cultivo de 12 pocillos con 1 mL de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 5 % SFB durante 24 h. Cuando las células llegaron a un 80 % de confluencia, se transfectó el *mimic* o *inhibitor* de hsa-miR-145-5p (mirVana™ miRNAs mimic o inhibitor, Ambion, TX, EEUU a distintas concentraciones (3, 30 o 100 nM). En paralelo, las células se transfectaron con controles negativos de mimic o

inhibitor comerciales (mirVana™ miRNAs mimic o inhibitor, Ambion, TX, EEUU), cuyas secuencias no se dirigen a ningún gen humano. Para esto se incubaron los mimic, inhibitor o controles negativos con el reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen, Hilden, Alemania), durante 10 min a temperatura ambiente en medio DMEM-F12 sin suero. HiPerFect (Qiagen, Hilden, Alemania) está desarrollado en base a lípidos catiónicos y neutros para la transfección de RNAs pequeños. Paralelamente, las células se lavaron con PBS 1X y se dejaron con medio DMEM-F12 sin suero. Se agregó la mezcla de transfección por goteo y luego, se realizaron suaves movimientos envolventes a la placa. Luego de 3, 6, 9 ó 24 h de transfección se realizó la lisis de las células HSG utilizando QIAzol (Qiagen, Hilden, Alemania) para extraer RNAs totales o tampón RIPA con inhibidores de proteasas para extraer de proteínas.

Silenciamiento de ADAR1p150

Para evaluar el rol de la isoforma inducible por IFNs I de ADAR1 (ADAR1p150) en los niveles del hsa-miR-145-5p y de los blancos de este miRNA, se utilizó un siRNA Silencer® Select Designed siRNA (Ambion, CA, EEUU) dirigido específicamente contra esta isoforma (Secuencia: *Sense strand* (5'→3'): GCCUCGCGGGCGCAAUGAATT; *Antisense* (5'→3') UUCAUUGCGCCCGAGGCAT) en células HSG que se estimularon con IFN-α o IFN-β. Se sembraron 400.000 células en placas de cultivo de 6 pocillos con 2 mL de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 5 % SFB durante 24 h hasta alcanzar un 80% de confluencia. Luego, se preparó una mezcla de transfección con 5 o 10 nM del siRNA ADAR1p150 o siRNA control cuya secuencia no está dirigida contra ningún transcrito humano y HiPerFect (Qiagen, Hilden, Alemania). La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente en medio DMEM-F12 sin suero. Transcurrido este tiempo, se agregó la mezcla de transfección por goteo a cada pocillo, se realizaron suaves movimientos envolventes a la placa y se incubó por 24 h. Posteriormente, las células HSG se estimularon con 10 ng/mL de IFN-α (BioLegend, CA, EEUU) o IFN-β (RyD, Mn, EEUU) preparadas en medio DMEM-F12 sin suero por 24 h. Finalmente, las células se lisaron utilizando QIAzol (Qiagen, Hilden, Alemania) para extraer RNAs totales.

Extracción de RNA total

Tanto para la detección de RNAs mensajeros de los genes de interés como para la detección de los niveles del hsa-miR-145-5p y su precursor pri-miR-145 se utilizaron extractos de RNAs totales obtenidos desde una misma glándula o pocillo de cultivo celular. Para esto se utilizó el método de extracción orgánica y purificación de RNA mediante una columna de sílica-gel miRNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), que permite la retención de RNAs pequeños (en un rango de 18 a 200 nucleótidos). En el caso de la extracción desde GSL, se pulverizaron utilizando N₂ líquido y ejerciendo presión con un pistilo sobre un mortero de porcelana. Posteriormente, se agregaron a la muestra 700 µL del reactivo de lisis (fenol y tiocianato de

guanidinio) (QIAzol, Qiagen, Hilden, Alemania) y se continuó con la disgregación del tejido en el mortero y se homogenizó con la ayuda de un homogeneizador vidrio-vidrio. Por otra parte, para extraer el RNA desde placas de cultivo, se lavaron las células HSG en PBS 1X y se lisaron utilizando un *cell scraper* y 300 µL de QIAzol. Tanto el lisado obtenido de GSL como el de células HSG, se pasaron por la punta de una jeringa desechable de tuberculina cinco veces, y se mantuvo por 5 min a temperatura ambiente para favorecer la disociación de complejos nucleoproteicos. Posteriormente se agregaron 140 µL de cloroformo en el caso de GSL y 60 µL en el caso de células HSG, se agitó la mezcla vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente por 3 min. El volumen resultante se centrifugó a 10.500 rpm por 15 min y 4 °C (centrífuga Hettich 32R, rotor 9.7 cms). La fase acuosa superior, que contiene los RNAs, se transfirió a un tubo con etanol 100% y esta mezcla se depositó en columnas miRNeasy y se centrifugó durante 15 s a 12.000 rpm. El RNA unido a la membrana de sílica se lavó para eliminar los residuos de fenol y otros contaminantes con tampón RWT (tampón de lavado de composición confidencial, con isopropanol y tiocianato de guanidinio como principales componentes, miRNeasy mini kit, Qiagen, Hilden, Alemania) y se centrifugó durante 15 s a 12.000 rpm. Para eliminar una posible contaminación con DNA genómico, se realizó un tratamiento con DNAsa I, para lo cual se agregó al centro de las columnas 80 µL de una mezcla de digestión compuesta por 10 µL de DNAsa I y 70 µL de tampón RDD (presente en el set de DNAsa I, Qiagen, Hilden, Alemania). Después de 45 min de incubación a temperatura ambiente, se lavó la membrana con tampón RWT y se centrifugó durante 15 s a 12.000 rpm. Luego se realizaron dos lavados consecutivos con tampón RPE (tampón de lavado de composición confidencial, con etanol como principal componente miRNeasy mini kit, Qiagen, Hilden, Alemania) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 s cada vez. Finalmente, el RNA total se eluyó con 20 µL de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNA se determinó midiendo la absorbancia de cada muestra (dilución 1:200) a 260 y 280 nm y calculando la relación 260/280. Todas las muestras que se utilizaron presentaron una relación de 1,8 a 2,0. La concentración de RNA se determinó empleando la siguiente fórmula: $[RNA] = 200 (\text{factor de dilución}) \times (\text{Abs. a } 260 \text{ nm}) \times 40 (\mu\text{g/mL})$.

Determinación de los niveles de expresión del hsa-miR-145-5p a través de ensayo Taqman

Para determinar los niveles del hsa-miR-145-5p se realizó un ensayo de Taqman específico para miRNAs. Esta tecnología involucra la retro-transcripción (RT) específica del hsa-miR-145-5p a través de sondas comerciales de RT de tipo *stem-loop* que permiten alargar la molécula corta de miRNA de manera específica para así retro-transcribirla. Posteriormente, esta molécula es amplificada y detectada específicamente a través de sondas comerciales de hidrólisis de secuencia complementaria al hsa-miR-145-5p maduro.

Retro-transcripción del miRNA maduro

Para la reacción de RT se utilizó el kit de transcripción reversa Taqman™ MicroRNA (Applied Biosystems, MA, EEUU). Se preparó una mezcla que incluyó 200 ng de RNA total, 1,5 µL de tampón RT 10X, 1 µL de transcriptasa reversa Multiscribe 50 U/µL, 0,15 µL dNTPs 100 mM, 0,19 µL de inhibidor de RNAsas 20 U/µL y 4,16 µL de agua libre de nucleasas, además de 3 µL de sonda comercial *stem-loop* RT-específica para el hsa-miR-145-5p. La misma reacción se realizó de manera paralela para la RT del gen *housekeeping* U48, utilizando una sonda comercial específica para este transcrito. Ambas mezclas se incubaron por 5 min en hielo y luego a 16 °C por 30 min, a 42 °C por 30 min y finalmente a 85 °C por 5 min.

PCR en tiempo real de miRNAs

Para determinar los niveles de expresión del hsa-miR-145-5p se utilizaron sondas de hidrólisis comerciales específicas para la detección de hsa-miR-145-5p maduro o U48 de Taqman™ MicroRNA Assays (Applied Biosystems, MA, EEUU) y Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, MA, EEUU). Se preparó una mezcla de 6 µL de Universal Master Mix II, 1,33 µL de cDNA de miRNAs preparado en la RT-específica, 1 µL de sonda de hidrólisis y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 µL. La mezcla se incubó 30 s a 25 °C, luego se calentó 10 min a 95 °C para activar la enzima, para finalmente someterla a 40 ciclos alternados de 15 s a 95 °C de desnaturalización y 1 min a 60 °C para el apareamiento y elongación de los partidores. Como control negativo se utilizó una reacción sin templado. Los niveles de miRNA se normalizaron a los niveles del gen *housekeeping* U48 y para el cálculo de los niveles de expresión relativa se utilizó el modelo calibrado por eficiencia [75].

Determinación de los niveles de expresión del pri-miR-145 a través de ensayo Taqman

Para la detección de los niveles de pri-miR-145 se sintetizó cDNA a través de un kit optimizado para la retro-transcripción de transcritos largos, con estructuras secundarias y de bajo nivel de expresión. Posteriormente el pri-miR-145 fue amplificado y detectado mediante el uso de sondas de hidrólisis comerciales Taqman™ específicas. A pesar de que los pri-miRNA no se han mapeado de manera exhaustiva, esta tecnología permite detectar este precursor de manera específica debido al uso partidores de amplificación y sondas de detección que sean complementarias a alguna secuencia lo más cercana al *stem-loop* que contiene al pre-miRNA y miRNA maduro. Esto se logra a través del mapeo de la secuencia de *stem-loop* de interés reportada en la base de datos miRBase [76] con la versión más reciente del genoma humano y el diseño de partidores de amplificación y detección para secuencias que se encuentren dentro de los 500 pb que flanquean inmediatamente ambos lados del *stem-loop*. La detección del pri-miRNA en conjunto con el miRNA maduro

permiten discernir si las alteraciones observadas en los niveles de miRNA maduro se asocian a alteraciones transcripcionales o de su procesamiento.

Retro-transcripción del pri-miRNA

Para la reacción de RT se utilizó el kit de transcripción reversa AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, CA, EEUU). Se preparó una mezcla que incluyó 1 µg de RNA total, 10 µL de First strand master mix 2X, 1 µL de la mezcla que contiene la enzima AffinityScript RT e inhibidor de RNasa, 1,7 µL de partidores oligo(dT) (0.1 µg/µL), 0,3 µL de partidores al azar (0.1 µg/µL) y agua libre de nucleasas para llevar la mezcla a 20 µL. Esta mezcla se incubó 5 min a 25 °C, luego 45 min a 42 °C para favorecer la RT de transcritos largos y finalmente 5 min a 95 °C.

PCR en tiempo real del pri-miRNA

Para determinar los niveles de expresión del pri-miR-145 se utilizaron sondas de hidrólisis específicas para la detección de pri-miR-145 o h18S de Taqman™ Pri-miRNA Assays (Applied Biosystems, MA, EEUU) y Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, MA, EEUU). Se preparó una mezcla de 10 µL de Universal Master Mix II, 1 µL de sonda de hidrólisis comercial dirigida contra el pri-miR-145 o h18S, 4 µL de cDNA obtenido en el paso anterior a dilución 1/4 y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 µL. La mezcla se incubó 30 s a 25 °C, luego se calentó 10 min a 95 °C para activar la enzima, para finalmente someterla a 52 ciclos alternados de 15 s a 95 °C de desnaturalización y 1 min a 60 °C para el apareamiento y elongación de los partidores. Como control negativo se utilizó una reacción sin templado. Los niveles de pri-miRNA se normalizaron a los niveles del gen *housekeeping* h18S y para el cálculo de los niveles de expresión relativa se utilizó el modelo calibrado por eficiencia [75].

Determinación de los niveles relativos de transcritos mediante RT-qPCR

Síntesis de cDNA

Para el estudio de los niveles de transcrito de los genes incluidos en este trabajo se utilizó cDNA sintetizado a partir de 1 µg de RNA total, el cual se mezcló con 1 µL de inhibidor de RNasa RNaseOUT (Invitrogen, Massachusetts, EEUU), 0,5 µL de partidores oligo (dT), 0,5 µL de partidores al azar (Promega, MDN, EEUU) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de reacción de 12 µL. Esta solución se calentó a 70 °C por 10 min. Consecutivamente, se agregaron 4 µL de tampón 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 3,75 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 µL de DTT 0,1 M y 1 µL de dNTPs 10 mM y la mezcla se calentó a 42 °C por 2 min. Se agregó 1 µL de la enzima Super Script II (200U, Invitrogen, Massachusetts, EEUU) y se incubó a 42 °C durante 60 min para finalizar con una incubación a 70 °C por 15 min.

Diseño de partidores específicos

Para las reacciones de PCR en tiempo real se diseñaron partidores para los genes MUC1, TLR4, IFN- α , IFN- β , ISGs (MX1, IFIT1, IFI44, IFI44L, IFITM1), FSCN1, enzimas metilantes (METTL3 y METTL14), enzimas desmetilantes (FTO y ALKBH5), ADAR1p110, ADAR1p150 y h18S (Tabla 3) (Integrated DNA Technologies, Fermelo SA). Se utilizaron las secuencias de los genes disponibles en bases de datos (GenBank, NCBI, NIH) y se diseñaron los partidores utilizando el programa AmplifX 2.1. (Instituto Jean Roche, Francia) considerando que estos fueran específicos, que no formaran estructuras secundarias ni dímeros de partidores. Todos los partidores diseñados abarcan todas las isoformas generadas por corte y empalme alternativo de los transcritos de interés (Tabla 3)

Tabla 3. Secuencias de partidores utilizados para PCR en tiempo real.

Gen	N° acceso GenBank	Secuencia
MUC1	NM_001204290.1 NM_001204294.1 NM_001044393.2 NM_001044390.2 NM_001044391.2 NM_001018017.2 NM_001204293.1 NM_002456.5 NM_001204285.1 NM_001204289.1 NM_001204291.1 NM_001204292.1 NM_001204296.1 NM_001044392.2 NM_001204295.1 NM_001204288.1 NM_001018016.2 NM_001204297.1 NM_001204287.1 NM_001204286.1	F: 5'-GCCACTTCTGCCAACTTGTA-3' R: 5'-TGAGCTTCCACACACTGAGA-3'
TLR4	NM_003266.4 NM_138554.5 NM_138557.3	F: 5'-TTATCCCGGTGTGGCCATT-3' R: 5'-AGCACGACTCGTCAGAACT-3'
IFN- α	NM_024013.3 NM_002172.3 NM_000605.4 NM_006900.4 NM_021068.3 NM_002171.2 NM_002169.3 NM_002173.3 NM_021002.2 NM_002170.4 NM_021057.2 NM_021268.2 NM_002175.2	F: 5'- AGAGGACCATGCTGACTGATCCATT -3' R: 5'- CACTGTGCAAAGGTGCACATGAC -3'
IFN- β	NM_002176.4	F: 5'-TCTAGCACTGGCTGGAATGAGACT-3' R: 5'-TGGCCTTCAGGTAATGCAGAATCC-3'
MX1	NM_001144925.2 NM_001178046.3 NM_001282920.1 NM_002462.5	F: 5'- ACATCCAGAGGCAGGAGACAATCA -3' R: 5'- CACGTCCACAACCTTGTCTTCAGT-3'

IFIT1	NM_001270927.2 NM_001270928.2 NM_001270929.2 NM_001270930.2 NM_001548.5	F: 5'-AAGAGCCTGCTTTTGGTTGCTG R: 5'- AGACGGTTGGTTTTGCCATTGC -3'
IFI44	NM_006417.5	F: 5'-AAGGGGTCATTGAGCTCAGGAAGA-3' R: 5'- TGATGCGTTACATGCCCTTGGA-3'
IFI44L	NM_001375646.1 NM_001375648.1 NM_001375647.1 NM_001375649.1 NM_001375650.1 NM_006820.4	F: 5'- AGCGTTACAGCCCTGCATTTGA -3' R: 5'- GACTGTTCCAAGGACAGAAGGCAA -3'
IFITM1	NM_003641.5	F: 5'- TTCGGCTCTGTGACAGTCTACCAT -3' R: 5'- ACACTGTAGACAGGTGTGTGGGTA -3'
FSCN1	NM_003088.4	F: 5'- CAATGGCAAGTTTGTGACCTCCAAG -3' R: 5'- CATCGTTGAACTCCAGCTGGAAGA -3'
METTL3	NM_019852.5	F: 5'-TTTCCGGTTAGCCTTCGGG-3' R: 5'-CTGCCTCTGGATTCCGTAGATC-3'
METTL14	NM_020961.4	F: 5'-TCTACTGAGGAAAGCTATGAGG-3' R: 5'-CTATTTAACACGGCACCAATG-3'
ALKBH5	NM_017758.4	F: 5'-GGGTGCACCAGCTGGTGATCCAAAA-3' R: 5'-ACCGGCAGGGAAAGCACTGGTTC-3'
FTO	NM_001080432.3 NM_001363891.1 NM_001363894.1 NM_001363896.1 NM_001363898.1 NM_001363899.1 NM_001363900.1 NM_001363901.1 NM_001363903.1 NM_001363905.1 NM_001363988.1 NM_001363897.1	F: 5'-CTTGAAGACACTTGGCTCCCT-3' R: 5'-ATACACTGCTGGCTTCTCGG-3'
ADAR1p110	NM_001365049.1 NM_001365048.1 NM_001365047.1 NM_001365046.1 NM_001193495.2 NM_001025107.3	F: 5'-GTGTCCCAGGAAGTGCAA-3' R: 5'-TGTCTGTGCTCATAGCCTTGAAA-3'
ADAR1p150	NM_015840.4 NM_015841.4 NM_001365045.1 NM_001111.5	F: 5'-CGGGCGCAATGAATCC-3' R: 5'-TGTGCTCATAGCCTTGAAATGG-3'
h18S	NM_022551.2	F: 5'-GATATGCTCATGTGGTGTG-3' R: 5'-AATCTTCTCAGTCGCTCCA-3'

PCR en Tiempo Real

Las reacciones de PCR en tiempo real para evaluar los niveles de transcritos se realizaron agregando: 4 µL del 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCRMix Plus, 0,4 µL de cada partidor (200 nM concentración final), 13,2 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de cDNA a dilución 1/20. Se utilizó un control negativo sin templado. Se empleó un protocolo con 15 min a 95 °C para activar la enzima y 40 ciclos consecutivos y alternados de desnaturalización a 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s para el apareamiento de los partidores y 72 °C por 15 s para la

elongación. Para evaluar la especificidad de los amplicones obtenidos se realizó una curva de disociación al final de la reacción de PCR. Para esto, se agregó un ciclo adicional en donde las muestras se desnaturalizaron durante 10 s a 95 °C, se hibridaron a 70 °C durante 1 s y durante 10 min se realizó un aumento gradual de la temperatura (0,02 °C/s) hasta alcanzar los 95 °C. Este gradiente de temperatura creciente permite evaluar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados y determinar la temperatura de *melting* (Tm) de los amplicones para comprobar su especificidad. Esta Tm debe corresponder a una curva con un único máximo, que es específico para cada producto génico. Adicionalmente, estos productos de Tm única fueron analizados a través de electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v en tampón TAE 1X (tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Las muestras se prepararon mezclando 5 µL del producto de PCR y 1 µL de colorante para carga de DNA en geles 6X (Thermo Fisher Scientific, OR, EEUU). Luego se realizó la separación electroforética a 110 V por 40 min, con tampón de corrida TAE 1X. Los geles se fotografiaron en un transiluminador UV (FBTIV-816 Fisher Scientific), empleando una cámara Nikon coolpix 4300 y se verificó la presencia de una banda única en el peso esperado señalado por el software AmplifX 2.1 durante el diseño de partidores. Los valores de Ct se obtuvieron con el programa AriaMx 1.71 (AgilentTechnologies, CA, EEUU). La razón de expresión relativa de un gen blanco se expresó en comparación a h18S usando el modelo calibrado por eficiencia [75].

Cálculo de puntaje de IFNs I

Para determinar la activación de la vía de IFNs I en GSL de pacientes con SS e individuos controles se calculó el puntaje de IFNs I, el cual corresponde a la suma de los niveles de expresión estandarizada de un set de ISGs [77, 78]. Para esto se utilizó el nivel de expresión relativa promedio y desviación estándar (DE) de cada ISG (MX1, IFI44L, IFI44, IFIT1, IFITM1) en el grupo control para estandarizar los niveles de expresión relativa de cada ISG en cada individuo (pacientes con SS y controles). Los niveles de expresión estandarizados para cada ISG se suman para cada individuo, generándose una puntuación de IFNs I por individuo. De esta forma el puntaje obtenido corresponde a la suma de los niveles expresión estandarizada de cada ISG para ese individuo. Este cálculo se resume en la siguiente fórmula, en dónde i = cada uno de los ISG, i_{ss} =niveles de expresión de cada ISG en cada paciente con SS y i_{ctr} = niveles de expresión de cada ISG en individuos controles:

$$\sum_{i=1}^5 = \frac{Gen i_{ss} - Promedio Gen i_{ctr}}{DE (Gen i_{ctr})}$$

Determinación de los niveles relativos de proteína mediante Western Blot

Extracción de proteínas

Se extrajeron proteínas a partir de GSL de pacientes con SS, individuos controles y de células HSG. Las GSL de un peso húmedo de aproximadamente 10 mg se pulverizaron usando N₂ líquido con la ayuda de un pistilo y mortero de porcelana. La muestra se homogeneizó con 350-500 µL de tampón de extracción de proteínas que contiene RIPA (Tris-HCl 50 mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, EDTA 5 mM, Deoxicolato de sodio 1%, pH 7,4), cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™ Mini Roche), fosfatasas (Phostop, Roche) y fluoruro de sodio 100 nM. Luego se continuó la disgregación en un homogeneizador vidrio-vidrio. La suspensión obtenida se succionó 5 veces con una jeringa de tuberculina de 1 mL y se sometió a 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento de 5 min cada uno. Para la extracción de proteínas de células HSG, las células se lavaron con PBS 1X y luego se les agregó tampón de lisis de proteínas y se soltaron las células con la ayuda de un *cell scraper*. Finalmente, tanto los lisados obtenidos a partir de GSL como de células HSG se centrifugaron a 12.000 rpm (Centrifuge Universal 32R, radio 13,7 cm, Marca Hettich, EEUU) por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para cuantificar las proteínas utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA). Para esto, se realizaron diluciones del extracto de proteínas que se incubaron con el reactivo de BCA en dilución 1/8, durante 30 min a 37 °C. Luego, se midió la absorbancia de la muestra a 562 nm en un lector de microplacas (ELX800, BioTek, Winooski, VT, EEUU). La curva de calibración de concentraciones conocidas de proteínas se realizó utilizando albúmina de suero bovino (BSA) 1000 µg/mL. Las concentraciones de las muestras extraídas se determinaron utilizando la ecuación de la recta que se obtuvo en la curva de calibración de BSA.

Electroforesis SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas extraídas desde las muestras de interés se separaron de acuerdo con sus pesos moleculares mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE). 20 µg de proteína en el caso de GSL, y 10 µg de proteína en el caso de células HSG se diluyeron en relación 1:1 con tampón de carga 2X (Tris-HCl 125 mM, SDS 4,6% p/v, glycerol 20% v/v, azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 5% v/v, pH 6,8) y calentaron a 95 °C durante 10 min. La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida al 8% en tampón de corrida (Glicina 192 mM, Tris Base 25 mM, SDS 0,1% p/v) a una corriente continua de 12 mA hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador, y luego, la separación de las proteínas se realizó aplicando voltaje constante de 100 V. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45 µm), usando tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM, Glicina 154 mM, metanol 20% v/v) y corriente continua de 100 V durante 110 min a 4 °C. Para evaluar la calidad de la

transferencia, las membranas se lavaron con agua destilada y se tiñeron con rojo Ponceau al 5% durante 10 min a temperatura ambiente y agitación lenta. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en tampón TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% v/v, pH 7,4) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación lenta. Posteriormente, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T 1X y en las condiciones detalladas en la [Tabla 4](#). Luego, las membranas se lavaron con TBS-T 1X y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente, las membranas se lavaron con TBS-T1X y revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, (Pierce, Thermo Scientific, MA, EEUU) utilizando el sistema de captura digital C-DiGit blot scanner (LI-COR Inc, NE, EEUU). La intensidad de las bandas se determinó por densitometría utilizando el software Image Studio Digits (LI-COR Inc, Lincoln, NE, EEUU). Los niveles de proteínas se normalizaron en relación con los niveles de β -actina.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western Blot e inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios	Origen	Inmunógeno	Empresa	Incubación Dilución, tiempo, t°
Anti-MUC1 (M8), monoclonal, IgG1	Ratón	Epítotope DTR del dominio glicosilado de MUC1	Dr. Dallas Swallow	WB GSL: 1:10, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:500, 20 h, 4 °C IF GSL: directo, 22 h, 4 °C
Anti-TLR4, policlonal, IgG	Conejo	Péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 653-839 de TLR4 humana	Proteintech	WB GSL: 1:500, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:1000, 20 h, 4 °C IF GSL: 1:100, 22 h, 4 °C
Anti-METTL3 (D2I6O), monoclonal, IgG	Conejo	Péptido sintético correspondiente a los residuos que rodean al aminoácido Leu297 de la proteína METTL3 humana	Cell Signaling	WB GSL: 1:1000, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:1000, 20 h, 4 °C IF GSL: 1:150, 22 h, 4 °C
Anti-METTL14 (D8K8W), monoclonal, IgG	Conejo	Péptido sintético correspondiente a los residuos que rodean al aminoácido Pro130 de la proteína METTL14 humana	Cell Signaling	WB GSL: 1:1000, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:1000, 20 h, 4 °C IF GSL: 1:150, 22 h, 4 °C
Anti-ALKBH5 (E5Y7C), monoclonal, IgG	Conejo	Péptido sintético correspondiente a los residuos que rodean al aminoácido Gly142 de la proteína ALKBH5 humana	Cell Signaling	WB GSL: 1:1000, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:1000, 20 h, 4 °C IF GSL: 1:200, 22 h, 4 °C
Anti-FTO (D6Z8W), monoclonal, IgG	Conejo	Péptido sintético correspondiente a los residuos que rodean al aminoácido Leu464 de la proteína FTO humana	Cell Signaling	WB GSL: 1:1000, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:5000, 20 h, 4 °C IF GSL: 1:200, 22 h, 4 °C
Anti-hnRNP A2B1 (2 ^º), monoclonal, IgG1	Ratón	Proteína hnRNP B1 humana	Cell Signaling	WB GSL: 1:1000, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:1000, 20 h, 4 °C
Anti-ADAR1 (15.8.6), monoclonal, IgG1	Ratón	Residuos 440-826 de ADAR1 de origen humano	Santa Cruz	WB GSL: 1:1000, 20 h, 4 °C WB células HSG: 1:1000, 20 h, 4 °C IF GSL: 1:300, 22 h, 4 °C

Anti- β -actina (BA3R), monoclonal	Ratón	Péptido N-terminal β -actina	Invitrogen	WB GSLs: 1:10000, 2 h, TA WB Células HSG: 1:10000, 2 h, TA
Anticuerpos Secundarios	Origen	Empresa	Incubación	Dilución, tiempo, t°
Anti-IgG (H+L) conejo conjugado a HRP	Cabra	Thermo Scientific	WB GSL: 1:10000, 1 h, TA WB Células HSG: 1:10000, 1 h, TA	
Anti-IgG (H+L) ratón conjugado a HRP	Cabra	Thermo Scientific	WB GSL: 1:10000, 1 h, TA WB Células HSG: 1:10000, 1 h, TA	
Anti-IgG (H+L) conejo Alexa Fluor 488™	Cabra	Thermo Scientific		IF GSL: 1:200, 1 h, TA
Anti-IgG (H+L) ratón Alexa Fluor 488™	Cabra	Thermo Scientific		IF GSL: 1:200, 1 h, TA

TA: 34temperature ambiente; WB: Western blot; IF: Inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia

Para la detección de la localización de MUC1, TLR4, METTL3, METTL14, FTO, ALKBH5 y ADAR1 se realizaron inmunofluorescencias (IF) en cortes de 4 μ m de GSL fijadas con paraformaldehído al 1 % p/v durante 6 h e incluidas en parafina. Los cortes fueron desparafinados, rehidratados y posteriormente se realizó una recuperación de la reactividad antigénica en tampón citrato 0,01 M, pH 6, en vaporera a 92 °C durante 25 min. Luego se realizó el bloqueo de las interacciones inespecíficas con caseína 0,25 % p/v durante 1 hora y se incubó con los anticuerpos primarios en las diluciones que se señalan en la [Tabla 4](#) durante 22 h a 4 °C. Los cortes fueron lavados con PBS y posteriormente incubados con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos AlexaFluor 488 (Invitrogen), en dilución 1:200 durante 1 h a temperatura ambiente y con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, OR, EEUU) diluído 1:1000 para la tinción nuclear. El montaje de los preparados se realizó con Mowiol 4-88 (Calbiochem) al 10 % p/v preparado en glicerol al 25 % en Tris 0,1 M pH 8,5. Las preparaciones fueron analizadas y fotografiadas en un microscopio confocal C2 (Nikon, Tokyo, Japan).

Obtención de microfotografías

Para obtener las fotografías de las IF se utilizó el microscopio confocal C2 (Nikon, Tokyo, Japan) se obtuvieron imágenes representativas con objetivos 20X, 40X y 40X más aumento digital de 3X de cada GSL de 4 pacientes con SS y 3 individuos controles. Para cada proteína analizada se mantuvieron las condiciones de luminosidad (potencia del láser y sensibilidad del detector) y apertura del *pinhole*.

Análisis estadístico

Para el cálculo del tamaño muestral se planteó una hipótesis estadística de diferencia de medias unilateral. Con esta hipótesis se comparó la media entre los grupos en estudio. Es unilateral debido a que se considera la posibilidad de observar diferencias entre las variables en un sólo sentido. Dicho cálculo se realizó utilizando el programa OriginPro 8 SRO (Northampton, MA, EEUU), considerando una potencia de 80% y un error alfa=0,05. Considerando estas variables el tamaño muestral obtenido fue igual a 6 (6 pacientes con SS y 6 controles).

Los análisis comparativos entre valores medios en pacientes con SS e individuos controles o entre las condiciones experimentales y control se compararon utilizando la prueba U de Mann-Whitney o test-t, dependiendo si los datos presentaban distribución normal. Los análisis de correlación se realizaron utilizando la prueba de correlación de Spearman entre los niveles de miRNAs, de transcritos y proteínas de las moléculas analizadas en esta tesis y los parámetros clínicos. En ambos casos, se consideró el tipo de variable y la normalidad de los datos antes de aplicar la prueba estadística. Este análisis se realizó utilizando el programa GraphPadPrism, versión 6.0. Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Evaluar el rol del hsa-miR-145-5p en la regulación de los niveles de MUC1 y TLR4 en GS de pacientes con SS y células HSG.

Para determinar los niveles de expresión de hsa-miR-145-5p se realizaron ensayos TaqMan™ para la detección específica de miRNAs maduros en extractos de RNA total de GSL de 9 pacientes con SS y 6 individuos controles. Estos ensayos involucran la retro-transcripción (RT) específica del hsa-miR-145-5p a través de partidores de RT de tipo *stem-loop* y la posterior amplificación y detección específica del miRNA a través de sondas de hidrólisis de secuencia complementaria al hsa-miR-145-5p maduro. Los resultados evidenciaron una disminución significativa de los niveles de hsa-miR-145-5p en las GSL de pacientes con SS ($p=0,0004$) (**Figura 3A**).

A través de la herramienta integrativa de predicción de blancos de miRNAs mirDIP 4.1 [79], que utiliza la información proveniente de 30 bases de datos distintas, se encontró que MUC1 y TLR4 son blancos predichos del hsa-miR-145-5p. Esta plataforma asigna a cada interacción miRNA-blanco predicha un puntaje integrado deducido estadísticamente de la información obtenida de las distintas fuentes independientes, proporcionando de esta forma una medida unificada de confianza que además permite clasificar la interacción predicha en categorías de baja, mediana, alta o muy alta confianza [79]. A través de esta metodología, MUC1 es un blanco potencial del hsa-miR-145-5p de mediana confianza predicho en 9 algoritmos bioinformáticos independientes. TLR4 es un blanco potencial del hsa-miR-145-5p de alta confianza y es predicho por 10 algoritmos bioinformáticos.

Para determinar si los niveles de estos blancos predichos *in silico* se asocian a los niveles del hsa-miR-145-5p en GSL de pacientes con SS, se midieron los niveles de transcrito y proteína de MUC1 y TLR4 a través de RT-qPCR y Western Blot, respectivamente. Los resultados evidenciaron un aumento significativo en los niveles de transcrito de MUC1 ($p=0,0440$) y TLR4 ($p=0,0014$) (**Figura 3B**) en GSL de 9 pacientes con SS en relación con los 6 individuos controles. En la población completa de individuos, tanto los niveles de transcrito de MUC1 ($R=-0,4964$; $p=0,0299$) como de TLR4 ($R=-0,8179$; $p=0,0002$) (**Figura 3C-D**) correlacionaron de manera inversa y significativa con los niveles de hsa-miR-145-5p.

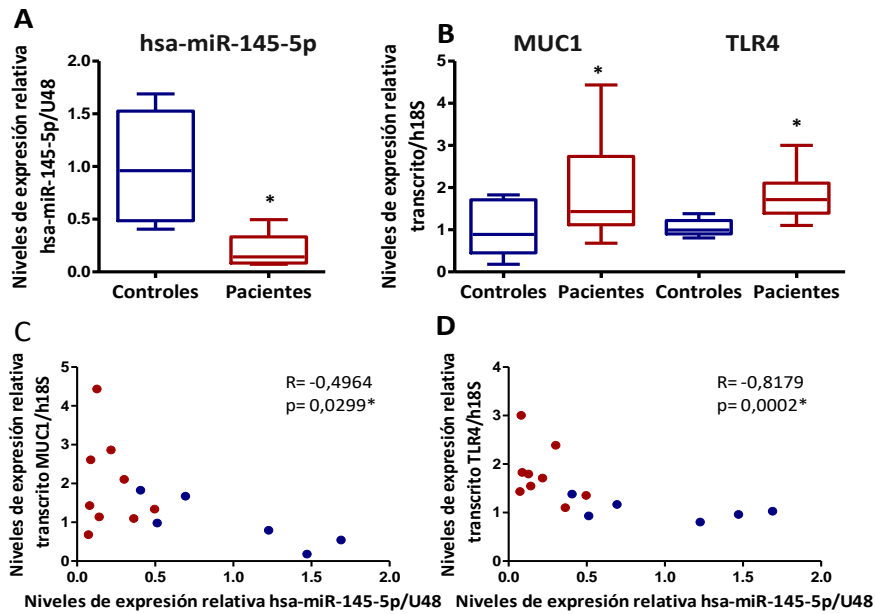


Figura 3. Niveles de hsa-miR-145-5p y niveles de transcrito de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (A) Niveles relativos de hsa-miR-145-5p en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (B) Niveles relativos de transcrito de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles relativos de transcrito de MUC1 (C) y TLR4 (D). Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Al medir en estos mismos individuos los niveles de proteína de MUC1 ($p = 0,2829$) y TLR4 ($p = 0,4686$) (Figura 4A-C), no se encontraron cambios estadísticamente significativos.

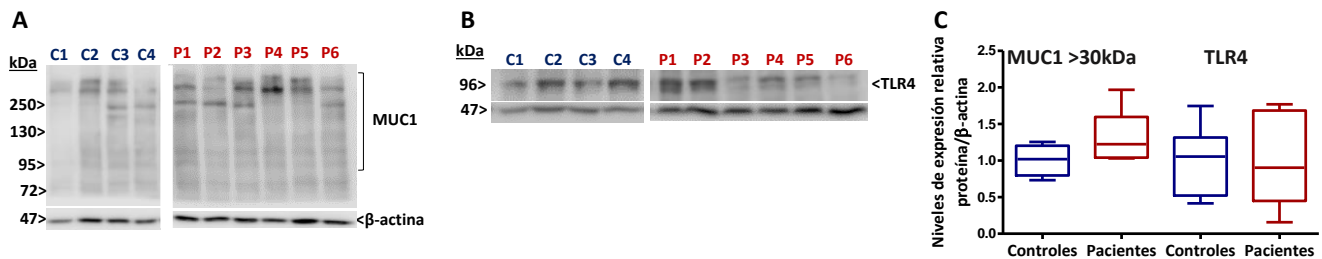


Figura 4. Niveles de proteína de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de Western Blots de MUC1 (A) y TLR4 (B) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de MUC1 (incluyendo todas las bandas sobre 130 kDa) y TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Datos representativos de 4 mediciones independientes. $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con SS e individuos controles para los niveles proteicos de MUC1, la detección a través de inmunofluorescencia de esta mucina reveló diferencias tanto en la distribución como en la intensidad de la señal. Como se observa en la Figura 5, solo los acinos serosos presentan señal inmunofluorescente, la cual se distribuye en la región apical en acinos de individuos controles (Figura 5A), y en la región basolateral en acinos de pacientes con SS (Figura 5B)

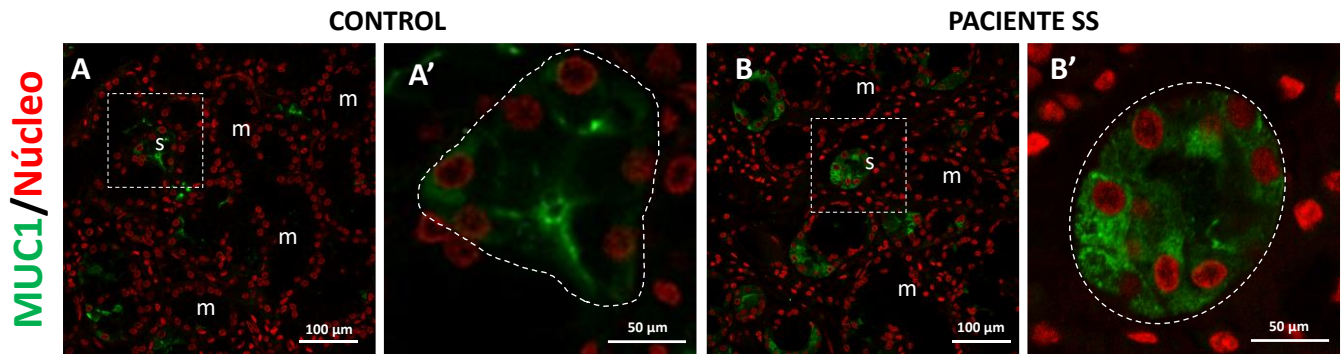


Figura 5. Localización de MUC1 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de la detección por inmunofluorescencia de MUC1 en GSL de individuos controles (A) y pacientes con SS (B). A' y B' imágenes de aumento mayor de los acinos delimitados por un cuadrado de líneas entrecortadas en A y B. Los límites de acinos están delimitados con líneas entrecortadas en A' y B'. s: acino de tipo seroso, m: acino de tipo mucoso.

De manera similar, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en los niveles proteicos de TLR4 entre pacientes con SS e individuos controles, sí se observó una mayor intensidad de inmunofluorescencia en GSL de pacientes con SS. En individuos controles, TLR4 se distribuyó principalmente de manera basal en las células acinares (**Figura 6A**), mientras que en pacientes con SS esta marca se observó en la región basolateral y con mayor intensidad (**Figura 6B-C**). Estos resultados en conjunto sugieren una posible asociación entre los niveles del hsa-miR-145-5p y los niveles de transcrito de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS.

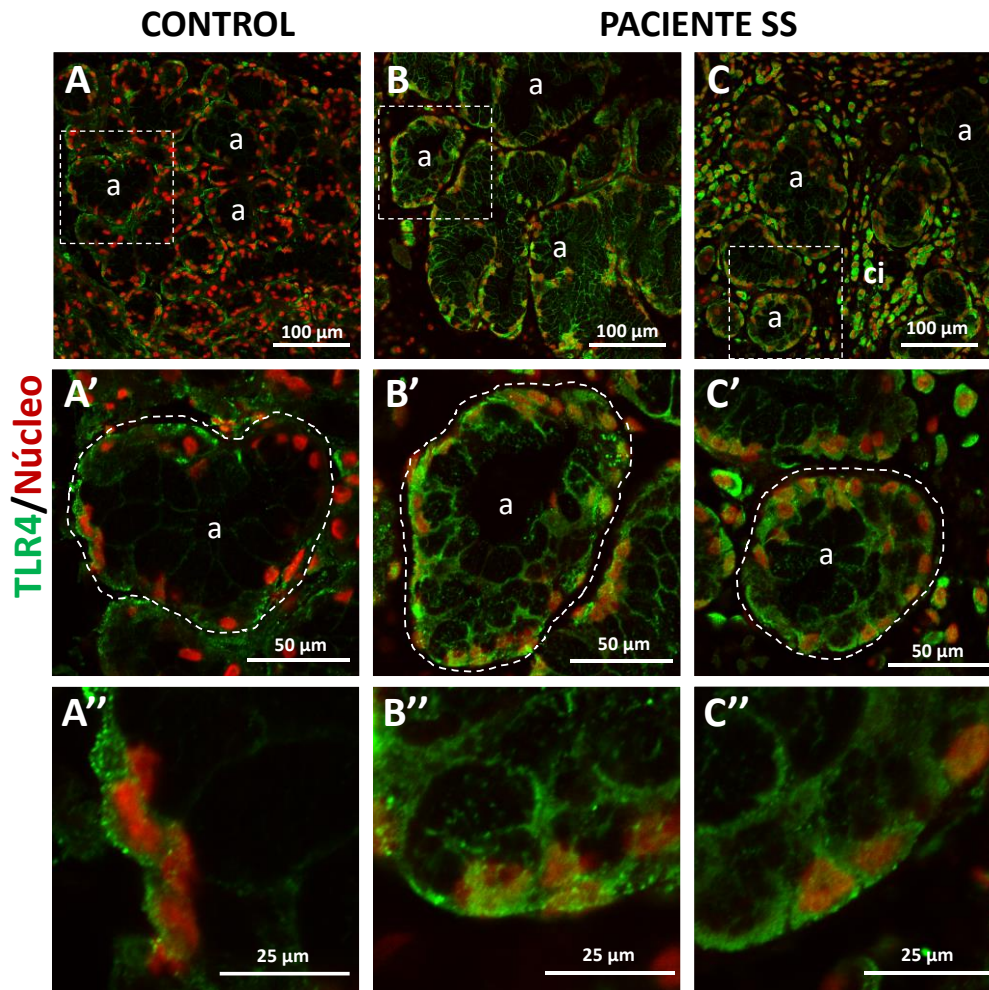


Figura 6. Localización de TLR4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de la detección por inmunofluorescencia de TLR4 en GSL de individuos controles (A) y pacientes con SS (B-C). A'-C' imágenes de aumento mayor de los acinos delimitados por un cuadrado de líneas entrecortadas en A-C. Los límites de acinos están delimitados con líneas entrecortadas en A'-C'. a: acino, ci: células inflamatorias.

Para determinar si el hsa-miR-145-5p regula los niveles de transcrito y proteína de MUC1 y TLR4, se realizaron ensayos funcionales transfectando células HSG con un imitador sintético del hsa-miR-145-5p (*mimic*) o su inhibidor (*inhibitor*). A través de estos ensayos se pueden modificar los niveles del miRNA para luego evaluar el efecto en los niveles de transcrito y proteína de sus blancos predichos. Se transfectaron las células HSG utilizando distintas concentraciones de *mimic* e *inhibitor* (3, 30 y 100 nM) y se probaron también distintos tiempos de transfección (3, 6, 9, 18 y 24 h). Posterior a las transfecciones, se evaluaron los niveles de hsa-miR-145-5p a través de ensayos Taqman para corroborar el aumento o la disminución del miRNA. Las células HSG transfectadas con 100 nM del *mimic* por 24 h mostraron un aumento significativo de los niveles de hsa-miR-145-5p ($p=0,0143$) y que corresponden al miRNA transfectado (**Figura 7A**). Mientras que, la transfección con

100 nM del *inhibitor* por 24 h provocó una disminución significativa de los niveles de hsa-miR-145-p ($p=0,0143$) (**Figura 7B**) en relación con la condición control (solo reactivo de transfección HiPerFect).

Con el propósito de evaluar la especificidad de estos ensayos funcionales, se realizaron transfecciones utilizando controles negativos universales, comercialmente disponibles y cuyas secuencias están diseñadas para no dirigirse a ningún gen humano. Células HSG fueron transfectadas por 24 h con 100 nM de *mimic(-)* o *inhibitor(-)* y posteriormente se evaluaron los niveles de hsa-miR-145-5p a través de ensayo TaqMan. Tal como se observa en la **Figura 7C**, no se observaron cambios significativos en los niveles de hsa-miR-145-5p al transfectar con *mimic(-)* ($p=0,2424$) ni *inhibitor(-)* ($p=0,4091$). Estos resultados demuestran la especificidad de estos experimentos para producir la variación en los niveles de hsa-miR-145-5p.

Para comprobar la efectividad de las transfecciones con *mimic* e *inhibitor*, se midieron a través de RT-qPCR los niveles de transcrito de un gen blanco del hsa-miR-145-5p, FSCN1 (del inglés *Fascin Actin-Bundling Protein 1*). FSCN1 fue seleccionado ya que ocupa el primer lugar en el ranking de blancos experimentalmente validados del hsa-miR-145-5p según base de datos TarBase v8 [80], cuyo ranking se basa en la robustez de los experimentos que respaldan la interacción, priorizando los ensayos de interacción con genes reporteros [80]. La transfección de células HSG con 100 nM de *mimic* por 24 h disminuyó significativamente los niveles de transcrito de FSCN1 ($p=0,0001$) (**Figura 7D**), mientras que el efecto contrario se observó al transfectar 100 nM de *inhibitor* en iguales condiciones ($p=0,0004$) (**Figura 7D**). Estos resultados permitieron comprobar la efectividad del ensayo funcional.

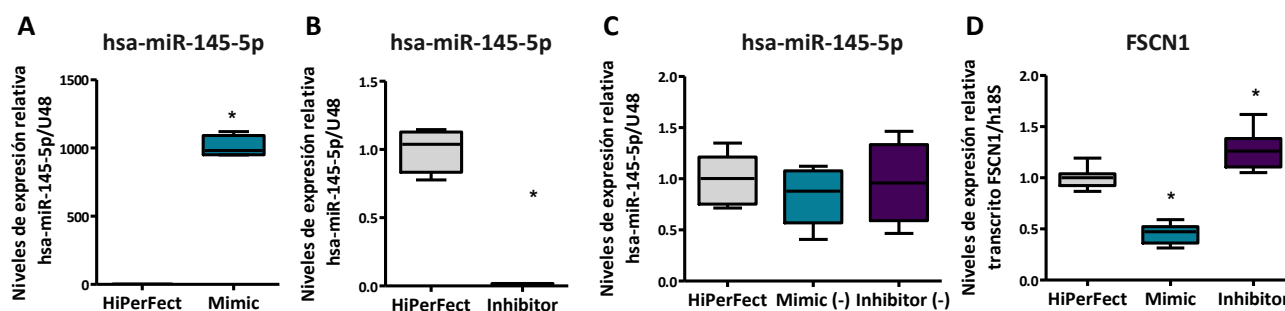


Figura 7. Niveles de hsa-miR-145-5p y del transcrito de FSCN1 en células HSG transfectadas con *mimic* o *inhibitor* del hsa-miR-145-5p. Niveles relativos de hsa-miR-145-5p en células HSG transfectadas por 24 h con 100 nM de *mimic* (A) o *inhibitor* (B). (C) Niveles relativos de hsa-miR-145-5p en células HSG transfectadas por 24 h con 100 nM de control negativo *mimic(-)* o control negativo *inhibitor(-)*. (D) Niveles relativos de transcrito de FSCN1 en células HSG transfectadas por 24 h con 100 nM de *mimic* o *inhibitor*. Condición control solo tratada con reactivo de transfección (HiPerfect). Datos representativos de 3 mediciones independientes de 4 experimentos independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Los siguientes resultados en los que se detectaron los niveles de los blancos del hsa-miR-145-5p fueron realizados en las concentraciones que presentaron los cambios más significativos al analizar la curva de concentración y tiempo mencionada en la sección materiales y métodos y resultados. Estos corresponden a transfección con 100 nM de *mimic* e *inhibitor* para la evaluación de los niveles de transcrito y 30 nM de *mimic* e *inhibitor* para la determinación de los niveles proteicos. De manera similar a lo ocurrido con FSCN1, aunque en menor proporción, la transfección de 100 nM de *mimic* por 24 h disminuyó de manera significativa los niveles de transcrito de MUC1 ($p=0,0004$) (**Figura 8A**). Por el contrario, la transfección de las mismas concentraciones de *inhibitor* por 24 h generó un aumento significativo de los niveles de transcrito de MUC1 ($p=0,0003$) (**Figura 8A**). Al evaluar el efecto del hsa-miR-145-5p en los niveles de proteína de MUC1 a través de Western Blot, se encontró que la transfección de células HSG con 30 nM de *mimic* por 24 h provocó una disminución significativa de los niveles de proteína de MUC1 ($p=0,0079$) (**Figura 8B-C**), y el efecto contrario se observó al transfectar el *inhibitor* en las mismas condiciones ($p=0,0286$) (**Figura 8B-C**). Estos resultados sugieren que los niveles de transcrito y proteína de MUC1 podrían estar regulados por los niveles de hsa-miR-145-5p.

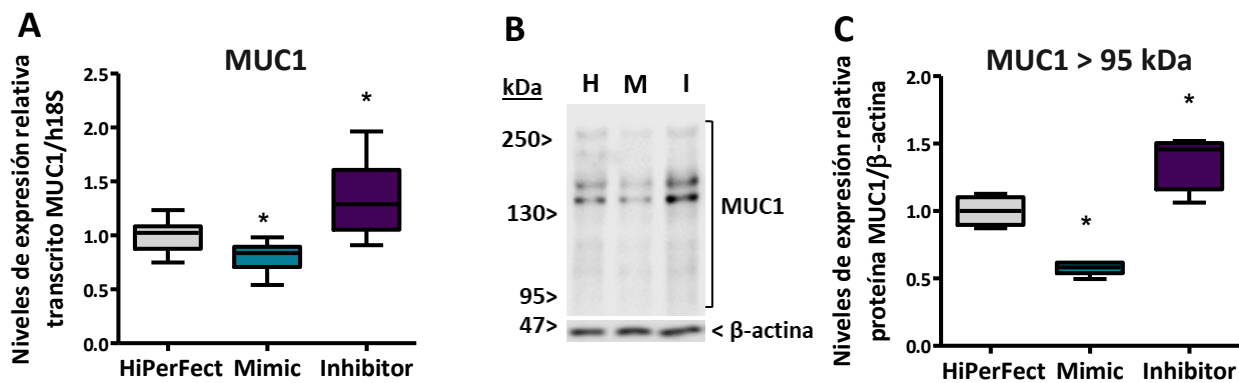


Figura 8. Niveles de transcrito y proteína de MUC1 en células HSG transfectadas con *mimic* o *inhibitor* del hsa-miR-145-5p. (A) Niveles relativos de transcrito de MUC1 en células HSG transfectadas por 24 h con 100 nM de *mimic* o *inhibitor*. (B) Imagen representativa de Western Blot de MUC1 en células HSG transfectadas por 24 h con 30 nM de *mimic* o *inhibitor*. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de MUC1 (incluyendo todas las bandas sobre 95 kDa) (C) en células HSG transfectadas por 24 h con 30 nM de *mimic* o *inhibitor*. Condición control solo tratada con reactivo de transfección (HiPerfect). Datos representativos de 3 mediciones independientes de 4 experimentos independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. H: HiPerfect, M: mimic, I: Inhibitor.

Paralelamente, a través de RT-qPCR se encontró una disminución significativa de los niveles de transcrito de TLR4 ($p=0,0011$) (**Figura 9A**) al transfectar células HSG con 100 nM de *mimic* por 24 h y el efecto contrario se observó al transfectar el *inhibitor* en las mismas condiciones ($p=0,0074$) (**Figura 9A**). De manera similar, a través de Western Blot se encontraron niveles disminuidos de proteína de TLR4 al transfectar 30 nM de *mimic* por 24 h ($p=0,0045$) (**Figura 9B-C**), y el efecto opuesto se observó al transfectar el *inhibitor* en las

mismas condiciones ($p=0,0002$) (**Figura 9B-C**). Estos resultados sugieren que los niveles de transcrito y proteína de TLR4 podrían estar regulados por los niveles del hsa-miR-145-5p.

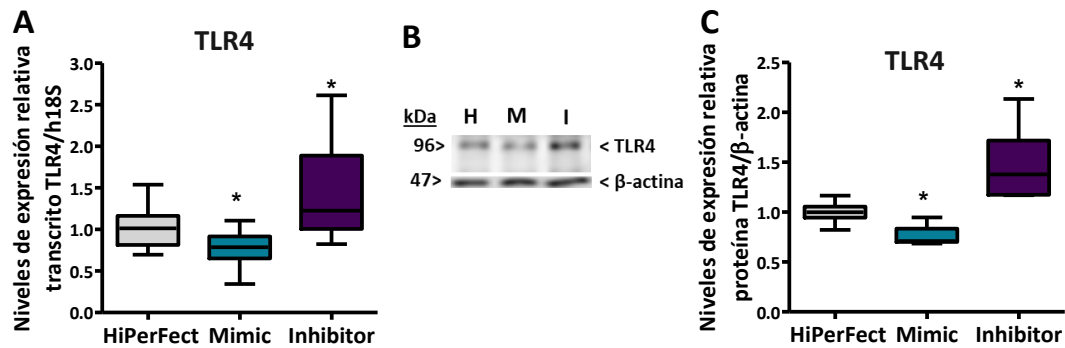


Figura 9. Niveles de transcrito y proteína de TLR4 en células HSG transfectadas con *mimic* o *inhibitor* del hsa-miR-145-5p. (A) Niveles relativos de transcrito de TLR4 en células HSG transfectadas por 24 h con 100 nM de *mimic* o *inhibitor*. **(B)** Imágenes representativas de Western Blots de TLR4 en células HSG transfectadas por 24 h con 30 nM de *mimic* o *inhibitor*. **(C)** Cuantificación de los niveles proteicos de TLR4 en células HSG transfectadas por 24 h con 30 nM de *mimic* o *inhibitor*. Condición control solo tratada con reactivo de transfección (HiPerFect). Datos representativos de 3 mediciones independientes de 4 experimentos independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. H: HiPerFect, M: *mimic*, I: *Inhibitor*.

En conjunto, los resultados obtenidos tanto en GSL de pacientes con SS como a través de ensayos funcionales sugieren un rol del hsa-miR-145-5p en la regulación de los niveles de MUC1 y TLR4. Estos resultados fueron publicados en Jara y colaboradores, *Frontiers in Immunology* 12:685837 [81].

Objetivo específico 2: Evaluar el rol de IFNs I en los niveles del hsa-miR-145-5p y pri-miR-145 en GS de pacientes con SS y células HSG.

Para explorar los mecanismos que podrían llevar a la disminución del hsa-miR-145-5p, se determinaron a través de RT-qPCR los niveles de transcrito de IFN- α e IFN- β en GSL de 9 pacientes con SS y 6 individuos controles y se evaluó su posible asociación con los niveles del hsa-miR-145-5p. Si bien no se encontraron diferencias significativas en los niveles de transcrito de IFN- α entre ambos grupos ($p=0,2454$) (**Figura 10A**), se observó un aumento significativo de los niveles de transcrito de IFN- β en GSL de pacientes con SS ($p=0,0014$) (**Figura 10A**). Además, los niveles del hsa-miR-145-5p no correlacionaron de manera significativa con los niveles de IFN- α ($R=-0,3451$; $p=0,1135$) (**Figura 10B**), pero si se observó una correlación inversa y significativa entre los niveles de IFN- β y los niveles del hsa-miR-145-5p ($R=-0,5000$; $p=0,03000$) (**Figura 10C**), lo que sugiere una posible asociación entre que niveles elevados de esta citoquina pro-inflamatoria y los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p.

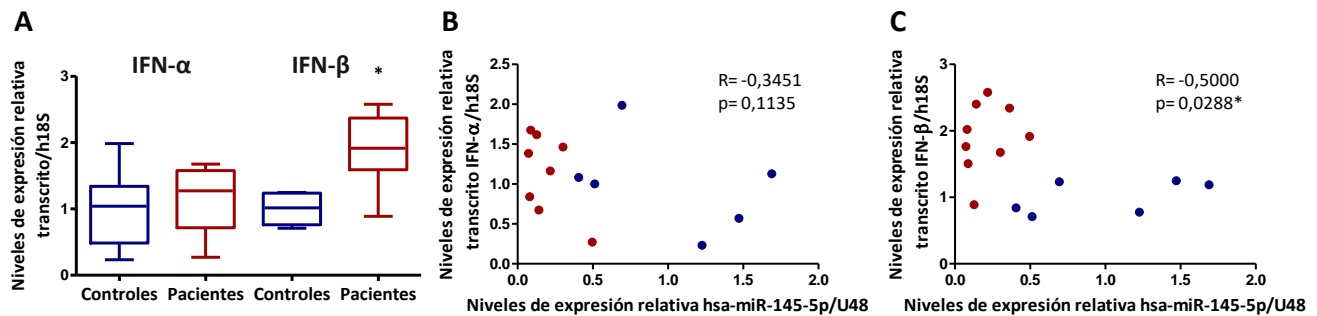


Figura 10. Niveles de transcrito de IFN- α e IFN- β en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (A) Niveles relativos de transcrito de IFN- α e IFN- β en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles relativos de transcrito de IFN- α (B) e IFN- β (C). Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

A continuación, se evaluó si las GSL de estos mismos pacientes con SS presentan una sobreactivación de la vía de IFNs I como consecuencia del aumento observado en los niveles de IFN- β . Para esto, se determinó la presencia de la “*IFN signature*” a través de la medición por RT-qPCR de los niveles de transcrito de 5 ISGs que habitualmente están sobreexpresados en tejidos en donde hay sobreactivación de esta vía: IFI44L, IFI44, MX1, IFIT1 e IFITM1. Mediante la suma de los niveles de expresión estandarizados de cada ISG para cada individuo, se puede calcular el denominado “puntaje de IFNs I” [41]. Puntajes de IFNs I que se encuentran dos o tres desviaciones estándar sobre la media del grupo control son indicativos de la presencia de la *IFN signature* y por ende de una activación de la vía de IFNs I [41]. Como se puede observar en la **Figura 11A**, las GSL de pacientes con SS presentan niveles elevados de los transcritos: MX1 ($p=0,0002$), IFIT1 ($p=0,0024$), IFITM1 ($p=0,0005$), IFI44 ($p=0,0002$) e IFI44L ($p=0,0002$). Además, presentaron un puntaje de IFNs I significativamente mayor ($p=0,0002$) (**Figura 11B**) con un promedio de 40,2, y un rango de 19,9 a 80,4 mientras que en individuos

controles el puntaje promedio fue de -0,3, con un rango de -4,8 a 4,1. Por lo tanto, los individuos de esta cohorte de pacientes con SS se consideran positivos para la *IFN signature*. Además, los puntajes de IFNs I correlacionaron de manera inversa y significativa con los niveles de hsa-miR-145-5p ($R=-0,7714$; $p=0,0004$) (Figura 11C), sugiriendo una asociación entre la activación de esta vía y los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p.

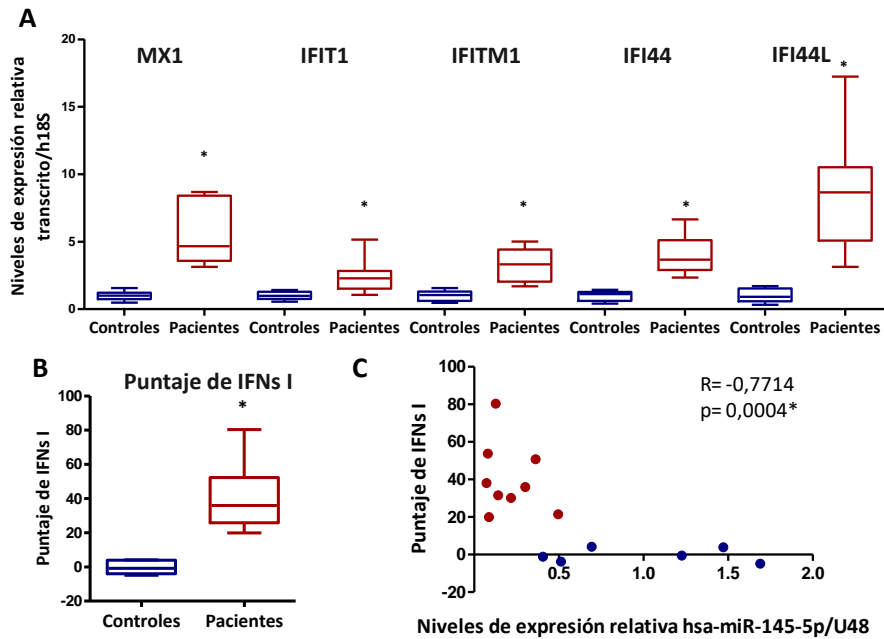


Figura 11. Niveles de transcrito de ISGs y puntaje de IFNs I en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (A) Niveles relativos de transcrito de Mx1, IFIT1, IFITM1, IFI44 e IFI44L en GSL de pacientes con SS e individuos controles. **(B)** Puntaje de IFNs I calculado a través de la suma de los niveles de expresión estandarizados de Mx1, IFIT1, IFITM1, IFI44 e IFI44L para cada individuo. **(C)** Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de hsa-miR-145-5p y el puntaje de IFNs I. Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.3

Considerando la asociación observada entre la activación de la vía de IFNs I y la disminución del hsa-miR-145-5p, se realizó un análisis de correlación de Spearman para evaluar posibles asociaciones con parámetros clínicos de la enfermedad, como serología positiva de los autoanticuerpos anti-Ro/SSA y anti-La/SSB, y el grado de infiltración linfocítica en las GSL, representada como *score* de foco. Como se observa en la Tabla 5, se observó una correlación positiva y significativa entre la sobreactivación de la vía de IFNs I expresada a través los puntajes aumentados de IFNs I y la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA ($R=0,850$; $p < 0,0001$) y anti-La/SSB ($R=0,589$; $p < 0,021$) y el *score* de foco ($R=0,750$; $p < 0,001$). Interesantemente, también se encontró una correlación inversa fuerte y significativa entre la disminución del hsa-miR-145-5p y la presencia de autoanticuerpos anti-Ro/SSA ($R=-0,819$; $p < 0,001$) y anti-La/SSB ($R=-0,589$; $p=0,021$), así como con el *score* de foco ($R=-0,807$; $p < 0,001$). Estos resultados, en conjunto con la correlación inversa entres los puntajes de

IFNs I y los niveles de hsa-miR-145-5p, sugieren una asociación entre los parámetros clínicos de autoinmunidad e inflamación y la activación de la vía de IFNs I, con la disminución de los niveles del hsa-miR-145-5p.

Tabla 5. Correlaciones entre niveles de hsa-miR-145-5p, activación de la vía de IFNs I y parámetros clínicos

Parámetro	R	p
Ro - hsa-miR-145	-0.819	<0.001
Ro - mRNA IFI44	0.850	<0.001
Ro - mRNA IFI44L	0.850	<0.001
Ro - mRNA MX1	0.850	<0.001
Ro - mRNA IFIT1	0.724	0.002
Ro - Puntaje IFN tipo I	0.850	<0.001
La - hsa-miR-145	-0.589	0.021
La - mRNA IFI44	0.655	0.008
La - mRNA IFI44L	0.589	0.021
La - mRNA IFIT1	0.556	0.031
La - Puntaje IFNs I	0.589	0.021
Score de foco - hsa-miR-145	-0.807	<0.001
Score de foco - mRNA IFI44	0.849	<0.001
Score de foco - mRNA IFI44L	0.737	0.002
Score de foco - mRNA MX1	0.642	0.010
Score de foco - mRNA IFIT1	0.724	0.002
Score de foco - Puntaje de IFNs I	0.752	0.001

Para determinar si la disminución del hsa-miR-145-5p encontrada en GSL de pacientes con SS se debe al efecto específico de la sobreactivación de la vía IFNs I, se estimularon células HSG con 1 o 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. En primer lugar, se evaluó la activación de la vía de IFNs I en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β , para lo cual se midieron a través de RT-qPCR los niveles de transcrito de los 5 ISGs que se encontraron sobreexpresados en GSL de pacientes con SS ([Figura 11A](#)). Como se observa en la [Figura 12A-E](#), la estimulación con IFN- α aumentó significativamente los niveles de transcrito de MX1 ($p < 0,0001$), IFIT1 ($p < 0,0001$), IFITM1 ($p < 0,0001$), IFI44 ($p < 0,0001$) e IFI44L ($p < 0,0001$). De manera similar, la estimulación con IFN- β aumentó los niveles de transcrito de MX1 ($p < 0,0001$), IFIT1 ($p < 0,0001$), IFITM1 ($p < 0,0001$), IFI44 ($p < 0,0001$) e IFI44L ($p < 0,0001$) ([Figura 12A-E](#)). Estos resultados demuestran que la sobreactivación de la vía de IFNs I observada en GSL de pacientes con SS se puede replicar en nuestro modelo *in vitro*.

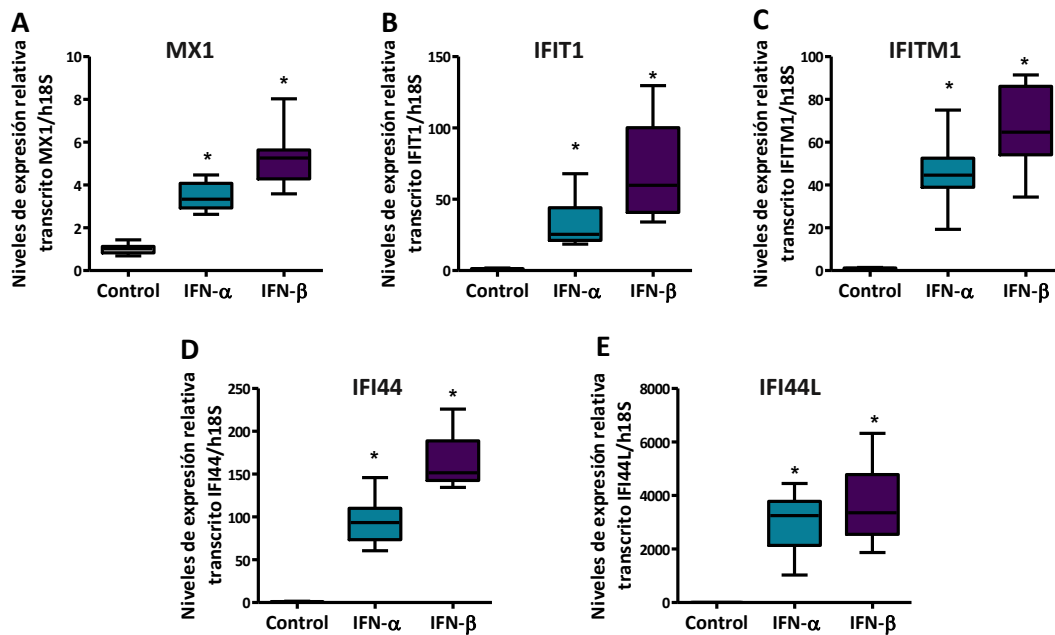


Figura 12. Niveles de transcritos de ISGs en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β . Niveles relativos de transcritos de Mx1 (A), IFIT1 (B), IFITM1 (C), IFI44(D) e IFI44L(E), en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes de 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

Una vez confirmada la activación de la vía de IFNs I en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β , se determinaron los niveles de hsa-miR-145-5p a través de ensayo Taqman™. De manera similar a lo encontrado en GSL de pacientes con SS, se encontró una disminución significativa de los niveles de hsa-miR-145-5p en células estimuladas con IFN- α ($p < 0,0001$) e IFN- β ($p < 0,0001$) (Figura 13A), lo que sugiere un rol específico de los IFNs I en la disminución del hsa-miR-145-5p.

Para determinar si la disminución del hsa-miR-145-5p observada en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β tiene un efecto en sus blancos, se midieron los niveles de transcritos y de proteína de MUC1 y TLR4, a través de RT-qPCR y Western Blot, respectivamente. En concordancia con lo observado en GSL de pacientes con SS, se observó un aumento significativo de los niveles de transcritos de MUC1 al estimular con IFN- α ($p < 0,0001$) e IFN- β ($p < 0,0001$) (Figura 13B). De manera similar, se observó un aumento significativo de los niveles de transcritos de TLR4 al estimular con IFN- α ($p = 0,005$) e IFN- β ($p < 0,0001$) (Figura 13C).

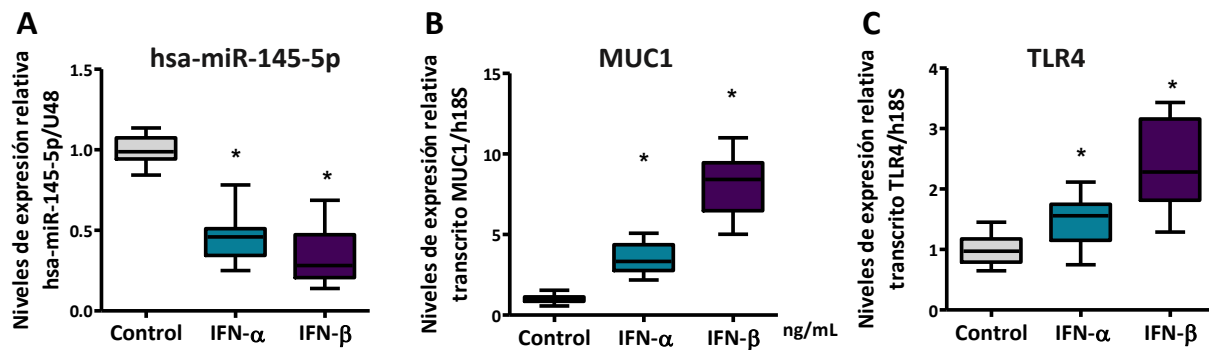


Figura 13. Niveles de hsa-miR-145-5p y niveles de transcrito de MUC1 y TLR4 en células HSG estimuladas con IFN-α o IFN-β. (A) Niveles relativos de hsa-miR-145-5p en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN-α o IFN-β por 24 h. Niveles relativos de transcrito de MUC1 (B), y TLR4 (C), en células estimuladas con 10 ng/mL de IFN-α o IFN-β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes de 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

En el caso de los niveles proteicos, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína de MUC1 en células HSG estimuladas con IFN-α ($p=0,0093$), e IFN-β ($p=0,0034$) (Figura 14A-B). De igual manera se observó un aumento en los niveles proteicos de TLR4 al estimular con IFN-α ($p=0,0040$) e IFN-β ($p=0,0040$) (Figura 14C-D). Estos resultados sugieren que IFNs I inducen un aumento de los niveles de transcrito y proteína de MUC1 y TLR4, y esto podría estar asociado a la disminución del hsa-miR-145-p dependiente de IFNs I.

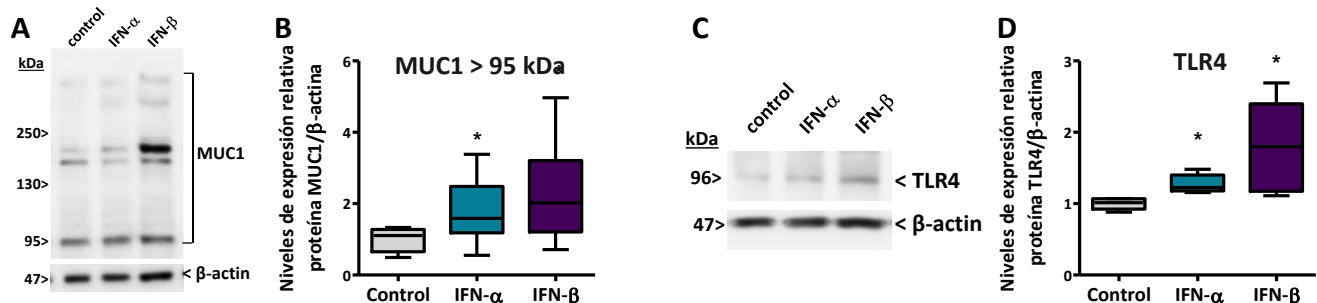


Figura 14. Niveles de proteína de MUC1 y TLR4 en células HSG estimuladas con IFN-α o IFN-β. Imágenes representativas de Western Blots de MUC1 (A) y TLR4 (C) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN-α o IFN-β por 24 h. Cuantificación de los niveles proteicos de MUC1 (incluyendo todas las bandas sobre 95 kDa) (B) y TLR4 (D) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN-α o IFN-β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

A continuación, se exploraron los posibles mecanismos a través de los cuales los IFNs I podrían inducir la disminución del hsa-miR-145-5p. Previamente se ha descrito que la sobreactivación de la vía de IFNs I es capaz de disminuir el procesamiento de diversos pri-miRNAs debido a una menor interacción de este precursor con el complejo microprocesador [58]. Esto genera una acumulación del pri-miRNA y la consecuente disminución del miRNA maduro [58]. Considerando que en GSL de pacientes con SS se observó tanto la sobreactivación de la vía de IFNs I como la disminución del hsa-miR-145-5p (miRNA maduro), se midieron los niveles del pri-miR-145 a través de un ensayo Taqman™ en GSL de 8 pacientes con SS y 6 individuos controles.

Esto ya que la detección del pri-miRNA en conjunto con el miRNA maduro permiten discernir si las alteraciones observadas en los niveles de miRNA maduro se asocian a alteraciones transcripcionales o de su procesamiento. Este ensayo detecta de manera específica el pri-miRNA y no del miRNA maduro mediante el uso de partidores de amplificación y sondas de detección que sean complementarias a alguna secuencia dentro de los 500 nucleótidos que flanquean el *stem-loop* que contiene al pre-miRNA y al miRNA maduro. Las GSL de pacientes SS presentaron niveles significativamente elevados de pri-miR-145 con respecto a los controles ($p=0,0406$) (Figura 15A) lo que sugiere una posible acumulación de este precursor. Además, se encontró una relación directa y significativa con los niveles de transcrito de IFN- β ($R=0,7846$; $p=0,0004$) (Figura 15B) y con los niveles de activación de la vía de IFNs I, dada por los puntajes de IFNs I ($R=0,5692$; $p=0,0168$) (Figura 15C). Estas asociaciones sugieren una posible relación entre la activación de esta vía y los niveles elevados del pri-miR-145.

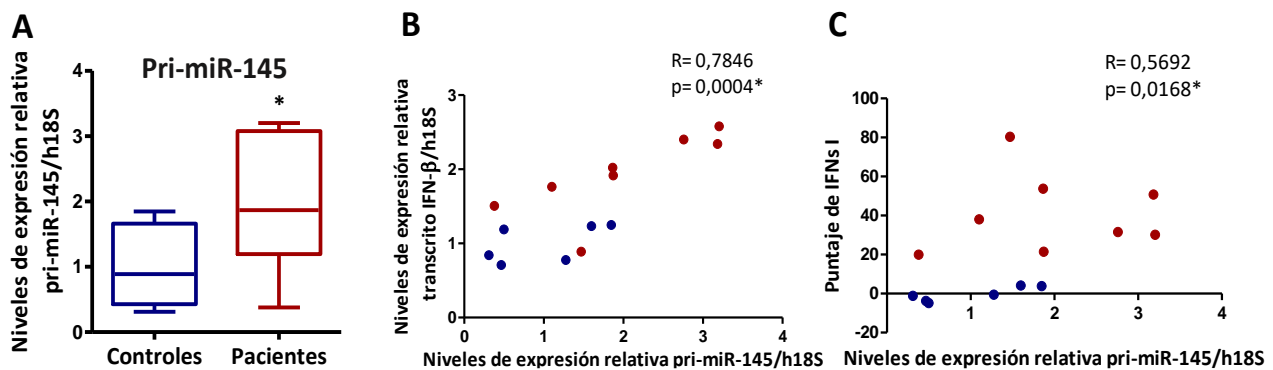


Figura 15. Niveles de pri-miR-145 en GS de pacientes con SS e individuos controles. (A) Niveles relativos de pri-miR-145 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de pri-miR-145 y los niveles de transcrito de IFN- β (B) y puntaje de IFNs I (C) respectivamente. Datos representativos de 3 mediciones independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

Con el propósito de establecer si los niveles aumentados del pri-miR-145 observados en GSL de pacientes con SS están asociados específicamente a la sobreactivación de la vía de IFNs I, se determinaron sus niveles en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β . Sin embargo, no se lograron establecer los niveles de pri-miR-145 en este modelo debido a que se obtuvieron detecciones por sobre un umbral de ciclos (Ct) de 42. Debido a la variabilidad que genera la detección de transcritos a ciclos tardíos, no se pudo calcular la expresión relativa del pri-miR en este modelo in vitro.

En conjunto, los resultados obtenidos tanto en GSL de pacientes con SS como en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β sugieren un rol específico de estas citoquinas y la activación de su vía en la disminución del hsa-miR-145-5p, así como una asociación entre la disminución, dependiente de IFNs I, de este miRNA con la sobreexpresión de MUC1 y TLR4. Además, los resultados obtenidos en GSL de pacientes con SS sugieren una asociación entre la activación de la vía de IFNs I y la acumulación del pri-miR-145. Parte de estos resultados fueron publicados en Jara y colaboradores, *Frontiers in Immunology* 12:685837 [81].

Objetivo específico 3: Evaluar el rol de la maquinaria enzimática de m6A y ediciones de adenosinas en los niveles del hsa-miR-145-5p y su asociación a IFNs I en GS de pacientes con SS y células HSG.

A pesar de la imposibilidad de detectar el pri-miR-145 en nuestro modelo *in vitro*, y considerando los hallazgos realizados en GSL de pacientes con SS, los cuales sugieren una acumulación de este precursor asociada a la sobreactivación de la vía de IFNs I, se continuó con la exploración de los mecanismos a través de los cuales estas citoquinas podrían estar alterando el procesamiento del pri-miR-145 y generando la disminución del hsa-miR-145-5p. Considerando que la interacción entre pri-miRNAs y el complejo microprocesador puede ser alterada por metilaciones de la adenosina en la posición N6 (m6A) [59], se recurrió a la herramienta bioinformática SRAMP (del inglés *sequence-based RNA adenosine methylation site predictor*) [82] para determinar si la secuencia del pri-miR-145 tiene sitios susceptibles a ser metilados por el complejo METTL3/METTL14. Esta herramienta utiliza la información obtenida a través de técnicas de alto rendimiento que mapean con resolución de un nucleótido sitios metilados del transcriptoma para extraer e integrar las características de secuencia adicionales al sitio de consenso DRACH (D=A, G o U; H=A, C o U), así como de estructura del RNA para predecir sitios m6A. Si bien los pri-miRNAs no han sido mapeados completamente, se utilizó para este análisis la secuencia comprendida entre el último sitio de inicio de transcripción reportado para el hsa-miR-145-5p en la base de datos miRT [83] y el último nucleótido del *stem-loop* que contiene el miRNA maduro. Se encontraron 2 sitios metilables de muy alta confiabilidad y 17 sitios metilables de alta confiabilidad (Figura 16A), lo que sugiere que el pri-miR-145 podría ser susceptible a la modificación m6A y ver regulado su procesamiento a través de este mecanismo.

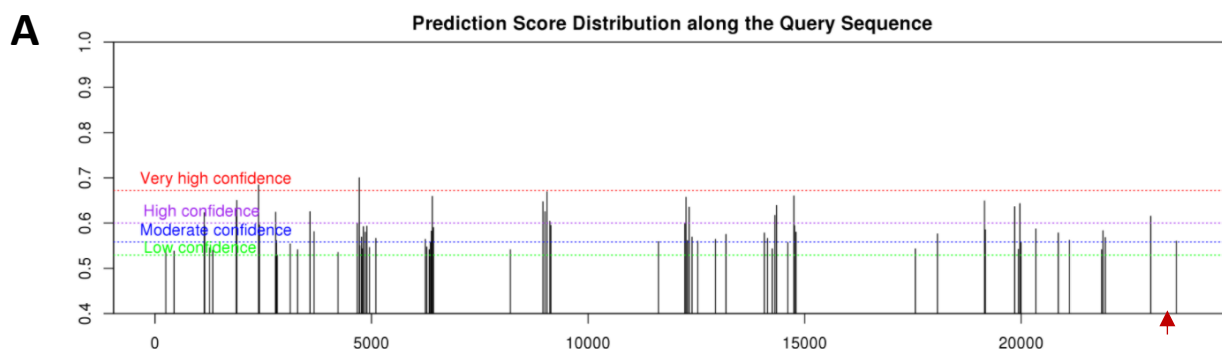


Figura 16. Distribución de los sitios metilables predichos en la secuencia del pri-miR-145 y su puntaje de confiabilidad. (A) Gráfico generado por la herramienta SRAMP que ilustra la distribución de los sitios metilables predichos por la en la secuencia del pri-miR-145 reportada en la base de datos miRT y sus puntajes de confiabilidad (baja, moderada, alta y muy alta). La flecha roja señala la ubicación del *stem-loop* correspondiente al pre-miR-145.

Considerando estos antecedentes, se caracterizó la expresión de la maquinaria enzimática encargada de la metilación (METTL3 y METTL14) y desmetilación (FTO y ALKBH5) del RNA, de la modificación m6A, para evaluar posibles alteraciones que conduzcan a cambios en la metilación del RNA. El análisis de las GSL de 8 pacientes

con SS y 6 individuos controles a través de RT-qPCR reveló niveles significativamente aumentados de transcrito de METTL3 ($p=0,0022$) (Figura 17A) en GSL de pacientes con SS, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para los niveles de transcrito de METTL14 entre ambos grupos ($p=0,0864$) (Figura 17A). Al medir los niveles de proteína a través de Western Blot en GSL de 7 pacientes con SS y 5 individuos controles se observaron niveles significativamente disminuidos de METTL3 ($p=0,0265$) (Figura 17B-C) en GSL de pacientes con SS, sin observarse cambios significativos en los niveles de METTL14 ($p=0,1000$) (Figura 17B-C). Interesantemente, se encontró una correlación inversa y significativa entre los niveles de transcrito de METTL3 y los niveles del miRNA maduro del hsa-miR-145-5p ($R=-0,5648$; $p=0,0177$) (Figura 17D), así como una correlación directa y significativa entre el puntaje de IFNs I y los niveles de transcrito de METTL3 ($R=0,7626$; $p=0,0008$) (Figura 17E) y una relación inversa con los niveles de proteína de METTL3 ($R=-0,6014$; $p=0,0193$) (Figura 17F). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de transcrito o proteína de METTL14 con los niveles de hsa-miR-145-5p o puntaje de IFNs I (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren una posible asociación entre la activación de la vía de IFNs I, la disminución del hsa-miR-145-5p y los niveles de transcrito de METTL3.

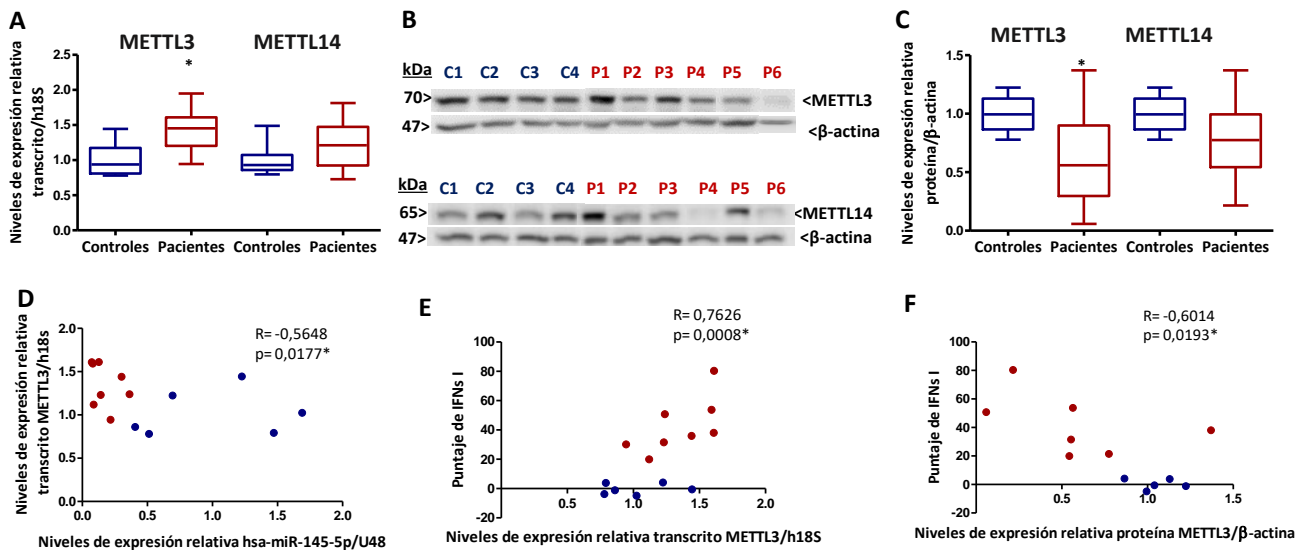


Figura 17. Niveles de transcrito y proteína de las metiltransferasas METTL3 y METTL4 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (A) Niveles relativos de transcrito de METTL3 y METTL14 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (B) Imágenes representativas de Western Blots de METTL3 y METTL14 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de METTL3 y METTL14 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (D) Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles de transcrito de METTL3. Análisis de correlación de Spearman entre el puntaje de IFNs I y los niveles de transcrito (E) y proteína (F) de METTL3. Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

A continuación, se detectó la localización de estas enzimas mediante inmunofluorescencia, en dónde se observó que tanto METTL3 como METTL14 se expresan en las células acinares y ductales de GSL de pacientes con SS e individuos controles, así como en las células inflamatorias de pacientes con SS (Figura 18A-H) (Tabla

6). Ambas enzimas presentan una localización principalmente nuclear, observándose un patrón heterogéneo granular más pronunciado en pacientes, en conjunto a una tinción citoplasmática principalmente basal de menor intensidad (Figura 18A'-H') (Tabla 6).

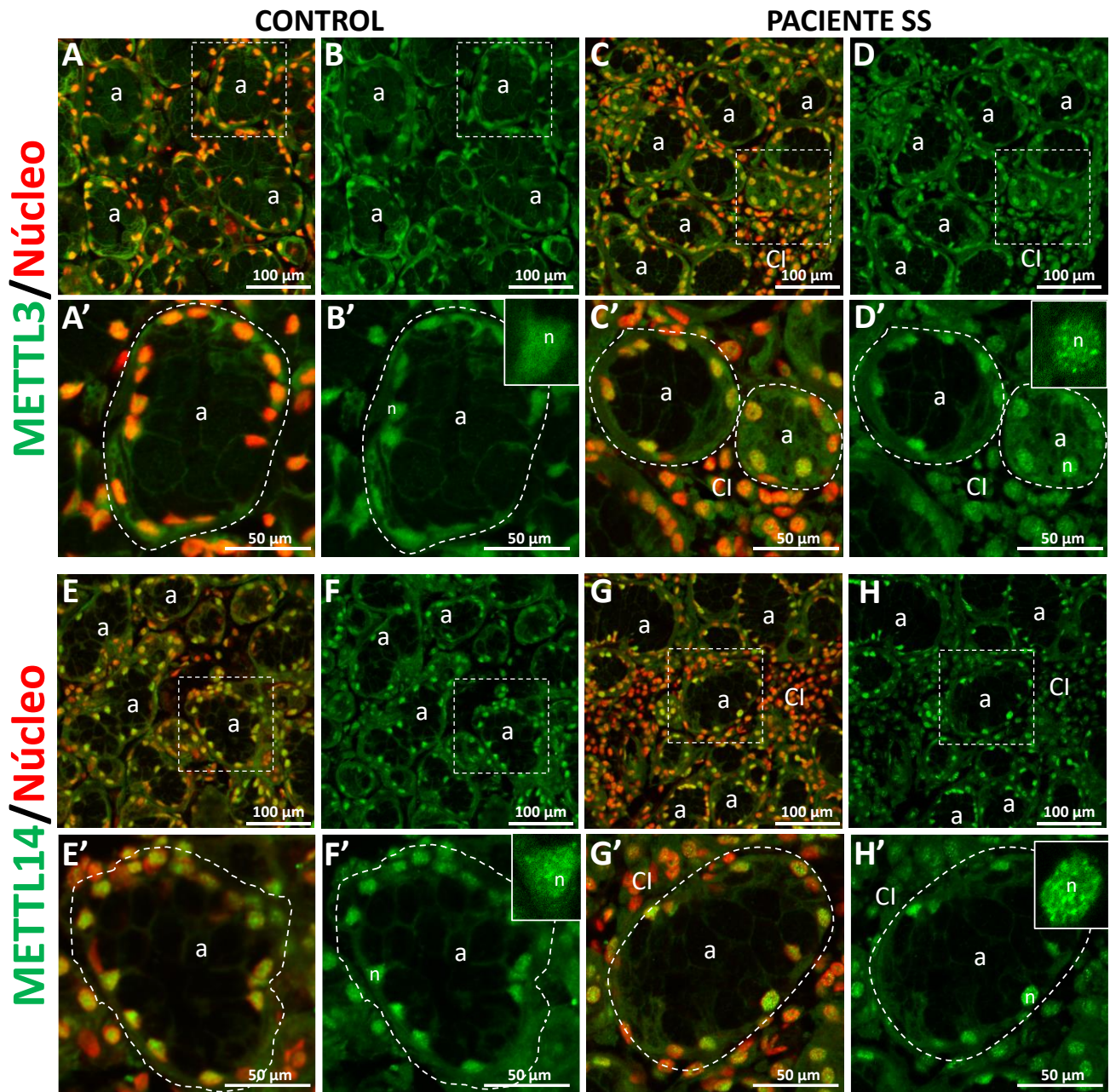


Figura 18. Localización de las metiltransferasas METTL3 y METTL14 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de la detección por inmunofluorescencia de METTL3 (A-D) y METTL14 (E-H) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. A'-H' imágenes de aumento mayor de los acinos delimitados en un cuadrado de líneas entrecortadas en A-H. Los límites acinares se encuentran delimitados con líneas entrecortadas en A'-H'. a: acino, Cl: células inflamatorias, n: núcleo

Tabla 6. Resumen de la localización de la maquinaria enzimática de m6A y A->I en GSL de pacientes con SS e individuos controles.

		Controles		Pacientes	
		Proteína	Células acinares	Células acinares	Células inflamatorias
m6A	Metilasas	METTL3	Principalmente nuclear y citoplasmática (basal)	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular) y citoplasmática más débil	Nuclear (patrón heterogéneo granular), y citoplasmática
		METTL14	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular leve) y citoplasmática más débil	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular) y citoplasmática más débil	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular), y citoplasmática más débil
	Desmetilasas	FTO	Principalmente nuclear y citoplasmática	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular leve) y citoplasmática débil	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular leve), y citoplasmática más débil
		ALKBH5	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular leve) y citoplasmática más débil	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular leve) y citoplasmática más débil	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular) y citoplasmática más débil
A->I	Desaminasa	ADAR1	Principalmente nuclear y citoplasmática más débil	Principalmente nuclear y citoplasmática más débil	Principalmente nuclear (patrón heterogéneo granular) y citoplasmática más débil

Con respecto a las desmetilasas que remueven la marca m6A del RNA, el estudio de GSL de 8 pacientes con SS y 6 individuos controles a través de RT-qPCR evidenció niveles significativamente aumentados de transcrito de ALKBH5 en GSL de pacientes con SS ($p= 0,0296$) (**Figura 19A**) sin cambios significativos en los niveles de transcrito de FTO ($p= 0,0998$) (**Figura 19A**). Por otra parte, no se encontraron cambios significativos en los niveles proteicos de ALKBH5 ($p= 0,1405$) (**Figura 19B-C**) pero si se encontró una disminución significativa en los niveles de FTO ($p= 0,0364$) (**Figura 19B-C**) en GSL de pacientes con SS. Sin bien no se encontró una correlación significativa entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles de ALKBH5 ($R=-0,3495$; $p=0,1103$) (**Figura 19D**), sí se encontró una correlación directa y significativa entre el puntaje de IFNs I y los niveles de transcrito de ALKBH5 ($R=0,5121$; $p=0,0306$) (**Figura 19E**), así como una correlación inversa con los niveles proteicos de ALKBH5 ($R=-0,5435$; $p=0,0476$) (**Figura 19F**). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de transcrito o proteína de FTO con los niveles de hsa-miR-145-5p o puntaje de IFNs I (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren una posible asociación entre la activación de la vía de IFNs I y los niveles de ALKBH5.

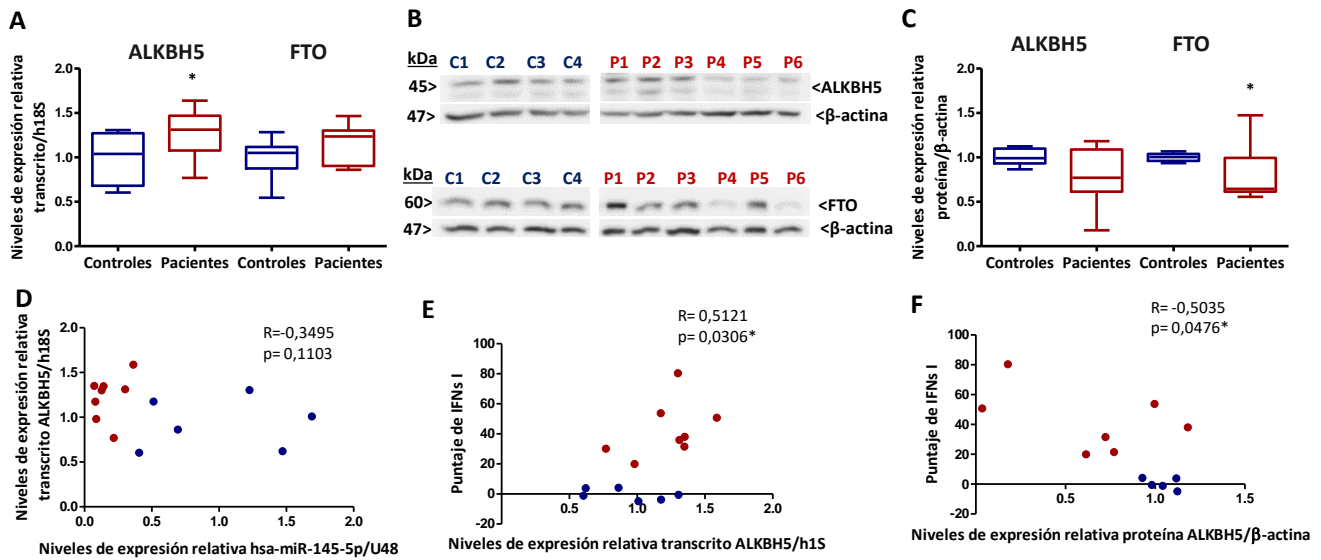


Figura 19. Niveles de transcritos y proteína de las desmetilasas ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (A) Niveles relativos de transcritos de ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (B) Imágenes representativas de Western Blots de ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (C) Cuantificación de los niveles proteicos de ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles. (D) Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles de transcritos de ALKBH5. Análisis de correlación de Spearman entre el puntaje de IFNs I y los niveles de transcritos (E) y proteína (F) de ALKBH5. Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Posteriormente se determinó la localización glandular y distribución celular de ALKBH5 y FTO a través de inmunofluorescencia, la cual evidenció una expresión similar a la de las metiltransferasas, encontrándose señal inmunofluorescente tanto en las células acinares y ductales de GSL de pacientes con SS e individuos controles, así como en las células inflamatorias de pacientes con SS (Figura 20A-H) (Tabla 6). Se encontró además una distribución principalmente nuclear con un patrón granular heterogéneo más pronunciado en células acinares tanto en GSL de pacientes con SS, en conjunto a una tinción citoplasmática de carácter basal de menor intensidad (Figura 20A'-H') (Tabla 6).

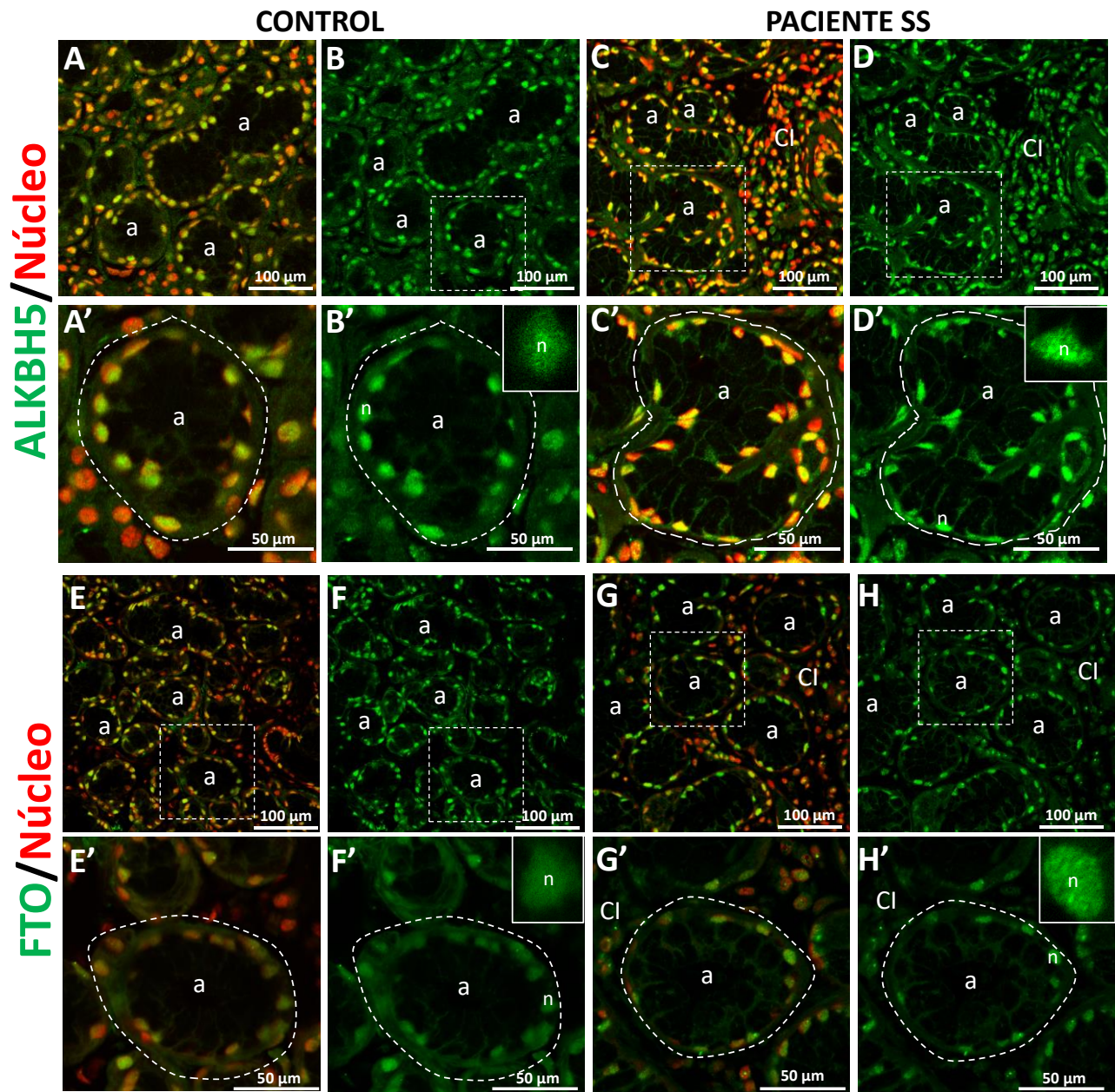


Figura 20. Localización de las desmetilasas ALKBH5 y FTO en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de la detección por inmunofluorescencia de ALKBH5 (A-D) y FTO (E-H) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. A'-H' imágenes de aumento mayor de los acinos delimitados en un cuadrado de líneas entrecortadas en A-H. Los límites acinares se encuentran delimitados con líneas entrecortadas en A'-H'. a: acino, Cl: células inflamatorias, n: núcleo.

La interacción del complejo microprocesador con la marca m6A en los pri-miRNA para mediar su procesamiento ocurre a través de la proteína lectora hnRNPA2B1 [60], por lo que se midieron sus niveles proteicos a través de Western Blot en GSL de 7 pacientes con SS y 5 individuos controles. Como se puede observar en la [Figura 21A-B](#), se encontraron niveles significativamente disminuidos ($p=0,0232$) de esta proteína en GSL de pacientes con SS, sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas con los niveles del hsa-miR-145-5p ni con los niveles de puntaje de IFNs I (resultados no mostrados).

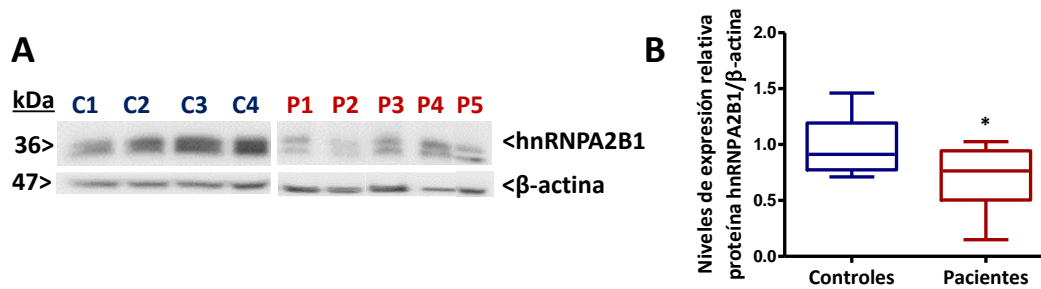


Figura 21. Niveles de proteína de la lectora hnRNPA2B1 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de Western Blots de hnRNPA2B1 (**A**) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Cuantificación de los niveles proteicos de hnRNPA2B1 (**B**) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Finalmente, al evaluar posibles asociaciones con parámetros clínicos de la enfermedad a través de un análisis de correlación de Spearman, se observó una correlación positiva y significativa entre el score de foco y los niveles de transcrito de METTL3 ($R=0,745$, $p < 0,001$) y ALKBH5 ($R=0,546$, $p=0,013$) y la presencia del autoanticuerpo anti-Ro/SSA y los niveles de transcrito de METTL3 ($R=0,690$, $p < 0,001$) y ALKBH5 ($R=0,566$, $p=0,0009$), así como entre la presencia del autoanticuerpo anti-La/SSB y los niveles de transcrito de METTL3 ($R=0,643$, $p=0,002$) (**Tabla 7**). También se encontró una correlación inversa y significativa entre la presencia del autoanticuerpo anti-Ro/SSA y los niveles de proteína de METTL3 ($R=-0,588$, $p=0,021$), FTO ($R=-0,557$, $p=0,031$) y hnRNPA2B1 ($R=-0,505$, $p=0,039$) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Correlaciones entre los niveles de enzima metiltransferasas y desmetilasas con parámetros clínicos

Parámetro	R	p
Ro - mRNA METTL3	0.690	<0.001
Ro - mRNA ALKBH5	0.566	0.009
Ro - Proteína METTL3	-0.588	0.021
Ro - Proteína FTO	-0.557	0.031
Ro - Proteína hnRNPA2B1	-0.505	0.039
La - mRNA METTL3	0.643	0.002
Score de foco - mRNA METTL3	0.745	<0.001
Score de foco - mRNA ALKBH5	0.546	0.013

En conjunto estos resultados sugieren alteraciones en los niveles de transcrito y/o proteína de la maquinaria enzimática asociada a la incorporación y remoción de la marca m6A en pri-miRNAs, así como de la lectora de m6A en pri-miRNA hnRNPA2B1 en las GSL de pacientes con SS. Estos cambios además evidenciaron posibles asociaciones con parámetros clínicos indicativos de inflamación y autoinmunidad, así como con la activación de la vía de IFNs I y en particular de los niveles de transcrito de METTL3 con la disminución del hsa-miR-145-5p.

Por otra parte, la interacción entre pri-miRNAs y el complejo microprocesador también puede ser alterada por ediciones de adenosina por inosina en este precursor [67], reacción que es catalizada por la familia de enzimas ADAR que editan RNAs de doble hebra [69]. Si bien no existe un motivo de consenso definido en el RNA que permita predecir sitios editables como en el caso de m6A, ADAR1, miembro de la familia de enzimas ADAR posee una isoforma que es inducible por IFNs I, citoquinas cuya vía esta sobreactivada en GSL de pacientes con SS (**Figura 11**). Considerando estos antecedentes, se determinaron a través de RT-qPCR y Western Blot, los niveles de transcrito y proteína de la isoforma que se expresa de manera constitutiva (ADAR1p110) como de la isoforma inducible por IFNs I (ADAR1p150). Para medir los niveles de transcrito de ambas isoformas de manera separada se utilizaron dos sets de partidores distintos dirigidos contra (i) el exón 1A que está presente en la isoforma ADAR1p150 o (ii) contra el exón 1B que caracteriza a la isoforma ADAR1p110 [84] (**Tabla 3, Figura 2A**). No se encontraron cambios significativos en los niveles de transcrito de la isoforma que se expresa de manera constitutiva en GSL de 8 pacientes con SS en relación con los 6 individuos controles ($p=0,3365$) (**Figura 22A**), pero si se observó un aumento significativo de los niveles de transcrito de la informa inducible por IFNs I ($p=0,0008$) (**Figura 22A**).

Para determinar los niveles proteicos de ADAR1p110 y ADAR1p150 se utilizó un único anticuerpo que detecta la región comprendida entre los aminoácidos 440-826, compartidos por ambas isoformas (**Tabla 4**). La diferencia en la migración de ambas isoformas en el gel de electroforesis debido a la diferencia en 269 aminoácidos extra en el N-terminal que posee la isoforma ADAR1p150 [84] (**Figura 2B**) permite detectarlas y cuantificarlas de manera separada. De forma similar a lo observado con los niveles de transcrito de ambas enzimas, no se observó cambios significativos en los niveles proteicos de la isoforma ADAR1p110 ($p=0,1297$) (**Figura 22B-C**), pero si se una tendencia al aumento de la isoforma ADAR1p150 ($p=0,1043$) (**Figura 22B-C**) en GSL de 7 pacientes con SS en relación con 5 individuos controles. Interesantemente, se encontró una correlación inversa y significativa entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles de transcrito de ADAR1p150 ($R=-0,6308$; $p=0,0078$) (**Figura 22D**), así como una asociación directa y significativa entre los niveles de transcrito de ADAR1p150 y el puntaje de IFNs I ($R=0,7670$; $p=0,0007$) (**Figura 22E**). Si bien no se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de proteína de ADAR1p150 y el puntaje de IFNS I ($R=0,3636$;

$p=0,1358$) (**Figura 22F**), estos resultados sugieren una posible asociación entre la activación de la vía de IFNs I, los niveles aumentados de transcrito de ADAR1p150 y la disminución del hsa-miR-145-5p.

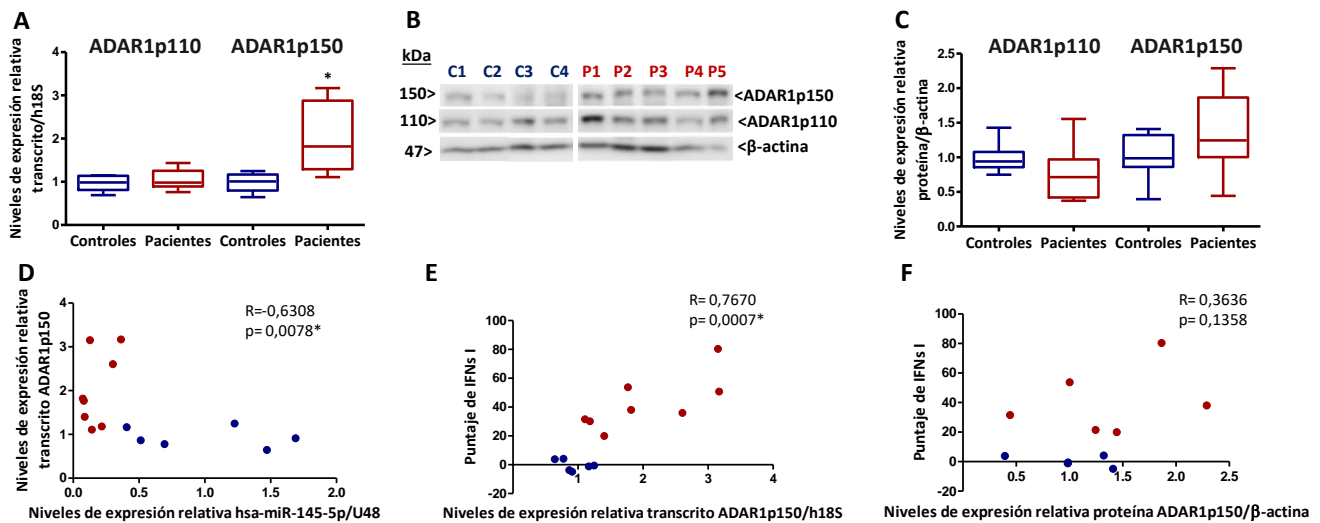


Figura 22. Niveles de transcrito y proteína de las isoformas de ADAR1 ADAR1p110 y ADAR1p150 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Niveles relativos de transcrito de ADAR1p110 y ADAR1p150 (**A**) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de Western Blots de ADAR1p110 y ADAR1p150 (**B**) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Cuantificación de los niveles proteicos de ADAR1p110 y ADAR1p150 (**C**) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de hsa-miR-145-5p y los niveles de transcrito de ADAR1p150 (**D**). Análisis de correlación de Spearman entre el puntaje de IFNs I y los niveles de transcrito (**E**) y proteína (**F**) de ALKBh5. Datos representativos de 4 mediciones independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Posteriormente se estudió por inmunofluorescencia la localización ADAR1 en las GSL de pacientes con SS e individuos controles. Como se muestra en la **Figura 23A-D**, ADAR1 se expresó tanto en las células acinares y ductales de GSL de pacientes con SS e individuos controles, así como en las células inflamatorias de pacientes con SS (**Figura 23A-D**) (**Tabla 6**). Además, se encontró que la señal inmunofluorescente se distribuye tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células acinares, presentando en el núcleo un patrón heterogéneo granular leve como el observado para la maquinaria enzimática de m6A. (**Figura 23A-D**) (**Tabla 6**). Sin embargo, es importante destacar que, debido a la inexistencia de anticuerpos comerciales dirigidos contra cada isoforma, a través de esta técnica, solo podemos detectar la localización de ADAR1 total sin distinguir entre ADAR1p110 y ADAR1p150.

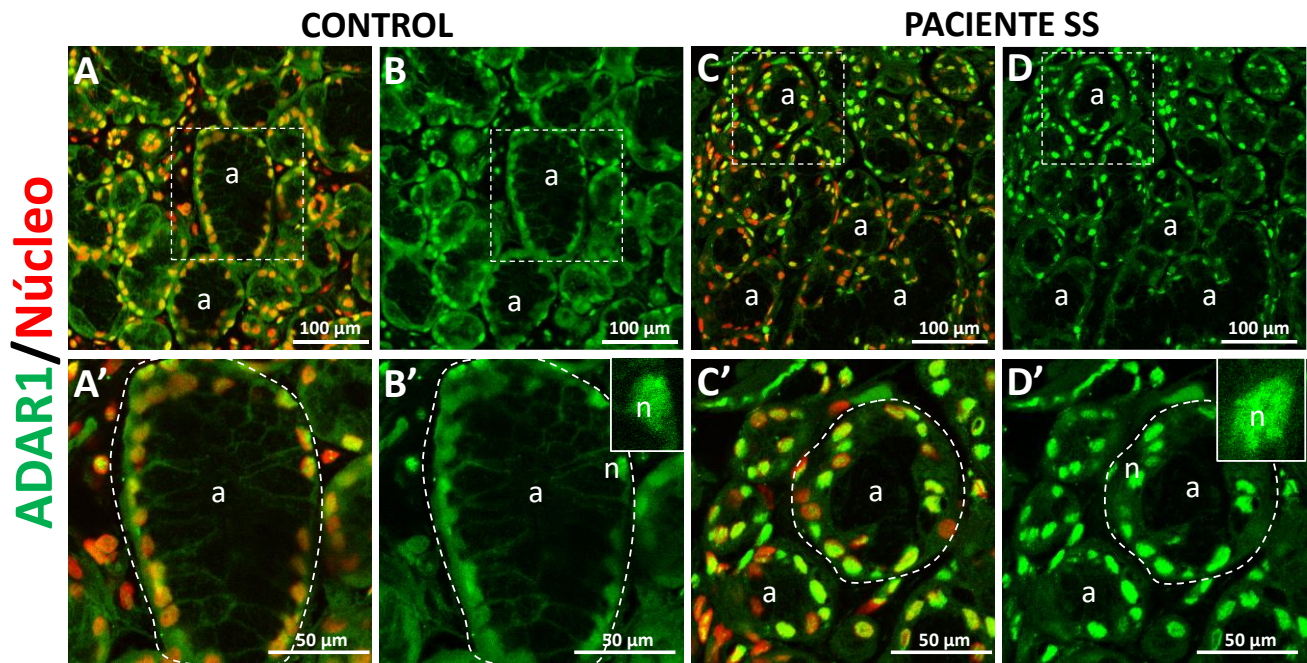


Figura 23. Localización de la desaminasa ADAR1 en GSL de pacientes con SS e individuos controles. Imágenes representativas de la detección por inmunofluorescencia de ADAR1 (A-D) en GSL de pacientes con SS e individuos controles. A'-D' imágenes de aumento mayor de los acinos delimitados en un cuadrado de líneas entrecortadas en A-H. Los límites acinares se encuentran delimitados con líneas entrecortadas en A'-D'. a: acino, CI: células inflamatorias, n: núcleo.

Finalmente, se realizó un análisis de correlación de Spearman para evaluar posibles asociaciones entre los niveles de ADAR1 y parámetros clínicos de la enfermedad. Como se observa en la [Tabla 8](#), se encontró una correlación positiva y significativa entre los niveles de transcrito de ADAR1p150 y la presencia de autoanticuerpo anti-Ro/SSA ($R=0,761$; $p<0,001$) y el *score* de foco ($R=0,634$; $p=0,003$). Estos hallazgos en conjunto sugieren un aumento en los niveles de transcrito y proteína de la isoforma ADAR1p150 en las GSL de pacientes con SS y una posible asociación con parámetros clínicos indicativos de inflamación y autoinmunidad, así como de la activación de la vía de IFNs I y niveles disminuidos del hsa-miR-145-p.

Tabla 8. Correlaciones entre los niveles de enzima ADAR1p150 con parámetros clínicos

Parámetro	R	p
Ro - mRNA ADAR1p150	0.761	<0.001
Score de foco - mRNA ADAR1p150	0.634	0.003

La disminución del hsa-miR-145-5p dependiente de IFNs I descrita en este trabajo, así como la asociación entre los niveles aumentados del pri-miR-145 y esta citoquina en GSL de pacientes con SS sugieren un rol relevante para los IFNs I en la regulación de los niveles del hsa-miR-145-5p. Sin embargo, las alteraciones en los niveles de transcrito y/o proteína de las enzimas metilantes, desmetilantes y lectora de m6A, así como de la desaminasa ADAR1 podría deberse a múltiples factores incluido las diferentes citoquinas sobre-expresadas en las GSL de pacientes con SS [8]. Para evaluar si estos cambios están o no asociados al efecto directo de los niveles aumentados de IFNs I, se estimularon células HSG con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h y se determinaron los niveles de transcrito y proteína a través de RT-qPCR y Western Blot de estas moléculas. Para el caso de las metiltransferasas, no se encontraron cambios significativos a nivel de transcrito de METTL3 ($p=0,0784$; $p=0,2498$) ni de METTL14 ($p=0,1311$; $p=0,3936$) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β (Figura 24A-B). Con respecto a los niveles de proteína, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de METTL3 ($p=0,4429$; $p=0,3429$) ni METTL14 ($p=0,3429$; $p=0,3429$) en estas mismas condiciones (Figura 24C-E).

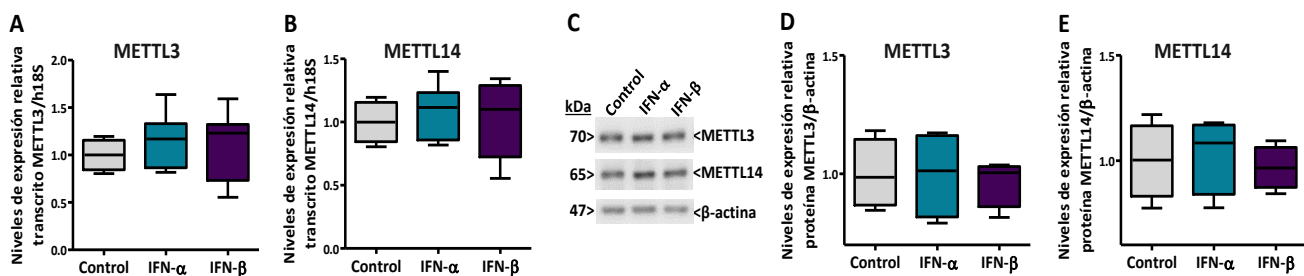


Figura 24. Niveles de transcrito y proteína de las metiltransferasas METTL3 y METTL14 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β . Niveles relativos de transcrito de METTL3 (A) y METTL14 (B) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Imágenes representativas de Western Blots de METTL3 y METTL14 (C) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Cuantificación de los niveles proteicos de METTL3 (D) y METTL14 (E) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

De manera similar a lo observado para las metiltransferasas, no se observaron diferencias significativas al estimular células HSG con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β en los niveles de transcrito de las desmetilasas ALKBH5 ($p=0,4027$; $p=0,2241$) y FTO ($p=0,2181$; $p=0,0567$) (Figura 25A-B). Al medir los niveles proteicos de estas enzimas en las mismas condiciones de estimulación tampoco se observaron diferencias significativas, tanto para ALKBH5 ($p=0,2429$; $p=0,1714$) como para FTO ($p=0,5000$; $p=0,1000$) (Figura 25C-E).

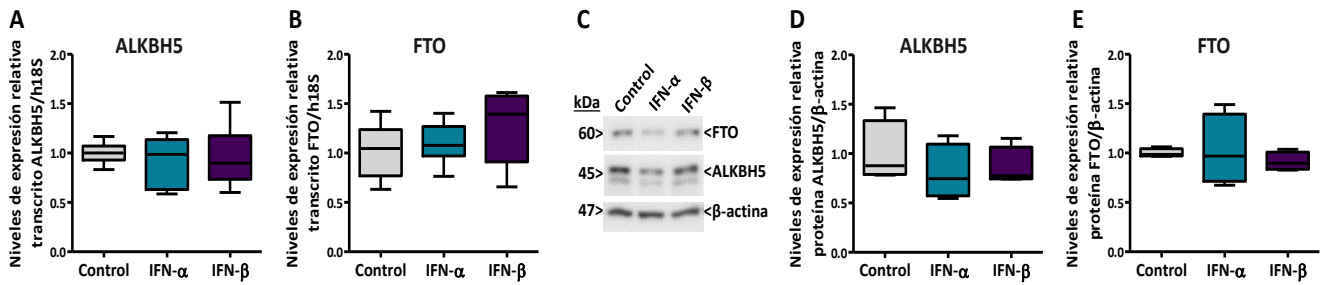


Figura 25. Niveles de transcrito y proteína de las metiltransferasas ALKBH5 y FTO en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β .

Niveles relativos de transcrito de ALKBH5 (A) y FTO (B) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Imágenes representativas de Western Blots de ALKBH5 y FTO (C) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h.

Cuantificación de los niveles proteicos de ALKBH5 (D) y FTO (E) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h.

Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

Finalmente, en lo que respecta a la modificación m6A, no se observaron cambios significativos en los niveles de proteína de la lectora hnRNPA2B1, tanto en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α ($p = 0,5$) como con 10 ng/mL de IFN- β ($p = 0,2429$) (Figura 26A-B). Globalmente, los resultados obtenidos de estos experimentos *in vitro* sugieren que los IFNs I no afectarían los niveles de transcrito ni de proteína de las metiltransferasas de m6A METTL3 y METTL14, de las desmetilasas de m6A ALKBH5 y FTO, ni de la lectora hnRNPA2B1.

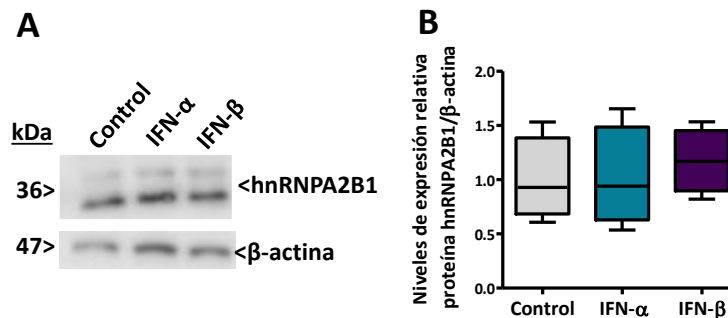


Figura 26. Niveles de proteína de la lectora de m6A hnRNPA2B1 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β . Imagen representativa de Western Blot de hnRNPA2B1 (A) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Cuantificación de los niveles proteicos de hnRNPA2B1 (B) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Por otra parte, al evaluar los niveles de la desaminasa ADAR1 en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β se encontró un aumento significativo de los niveles de transcrito ADAR1p110 ($p = 0,0010$, $p = < 0.0001$) y de ADAR1p150 ($p = < 0.0001$, $p = < 0.0001$) (Figura 27A-B), de manera similar a lo observado en GSL de pacientes con SS. Al medir los niveles de proteína de ADAR1 no se observó aumento significativo en los niveles de proteína de ADAR1p110 ($p = 0,1000$) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α , pero si en células estimuladas con IFN- β ($p = 0,0286$) (Figura 27C-D). Con respecto a la isoforma ADAR1p150, se encontraron

niveles aumentados de proteína tanto en células estimuladas con IFN- α ($p= 0,0143$) como en células estimuladas con IFN- β ($p= 0,0143$) (**Figura 27C y E**). El conjunto de estos hallazgos *in vitro* sugiere que los IFNs I podrían tener un rol en la regulación de los niveles de transcrito y proteína de la isoforma ADAR1p150 de ADAR1.

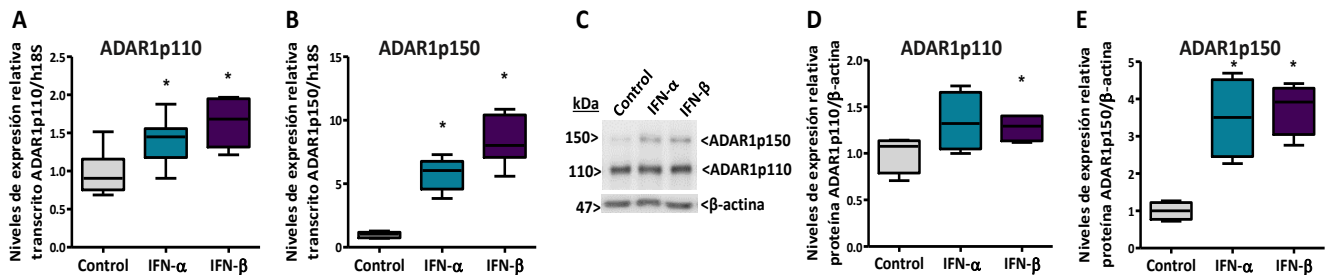


Figura 27. Niveles de transcrito y proteína de las isoformas de ADAR1 ADAR1p110 y ADAR1p150 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β . Niveles relativos de transcrito de ADAR1p110 (**A**) y ADAR1p150 (**B**) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Imágenes representativas de Western Blots de ADAR1p110 y ADAR1p150 (**C**) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Cuantificación de los niveles proteicos de ADAR1p110 (**D**) y ADAR1p150 (**E**) en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Hasta el momento, en este trabajo se encontraron en GSL de pacientes con SS niveles aumentados de transcrito de ADAR1p150 y una tendencia al aumento de sus niveles proteicos, así como una asociación con la disminución del hsa-miR-145-5p y la sobreactivación de la vía de IFNs I. En células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β se observó un aumento de los niveles de transcrito y proteína de ADAR1p150 y una disminución de los niveles hsa-miR-145-5p. También se encontraron niveles aumentados de transcrito del pri-miR-145, que sugiere una acumulación de este precursor y que se asociaron de manera directa con la activación de la vía de IFNs I. Ante la imposibilidad de determinar los niveles de pri-miR-145 en nuestro modelo *in vitro*, a continuación, se realizó un silenciamiento a través de siRNA de la isoforma ADAR1p150 en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β , con el propósito de observar el efecto del silenciamiento de esta desaminasa que se induce con IFNs I en los niveles de miRNA maduro, lo cual será un reflejo indirecto de posibles cambios en el procesamiento del pri-miR.

Al medir los niveles de transcrito ADAR1p110 y ADAR1p150 a través de RT-qPCR en células HSG transfectadas con 10 nM de siRNA dirigido contra ADAR1p150 y luego estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β , no se observaron cambios significativos en los niveles de la isoforma ADAR1p110 ($p=0,0760$; $0,2101$) (**Figura 28A**). Por el contrario, al transfectar con el siRNA, se encontró una disminución significativa de los niveles de ADAR1p150 en relación con el aumento que habían experimentado al estimular con IFN- α ($p=0,0038$) o IFN- β ($p=0,0043$) (**Figura 28B**). Esta disminución fue de un 28,75% en el caso de células

estimuladas con IFN- α , y de un 37,1% en el caso de células estimuladas IFN- β . Estos resultados sugieren un silenciamiento parcial específico de la isoforma ADAR1p150.

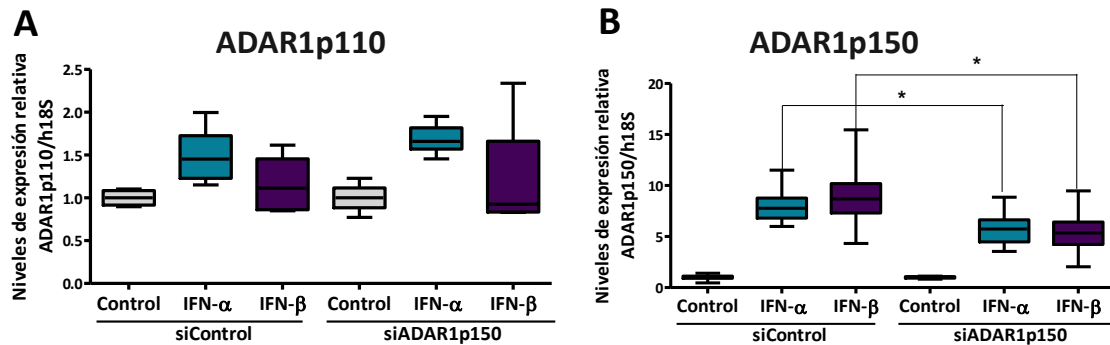


Figura 28. Niveles de transcritos de las isoformas de ADAR1 ADAR1p110 y ADAR1p150 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β y silenciadas con siRNA siADAR1p150. Niveles relativos de transcritos de ADAR1p110 (A) y ADAR1p150 (B) en células HSG silenciadas con 10 nM de siADAR1p150 por 24 h y posteriormente estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

El silenciamiento de ADAR1p150 se asoció a un aumento significativo de los niveles de hsa-miR-145-5p, en comparación a la disminución que había provocado la estimulación de células HSG con 10 ng/mL de IFN- α ($p < 0,0001$) o IFN- β ($p < 0,0001$) (Figura 29A). Este aumento fue de un 300% en el caso de células HSG estimuladas con IFN- α y de un 366% en el caso de células HSG estimuladas con IFN- β . En estas mismas células se observó que el silenciamiento de ADAR1p150 está asociado a una disminución significativa de los niveles de transcritos del blanco de hsa-miR-145-5p FSCN1 en células HSG estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α ($p = 0,0333$) o IFN- β ($p = 0,0143$) (Figura 29B). Esta disminución fue de un 20% en el caso de células HSG estimuladas con IFN- α y de un 50% en el caso de células HSG estimuladas con IFN- β .

De manera similar a lo observado para FSCN1, el silenciamiento de ADAR1p150 muestra una tendencia a la disminución de los niveles de transcritos de MUC1 que habían aumentado al estimular las células HSG con 10 ng/mL de IFN- α ($p = 0,4429$) o IFN- β ($p = 0,2429$) (Figura 29C), sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. En el caso de TLR4 también se observó una tendencia a la disminución, aunque no significativa al silenciar ADAR1p150 en células HSG estimuladas con IFN- α ($p = 0,2429$) (Figura 29D) y una disminución significativa en el caso del silenciamiento de ADAR1p150 en células estimuladas con IFN- β ($p = 0,0143$) (Figura 27D). Estos resultados sugieren un posible rol de ADAR1p150 en la regulación de los niveles de hsa-miR-145-5p de manera dependiente de IFNs I, y en consecuencia en los niveles de sus blancos.

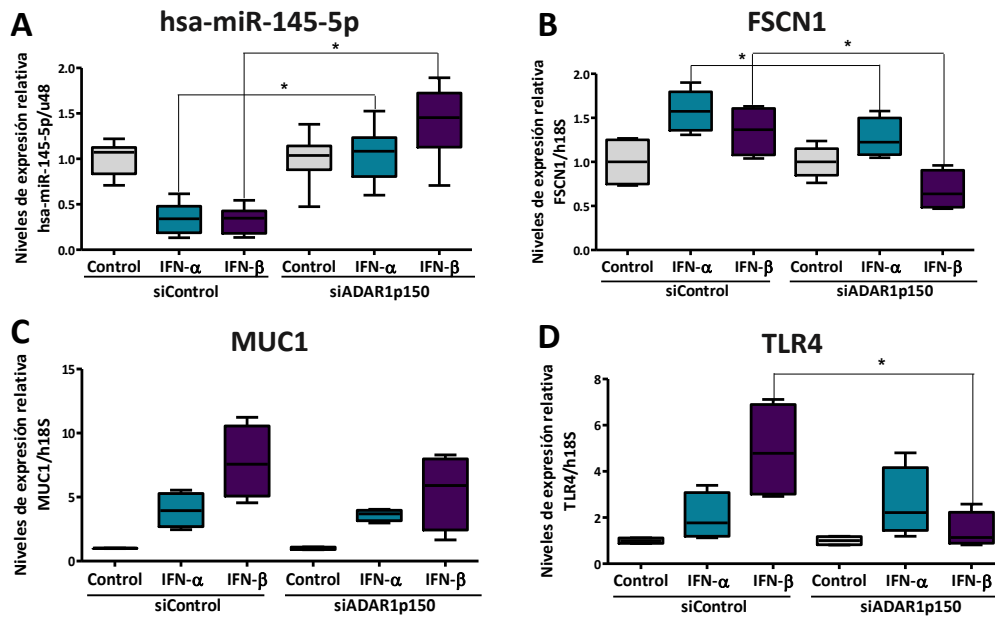


Figura 29. Niveles de hsa-miR-145-5p y niveles de transcrito de FSCN1, MUC1 y TLR4 en células HSG estimuladas con IFN- α o IFN- β y silenciadas con siRNA siADAR1p150. **(A)** Niveles relativos de hsa-miR-145-5p células HSG silenciadas con 10 nM de siADAR1p150 por 24 h y posteriormente estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Niveles relativos de transcrito de FSCN1 **(B)**, MUC1 **(C)** y TLR4 **(D)** células HSG silenciadas con 10 nM de siADAR1p150 por 24 h y posteriormente estimuladas con 10 ng/mL de IFN- α o IFN- β por 24 h. Datos representativos de 3 mediciones independientes en 4 experimentos independientes. (*) $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo

En conjunto, los resultados obtenidos tanto en GSL de pacientes con SS como en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β sugieren un rol específico de estas citoquinas y la sobreactivación de su vía en la regulación de los niveles de ADAR1p150, pero no en la regulación de los niveles de METTL3, METTL4, FTO, ALKBH5 y hnRNPA2B1. Adicionalmente, el aumento de los niveles de hsa-miR-145-5p al silenciar ADAR1p150 y el potencial efecto en sus blancos, sugiere un rol para esta enzima en la regulación de los niveles del hsa-miR-145-5p.

DISCUSIÓN

Las GS de los pacientes con SS se caracterizan por presentar disfunción secretora, lo cual afecta la cantidad y calidad de la saliva [2]. Además, debido a la naturaleza autoinmune e inflamatoria de esta enfermedad, los pacientes presentan autoanticuerpos circulantes, infiltración linfocítica en las GS y niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias tanto a nivel sistémico como glandular [9]. Entre estas citoquinas, hay una creciente evidencia que destaca el papel de los IFNs I en el inicio y progresión de esta patología [9]. La activación de la vía de IFNs I puede regular a nivel postranscripcional los niveles de diversos miRNAs [58], RNAs no codificantes que muestran expresión diferencial en GS de pacientes con SS [30]. Uno de estos miRNAs destacados es el hsa-miR-145-5p, el cual se cree que podría regular postranscripcionalmente los niveles de dos moléculas sobreexpresadas en las GS de estos individuos: MUC1 y TLR4. En nuestro laboratorio, hemos encontrado evidencia que sugiere la participación de estas proteínas en el mantenimiento del estado inflamatorio y disfuncional de las GS de pacientes con SS [33-35]. Dada la relevancia de MUC1 y TLR4 en el SS, en esta tesis se propuso determinar el rol que tendría el hsa-miR-145-5p en la sobreexpresión de ambas moléculas, así como los mecanismos que regularían los niveles de este miRNA y si están asociados a una regulación postranscripcional mediada por IFNs I.

Niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p fueron observados por Alevizos y colaboradores [30] en estudios usando microarreglos de RNA realizado de GSL de pacientes con SS, como también por secuenciación masiva de RNAs pequeños realizada en nuestro laboratorio [32]. Sin embargo, hasta ahora estos resultados no habían sido validados. **En esta tesis, utilizando ensayos TaqMan se encontraron niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p en GSL de pacientes con SS**, lo que valida experimentalmente por primera vez los hallazgos sugeridos por los *screening* masivos. Interesantemente, diversos estudios le atribuyen al hsa-miR-145-5p un rol anti-inflamatorio. Por ejemplo, este miRNA se ha reportado disminuido en contextos de inflamación crónica como en biopsias de pacientes con colitis ulcerosa [18] y nefritis lúpica [85]. Además, la sobreexpresión del hsa-miR-145-5p en modelos celulares de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lesión miocárdica por isquemia-reperfusión, retinopatía diabética y glomerulonefritis crónica contribuye a la disminución de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 y quimioquinas como CXCL16 [19, 86-88]. Considerando la naturaleza inflamatoria del SS, el estudio del hsa-miR-145-5p y los blancos que regula, así como los procesos que llevan a su disminución adquiere relevancia para la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad.

Análisis de predicción de interacciones miRNA-mRNA blanco *in silico* mediante la plataforma mirDIP 4.1 [79] sugieren que los transcritos de MUC1 y TLR4 son blancos del hsa-miR-145-5p. Ambas moléculas se han encontrado sobreexpresadas en GSL de pacientes con SS en trabajos previos de nuestro grupo [33-35] y de otros laboratorios [89] y tienen un rol clave en la inflamación y disfunción glandular. **En esta tesis se encontraron niveles aumentados de transcrito de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS**, confirmando en esta cohorte en particular los hallazgos reportados previamente en la literatura en cohortes distintas. Además, **la relación inversa encontrada entre los niveles de transcrito de MUC1 y TLR4 y los niveles del hsa-miR-145-5p** sugieren una posible asociación entre ambas moléculas.

En la presente tesis, no se encontraron cambios estadísticamente significativos para los niveles de proteína de MUC1. En cohortes anteriores de pacientes si se encontraron niveles aumentados de la proteína de MUC1 a través de Western Blot e inmunohistoquímica [33, 35]. La discrepancia observada en comparación a los resultados obtenidos en esta tesis podría deberse a las diferencias individuales que presentan las glándulas de pacientes con SS. Entre ellas, cambios en la cantidad de parénquima, en el tipo y calidad de acinos, en la cantidad de infiltrado inflamatorio, fibrosis y adiposis. Los acinos serosos son los principales productores de MUC1, y en algunos pacientes disminuyen en número a medida que aumenta el daño glandular. Cualquiera de estos factores puede incidir en la cuantificación desde un extracto glandular total, sin embargo, este sesgo metodológico puede ser dilucidado por la detección inmunofluorescente de MUC1, ya que esta técnica muestra la histología en su integridad de cada paciente. Estudios preliminares en esta tesis, mostraron aumento en la intensidad de la señal inmunofluorescente para MUC1 en GSL de pacientes con SS (ver [Figura 5](#)) y además una distribución alterada en las células acinares. Estudios futuros de cuantificación de esta señal serán necesarios para dilucidar este problema y de la misma forma para los niveles proteicos de TLR4 (ver [Figura 6](#)).

Si bien antecedentes experimentales en modelos celulares en dónde se han modificado los niveles del hsa-miR-145-5p sugieren una regulación por parte de este miRNA en los niveles de MUC1 [90] y TLR4 [88], también se ha descrito en la literatura que los efectos del hsa-miR-145-5p podrían ser dependientes del tipo celular. Por ejemplo, respecto a su rol como supresor tumoral, se ha visto que la sobreexpresión del hsa-miR-145-5p puede inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer de colon (HCT-116), pero no tendría efecto en el crecimiento de otras líneas celulares de cáncer de mama como MDA-MB-231 y LM2-4142 [90]. Debido a este antecedente se decidió demostrar el rol de este miRNA en la regulación de los niveles de MUC1 y TLR4 en nuestro modelo celular en particular a través de la transfección de células HSG con *mimic* o *inhibitor* de hsa-miR-145-5p. Los resultados revelaron que **la modulación de los niveles del miRNA en células HSG impacta en los niveles de transcrito y proteína de MUC1 y TLR4**. Estos resultados concuerdan con

lo observado en GSL de pacientes con SS y sustentan empíricamente el rol del hsa-miR-145-5p en la regulación de los niveles de MUC1 y TLR4. Estos hallazgos están en concordancia con lo reportado por Sachdeva y colaboradores, en donde la transfección de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 con un vector de expresión del hsa-miR-145 o con un anti-miR-145 sobreexpresa o disminuye los niveles proteicos de MUC1, respectivamente [90]. Efectos similares en los niveles de proteína de MUC1 fueron observados en las líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 y ES-2 M al sobreexpresar hsa-miR-145-5p con un vector de expresión o con *mimic* [91]. Los resultados de estos ensayos funcionales también concuerdan con lo reportado para TLR4 en un modelo de retinopatía diabética, en donde la sobreexpresión del hsa-miR-145-5p disminuye de manera significativa los niveles de transcrito y proteína de TLR4, y el efecto contrario produce la transfección de un *inhibitor* en células madre derivadas de tejido adiposo humano produjo el efecto contrario [88, 92].

Empleando la herramienta de predicción de sitios de interacción TargetSan [93] se encontró una posible interacción entre los nucleótidos 2-8 del hsa-miR-145-5p (secuencia semilla + posición 8) y los nucleótidos 451-457 del 3' UTR de MUC1 (interacción tipo 7mer-m8). Este sitio de interacción predicho fue demostrado experimentalmente en líneas celulares de cáncer de mama y ovario a través de ensayos con reporteros luciferasa donde se co-transfectan: (I) vectores reporteros que contienen una porción del 3'UTR de MUC1 que incluye los sitios predichos de interacción con el hsa-miR-145-5p *wild type* o mutados y el gen reportero de luciferasa (Firefly luciferase) y (II) *mimic* de hsa-miR-145-5 [90, 91, 94]. De manera similar, y utilizando la misma herramienta de predicción, se encontró una posible interacción entre los nucleótidos 2-8 del hsa-miR145-5p (secuencia semilla + posición 8) seguida de una adenosina y los nucleótidos 2277-2284 del 3' UTR de TLR4 (interacción tipo 8mer). Esta interacción predicha también fue comprobada de manera experimental a través de ensayos de reportero luciferasa, en particular en modelos celulares de retinopatía diabética, diferenciación osteogénica y melanoma [88, 92, 95]. Considerando estos antecedentes, es altamente probable que en GSL de pacientes con SS así como en los ensayos funcionales con *mimic* e *inhibitor*, el hsa-miR-145-5p interaccione directamente con el 3' UTR de MUC1 y TLR4 a través los sitios predichos por TargetScan y que fueron demostrados experimentalmente en otros trabajos, contribuyendo de esta forma a regular los niveles de estas moléculas. Sin embargo, no se pueden descartar otras posibles interacciones entre sitios predichos por otras herramientas informáticas como miRanda [96], que predice otros 3 sitios adicionales de interacción entre MUC1 y hsa-miR-145-5p, o con sitios que no han sido predichos por herramientas bioinformáticas.

La sobreexpresión de MUC1 y TLR4 puede contribuir a la inflamación y disfunción glandular a través de distintos mecanismos. Específicamente, MUC1 es capaz de inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias a través de diversas vías. Por un lado, la isoforma secretada de MUC1, MUC1/SEC, posee una

secuencia de 11 aminoácidos en su extremo C-terminal denominada péptido *immuno-enhancer* capaz de estimular la respuesta inmune a través de la sobreexpresión de STAT1 [36, 97]. Esta misma isoforma es capaz de interactuar con la isoforma de transmembrana MUC1/Y, formando un complejo que podría inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [36, 98]. También se ha reportado que la isoforma MUC1/Y puede inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias a través de NF- κ B [99]. Finalmente, la subunidad C-terminal (MUC1-C) del polipéptido que conforma MUC1 es capaz de desprenderse de la subunidad N-terminal ante condiciones de pérdida de homeostasis y translocar hacia el núcleo para inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-6, IFN- γ y TNF- α a través de su interacción con NF- κ B p65, IRF1 o STAT1[99]. Interesantemente, los niveles de transcrito de MUC1/SEC y MUC1/Y pueden ser inducidos por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ [33], hallazgos que sugieren un *loop* de señalización mucina-citoquina que autoperpetuaría las condiciones inflamatorias en las GS de pacientes con SS. Recientemente hemos descrito que MUC1 se acumula en el retículo endoplásmico, lo que impide su tráfico a la membrana plasmática apical, contribuyendo al estrés de este organelo [35]. Interesantemente, el estrés de retículo endoplásmico puede inducir inflamación a través de la activación del inflamosoma [100], entre otros mecanismos, contribuyendo a mantener un ciclo autoperpetuante de inflamación.

Por otra parte, las células acinares de las GS de pacientes con SS experimentan una pérdida de la polaridad apico-basal que conlleva una redistribución de la maquinaria molecular de exocitosis y la consecuente exocitosis ectópica de mucinas como MUC5B y MUC7 hacia la matriz extracelular en lugar del lumen de los acinos [101]. Los receptores TLR4 localizados en la membrana plasmática basal de células acinares reconocen a MUC5B como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), activando vías de señalización pro-inflamatorias e induciendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- α , IFN- β , IL-6 e IL-1 β [34]. Las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por las células epiteliales de las GS podrían atraer células inflamatorias contribuyendo a la cronicidad de la inflamación en las GS de pacientes con SS. En este contexto, MUC1 y TLR4 tendrían un rol clave en la promoción de la inflamación, lo que resalta la relevancia de comprender los mecanismos que llevan a su sobreexpresión y con esto encontrar nuevos puntos de intervención terapéutica que permitan restaurar los niveles de estas proteínas y con ello disminuir la inflamación y disfunción glandular.

Diversos mecanismos regulan los niveles de MUC1, tales como la unión a su promotor de factores de transcripción activados río abajo de citoquina pro-inflamatorias, como STATs y NF- κ B [102, 103], así como factores epigenéticos entre los que se incluyen la hipometilación de islas CpG de su promotor y la modificación de histonas [104, 105]. De la misma forma también se han descrito diversos mecanismos que regulan la expresión de TLR4, como elementos de respuesta a los factores de transcripción IRF4 e IRF8 en su promotor, o

niveles aumentados de traducción debido a niveles aumentados de m6A en su RNA mensajero [106]. Sumado a estos antecedentes, **los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p encontrados en GSL de pacientes con SS y su asociación a los niveles aumentados de transcrito de MUC1 y TLR4 en los mismos individuos, en conjunto con los ensayos funcionales en células HSG en dónde la modulación de los niveles del hsa-miR-145-5p alteran los niveles de MUC1 y TLR4, permiten sugerir un rol del hsa-miR-145-5p en la regulación de MUC1 y TLR4 que podría estar contribuyendo, en conjunto con otros mecanismos descritos previamente, a su sobreexpresión en SS.**

En esta tesis, se evaluaron los posibles mecanismos que podrían llevar a una disminución del hsa-miR-145-5p en GSL de pacientes con SS. Se ha reportado que la estimulación de macrófagos de ratón con LPS induciría la disminución del hsa-miR-145-5p de manera dependiente de IFNs I, ya que al utilizar macrófagos deficientes del receptor IFNAR o del factor de transcripción de IFNs I IRF3, se atenúa la disminución del miRNA [39]. Considerando la creciente evidencia que resalta el papel de los IFNs I en el inicio y progresión de esta patología [9], se procedió a evaluar un posible rol de esta citoquina en la regulación de los niveles de hsa-miR-145-5p. La detección de los niveles proteicos de IFNs I en muestras biológicas presenta un desafío y por lo general se utilizan métodos indirectos para inferir la presencia de IFNs I a través de la detección de sus efectos [107]. En este contexto, el análisis transcripcional de ISGs es el método más utilizado para demostrar la sobreexpresión de IFNs I en pacientes con distintas enfermedades autoinmunes [9]. **En esta tesis se encontraron niveles aumentados de transcrito de IFN- β y de los ISGs MX1, IFIT1, IFITM1, IFI44 e IFI44L en GSL de pacientes con SS.** La suma de los niveles de expresión estandarizados de cada ISG entrega **el puntaje de IFNs I de cada individuo, los cuales se encontraron aumentados en GSL de pacientes con SS.** Estos resultados, sumados a los niveles elevados de pJAK1 encontrados previamente en nuestro laboratorio en esta misma cohorte de pacientes [108], sugieren una sobreactivación de la vía de IFNs I, confirmando en estos individuos esta característica que está presente en un 50% a un 80% de los pacientes con SS [109].

Además, se encontró una **relación inversa entre los niveles de hsa-miR-145-5p con: los niveles de transcrito de IFN- β , el puntaje de IFNs I, la serología positiva de autoanticuerpos anti-Ro/SSA, anti-La/SSB y el score de foco.** Esto sugiere una asociación entre los parámetros clínicos que reflejan autoinmunidad e inflamación, la activación de la vía de IFNs I y la disminución del hsa-miR-145-5p. Estos resultados están en concordancia con la disminución del hsa-miR-145-5p reportada en contextos inflamatorios y autoinmunes que además tienen sobreactivación de la vía de IFNs I [107, 110], como por ejemplo en células T de pacientes con LES [21], biopsias de piel y fibroblastos de pacientes con ES [22], tejido sinovial de pacientes con AR [111] y biopsias de piel y suero de pacientes con psoriasis [112, 113]. Interesantemente, pacientes con esclerosis múltiple presentan niveles aumentados del hsa-miR-145-5p en sangre completa, sin embargo, el tratamiento

con IFN- β permite disminuir los niveles del miRNA a niveles similares al de individuos sanos, lo que sustenta la asociación inversa encontrada entre la activación de la vía de IFNs I y la disminución del hsa-miR-145-5p [114].

Las GSL de pacientes con SS presentan niveles elevados de diversas citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IFN- α e IFN- β , las cuales son producidas tanto por las células pro-inflamatorias que infiltran la glándula como por el componente epitelial que compone su parénquima [6, 48, 115]. Para determinar si las asociaciones encontradas entre los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p y la activación de la vía de IFNs I en GSL de pacientes con SS corresponden al efecto específico de esta citoquina, se estimularon células HSG con IFN- α e IFN- β . **Se encontró que células HSG estimuladas con IFNs I sobreexpresan los mismos ISGs encontrados aumentados en las GSL de pacientes con SS**, comprobándose la activación de esta vía en nuestro modelo *in vitro* de manera similar a lo observado en las GSL. Más importante aún, se encontró que **las células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β presentan disminución de los niveles de hsa-miR-145-5p y niveles aumentados de transcrito y proteína de MUC1 y TLR4**, replicando los hallazgos observados en GSL de pacientes con SS y respaldando el rol específico de los IFNs I en la modulación de los niveles de hsa-miR-145-5p, y en consecuencia de los niveles de sus blancos MUC1 y TLR4. Estos hallazgos están en concordancia con la disminución de este miRNA dependiente de IFNs I reportada previamente en macrófagos estimulados con LPS [39]

Los miRNAs están sujetos a estrictos mecanismos de control en su expresión, desde su biogénesis hasta su procesamiento y función. En esta línea, tanto IFN- α como IFN- β pueden modular los niveles de distintos miRNAs a través de diversos mecanismos. Se ha descrito, por ejemplo, que la estimulación de diversas líneas celulares con IFN- α puede aumentar los niveles del miR-21 a través de la promoción de la unión de los factores de transcripción STAT3 y p65 NF κ B al promotor del miRNA [116]. Por otra parte, se ha reportado que los IFNs I podrían alterar el procesamiento de los miRNAs una vez que ya han sido transcritos desde el genoma. Por ejemplo, se ha descrito que la estimulación con IFN- α de 3 líneas celulares distintas induce la disminución de los niveles proteicos de Dicer, proteína que procesa el *loop* de la horquilla de los pre-miRNA en el citoplasma para generar un dúplex que contiene al miRNA maduro [57]. Si bien en ese trabajo en particular no se evaluó el efecto que tiene en los niveles de miRNA maduro la disminución de Dicer producto de la estimulación con IFN- α , otros trabajos han evidenciado que mutaciones con pérdida de función de Dicer provocan la acumulación del pre-miRNA y la consecuente disminución de los niveles de miRNA maduro [117]. Más aún, también se ha reportado que la activación de la vía de IFNs I podría disminuir la interacción de diversos pri-miRNAs al complejo microprocesador [58]. Este complejo compuesto por las proteínas Drosha y DGCR8 procesa los extremos simple hebra de los pri-miRNA convirtiéndolos en pre-miRNA. Una disminución de la interacción entre el complejo microprocesador y el pri-miRNA genera una disminución de su procesamiento, provocando la

acumulación del pri-miRNA y una disminución de los niveles del miRNA maduro [58]. **En esta tesis se encontraron niveles significativamente aumentados del pri-miR-145 en GSL de pacientes con SS, los cuales correlacionaron de manera positiva con los niveles de transcrito de IFN- β y el puntaje de IFNs I.** Estos resultados sugieren una acumulación del pri-miRNA que podría tener su causa en una disminución de su procesamiento por activación de la vía de IFNs I.

Esta es la primera vez que se detecta un pri-miRNA en el SS y en enfermedades autoinmunes. Esto es un hallazgo de gran relevancia pues contribuye a dilucidar los mecanismos subyacentes a la disminución del hsa-miR-145-5p en GSL de pacientes con SS, y su posible asociación a alteraciones en su procesamiento. Además, la detección de estos precursores podría tener utilidad clínica como biomarcador o blanco terapéutico. En carcinoma hepatocelular se reportaron 24 pri-miRNA cuya eficiencia de procesamiento difiere de las muestras de hígado normal y que permitirían diferenciar ambas condiciones [118]. Inclusive recientemente Ji y colaboradores, desarrollaron un algoritmo que permite la detección de pri-miRNAs diferencialmente expresados a nivel de secuenciación de célula única y que permitió la detección de pri-miRNA diferencialmente expresados en cardiomiocitos infectados con SARS-CoV2 [119]. En las últimas décadas se han desarrollado terapias dirigidas a modular los niveles de miRNA maduros alterando el procesamiento de sus precursores de manera tejido-específica, como es el caso del pri-miR-451 para el tratamiento de enfermedad de Huntington (fase II de estudio clínico)[120]. Estos avances, en conjunto a los hallazgos realizados para el pri-miR-145 podría utilizarse a futuro con fines terapéuticos en el SS.

Para evaluar si los niveles aumentados de pri-miR-145 encontrados en GSL de pacientes con SS están asociados directamente a IFNs I, se determinaron los niveles de pri-miR-145 en células HSG estimuladas con IFN- α e IFN- β . Sin embargo, **no se logró cuantificar los niveles del pri-miR-145 en nuestro modelo *in vitro*.** Esto podría deberse, entre otras causas, al procesamiento diferencial de los pri-miRNA. Estudios iniciales sugerían que el procesamiento de los pri-miRNA sería co-transcripcional y estaría funcionalmente acoplado a la transcripción por la RNA Pol II, siendo diversos pri-miRNA nacientes procesados antes de incluso ser liberados del DNA templado [121, 122]. Esto podría estar mediado por el reclutamiento del complejo microprocesador a la cromatina por factores asociados a la cromatina como HP1BP3 [123] o la misma RNA Pol II [124]. Sin embargo, estudios posteriores en dónde se evaluó la cinética del procesamiento de distintos pri-miRNA en células completas revelaron que el procesamiento de pri-miRNAs puede ser tanto co-transcripcional como post-transcripcional, y que la cinética de este procesamiento varía desde rápido, intermedio a lento entre pri-miRNAs [125]. En esta misma línea, Conrad y colaboradores determinaron, a través de análisis transcriptómicos, que la eficiencia de procesamiento entre distintos pri-miRNA canónicos unidos a cromatina es altamente variable [56]. Si bien se han podido detectar pri-miRNAs específicos en modelos celulares, como

por ejemplo el pri-miR-25 en células HPDE6-C7 [126], el procesamiento diferencial que se ha reportado para distintos pri-miRNAs podría ser un factor que influya en la dificultad de detectar el pri-miR-145 en nuestro modelo *in vitro* en particular.

La asociación encontrada entre los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p y la activación de la vía de IFNs I en GSL de pacientes con SS, en conjunto con los experimentos *in vitro* en donde la estimulación de células HSG con IFN- α o IFN- β disminuyó los niveles de hsa-miR-145-5p, permiten sugerir un efecto específico de estas citoquinas en los niveles disminuidos del miRNA maduro que podría explicar, en conjunto a otros mecanismos su disminución en pacientes con SS. A pesar de la dificultad para detectar los niveles del pri-miR-145-5p en nuestro modelo *in vitro*, la relación observada entre los niveles aumentados del pri-miR-145 y la activación de la vía de IFNs I en los mismos individuos, en conjunto a los antecedentes de la literatura [58] permiten hipotetizar que la activación de esta vía podría disminuir el procesamiento del pri-miRNA, generando su acumulación y la disminución del miRNA maduro. Para explorar esta hipótesis, se caracterizaron los niveles de transcrito, proteína y localización celular de la maquinaria enzimática encargada de la modificación (METTL3 y METTL14) y remoción (ALKBH5 y FTO) de la marca epitranscriptómica m6A en pri-miRNAs, así como los niveles proteicos de la lectora que media sus funciones, hnRNPA2B1. Esto pues se ha descrito que esta modificación media el procesamiento de pri-miRNA al aumentar su interacción con el complejo microprocesador [59]. Además, alteraciones en los niveles de esta maquinaria enzimática, que resultan en una disminución de m6A en los pri-miRNA, generan una reducción en el reclutamiento del complejo microprocesador y, en consecuencia, una acumulación del precursor con una disminución de los niveles de miRNA maduro, como la observada en GSL de pacientes con SS [127-131]. **En esta tesis se encontraron niveles aumentados de transcrito de METTL3 y ALKBH5. Sin embargo, se encontraron niveles disminuidos de proteína de METTL3, FTO y hnRNPA2B1, que sugerirían que la maquinaria encargada de agregar la marca m6A, removerla y leerla se encuentra disminuida.**

Hasta la fecha se ha descrito una expresión diferencial de la maquinaria enzimática de m6A y la lectora hnRNPA2B1 en diversas enfermedades autoinmunes como LES [66, 132, 133], AR [65, 134, 135] y diabetes mellitus tipo 1 [136]. En SS se han realizado análisis de los niveles de esta maquinaria usando microarreglos y validación conjunta por RT-qPCR en PBMCs. En estos estudios se encontraron niveles aumentados de FTO y METTL3, pero se reportaron niveles contradictorios de ALKBH5, encontrándose tanto un aumento como una disminución de sus niveles de transcrito [137, 138]. En GSL solo se han realizado análisis de datos de microarreglos, sin la validación a través de RT-qPCR de los niveles de transcrito de estas enzimas, encontrándose niveles disminuidos de ALKBH5 y METTL3 [138, 139]. Por lo tanto, esta es la primera vez que en

GSL de pacientes con SS se caracterizan los niveles de transcrito y proteína de esta maquinaria enzimática asociada a m6A, así como de la lectora hnRNPA2B1.

Además, en esta tesis **se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de transcrito de METTL3 y ALKBH5 con parámetros clínicos como la presencia del autoanticuerpo anti-Ro/SSA y el score de foco**. Esto se encuentra en concordancia con las correlaciones clínicas encontradas entre los niveles de transcrito de estas enzimas y parámetros clínicos de AR y LES [65, 66, 132, 134] y lo observado en relación con los niveles de METTL3 y ALKBH5 en PBMCs de pacientes con SS, los cuales correlacionaron con características clínicas como los niveles de proteína C reactiva o con los niveles de sequedad ocular[137, 140]. Estos hallazgos sugieren una posible asociación entre estos indicadores que reflejan inflamación y autoinmunidad y los niveles de la maquinaria enzimática de m6A, pero además sugieren un rol relevante en la fisiopatología del SS.

Sumado a estos hallazgos, **se encontró que tanto las células acinares como inflamatorias de las GSL de pacientes con SS expresan METTL3, METTL14, FTO y ALKBH5**, siendo esta la primera vez que se caracteriza la localización de estas enzimas en estos individuos. La detección de marca inmunofluorescente en acinos permite confirmar la expresión de estas enzimas en este tipo celular, lo cual es de gran relevancia debido al rol de las células epiteliales en el inicio y progresión del SS [141]. Se requieren estudios adicionales para establecer si existen diferencias en la distribución de esta marca entre pacientes con SS e individuos controles, así como para determinar si las diferencias observadas al determinar los niveles proteicos a través de Western Blot corresponden a cambios en el componente inflamatorio y/o epitelial. Sin embargo, su localización principalmente nuclear permite hipotetizar que estas enzimas podrían tener un rol en la regulación de la metilación de pri-miRNAs en este contexto, ya que es un proceso que ocurre a nivel de este organelo.

Si bien los niveles de transcrito y proteína de METTL3 y los niveles de transcrito de ALKBH5 correlacionaron de manera significativa con la activación de la vía de IFNs I, así como con los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p en GSL pacientes con SS, **no se encontraron cambios significativos en los niveles de transcrito ni de proteína de METTL3, METTL14, ALKBH5, FTO ni hnRNPA2B1 en células HSG estimuladas con IFNs I**. Aunque FTO y ALKBH5 poseen elementos de respuesta al factor de transcripción STAT1 predichos en su promotor, ninguna de estas enzimas pose elementos ISRE, por lo que es probable que la sobreactivación de la vía de IFNs I no sea la principal responsable de la regulación de los niveles de estas enzimas, y los cambios observados en GSL de pacientes con SS se deban a la acción de otros mecanismos. Por ejemplo, tanto para METTL3 como para ALKBH5 se han reportado mecanismos de regulación transcripcionales como hipermetilación del promotor y modificaciones de histonas, así como mecanismos de regulación postranscripcionales como miRNAs y lncRNAs que afectan sus niveles [142, 143]. Por otra parte, se ha descrito

por ejemplo que la SUMOilación de METTL3 puede reprimir su actividad enzimática sin alterar su localización [144] , por lo que no se puede descartar un posible cambio en la actividad de estas enzimas por modificaciones postraduccionales que no fueron estudiadas en este trabajo y que podrían afectar la colocación o remoción de m6A en pri-miRNAs.

Por otra parte, también se caracterizaron los niveles de transcrito y proteína de la desaminasa ADAR1, ya que se ha reportado que la edición de pri-miRNAs por esta enzima altera el procesamiento de pri-miRNAs por el complejo microprocesador, generando la disminución de los niveles de miRNA maduro [145]. **En esta tesis se encontraron niveles aumentados de transcrito y proteína de la isoforma de ADAR1, ADAR1p150, sin cambios significativos en los niveles de la isoforma constitutiva.** En otras enfermedades autoinmunes como AR y LES se han encontrado niveles aumentados de la isoforma ADAR1p50 sin cambios en la isoforma constitutiva en tejido sinovial o linfocitos T [70, 71]. En SS se ha encontrado que ADAR1 total está sobreexpresada a través de microarreglos realizados en PBMCs[49] y GSL [53], sin embargo, esta es la primera vez que se caracteriza de manera separada los niveles de transcrito y proteína estas isoformas. Además, se encontró una **correlación significativa entre los niveles de transcrito de ADAR1p150 con la presencia del autoanticuerpo anti-Ro/SSA y el score de foco.** Estos hallazgos sugieren una posible asociación entre estos parámetros clínicos que reflejan inflamación y autoinmunidad y los niveles de ADAR1p150, reflejando un posible rol en la fisiopatología del SS, como se encontró en AR en dónde los niveles de edición generados por niveles aumentados de esta isoforma se asocian a la respuesta a tratamiento y a la expresión de marcadores de inflamación [70]

También **se encontró que tanto las células acinares como inflamatorias de las GSL de pacientes con SS expresan ADAR1,** siendo esta la primera vez que se caracteriza la localización de estas enzimas en estos individuos. Si bien a través de esta técnica no se puede diferenciar una isoforma de la otra, la detección de marca inmunofluorescente en acinos permite confirmar la expresión de estas enzimas en este tipo celular, y su localización nuclear permite hipotetizar que estas enzimas podrían tener un rol en la regulación de la metilación de pri-miRNAs en este contexto, ya que es un proceso que ocurre a nivel de este organelo.

El aumento en los niveles de transcrito de ADAR1p150 correlacionó de manera significativa tanto con la activación de la vía de IFNs I, así como con la disminución del hsa-miR-145-5, sugiriendo una posible asociación entre estos hallazgos. A diferencia de lo ocurrido con la maquinaria m6A, **al estimular células HSG con IFNs I si se encontró un aumento en los niveles de transcrito y proteína de la isoforma ADAR1p150,** reproduciendo los hallazgos realizados en GSL de paciente con SS. Esto sugiere un rol de esta citoquina en la modulación de los

niveles de esta isoforma y que podría deberse a los elementos ISRE encontrados en el promotor de ADAR1p150 y de los que carecen los 2 promotores de la isoforma ADAR1p110 [84] ([Figura 2](#))

Para evaluar el rol de la isoforma ADAR1p150 en los niveles de hsa-miR-145-5p, se silenció de manera específica a través de siRNA en células HSG estimuladas con IFNs I. **Los resultados evidenciaron que la disminución en los niveles de transcrito de esta isoforma producto del silenciamiento con siRNA recupera los niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p inducidos por IFNs I y favorece la disminución de sus blancos MUC1 y TLR4, aunque para MUC1 estos cambios no fueron estadísticamente significativos.** Los niveles de hsa-miR-145-5p pueden ser regulados por diversos mecanismos tanto a nivel transcripcional como postracripcionales. Estos incluyen, por ejemplo, el aumento en la metilación del promotor del hsa-miR-145-5p [146] o la disminución de la interacción de factores de transcripción como p53 con elementos de respuesta presentes en el promotor del hsa-miR-145-5p [147]. También se incluyen interacciones con lncRNAs como PCAT y PVT1 que actúan como esponjas del hsa-miR-145-5p [92, 111]. Sin embargo, estos mecanismos no explicarían por completo los niveles aumentados de pri-miR145 encontrados en GSL de pacientes con SS que sugieren una disminución en su procesamiento. Por otra parte, se han reportado alteraciones en el procesamiento del pri-miR-145 debido a la interacción de p68 con el complejo microprocesador, sin embargo, este mecanismo favorece el procesamiento del pri-miR-145, disminuyendo sus niveles y favoreciendo el aumento del miRNA maduro [148]. Se ha reportado que ADAR1 puede disminuir los niveles de determinados miRNAs maduros a través del aumento de ediciones de adenosina por inosina en su pri-miRNA que impiden el reconocimiento por DGCR8 [149] Sin embargo, también se han descrito efectos independientes de la actividad editora de esta enzima en donde la interacción de ADAR1 con el pri-miRNA impide el procesamiento por el complejo microprocesador [150]. Ambos mecanismos llevan a una acumulación del pri-miRNA y a la consecuente disminución del miRNA maduro, similar a lo observado en GSL de pacientes con SS para el hsa-miR-145-5p. Si bien experimentos adicionales son necesarios para evaluar el mecanismo específico involucrado en esta vía debido a la incapacidad de detectar el pri-miRNA en células HSG, estos hallazgos permiten sugerir un rol de ADAR1p150 en la disminución mediada por IFNs I del hsa-miR-145-5p, y que podría estar asociado a alteraciones en el procesamiento de este precursor, lo que explicaría los niveles aumentados de pri-miR-145 encontrados en GSL de pacientes con SS.

La tendencia a la disminución de los blancos del hsa-miR-145-5p, MUC1 y TLR4, al silenciar ADAR1p150 y recuperar los niveles del miRNA sugiere el rol de hsa-miR-145-5p en la regulación de estas moléculas y realza la importancia de su estudio para abrir nuevas posibilidades de tratamiento e intervención terapéutica para pacientes con SS. Esto, ya que durante la última década se han descrito diversos mecanismos que permiten reestablecer los niveles de miRNAs en los tejidos de manera específica. Entre estos mecanismos se encuentran

tanto la entrega de miRNAs *mimic* o *inhibitor* de manera célula específica a través de partículas lipídicas o vectores virales y la modificación del procesamiento a través de moléculas pequeñas y la transferencia de precursores como pri-miRNAs [120]. Varias de estas terapias se encuentran en fase I o II de estudios clínicos [120] Inclusive para el caso particular del hsa-miR-145 se han descrito ensayos muy preliminares de extractos naturales como el *Geniposide* que permiten aumentar los niveles de este miRNA, lo que trae como consecuencia una disminución de marcadores inflamatorio en modelos celulares [151], así como la transferencia a través de liposomas del hsa-miR-145 en psoriasis [152]. Además, el estudio de los mecanismos que llevan a su disminución es relevante, ya que permitirían escoger la terapia más adecuada. Esto ya que, en este caso en particular, la transferencia de pri-miRNAs o la inducción de la transcripción a través de fármacos no tendrían utilidad ya que las alteraciones en el procesamiento seguirían manteniendo los niveles de hsa-miR-145-5p disminuidos.

Una tarea futura para concretar corresponde realizar estudios que permitan detectar el hsa-miR-145-5p y el pri-miR-145 en los distintos tipos celulares que componen las GSL (incluido células epiteliales e inflamatorias), a través de, por ejemplo, *hibridación in situ*. Esto permitiría, además de evaluar la contribución de los niveles alterados de estos RNAs en cada tipo celular, la determinación de los compartimentos celulares en los cuales se podría estar acumulando el pri-miR-145. También es necesario determinar los mecanismos a través de los cuales ADAR1p150 podría estar contribuyendo a la disminución de los niveles del hsa-miR-145-5p, así como evaluar sus niveles proteicos luego del silenciamiento con siRNA. No obstante, los hallazgos obtenidos permiten proponer un modelo en donde niveles elevados de IFNs I y la sobreactivación de su vía inducen un aumento de la isoforma de ADAR1 ADAR1p150. Esta isoforma disminuiría el procesamiento del pri-miR-145 debido a ediciones en su secuencia o interacciones que impiden el reconocimiento por el complejo microprocesador, generando su acumulación y la disminución de los niveles del miRNA maduro. Niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p contribuirían a los niveles elevados de MUC1 y TLR4, lo que a su vez favorecería la perpetuación del estado inflamatorio y disfunción glandular (**Figura 30**).

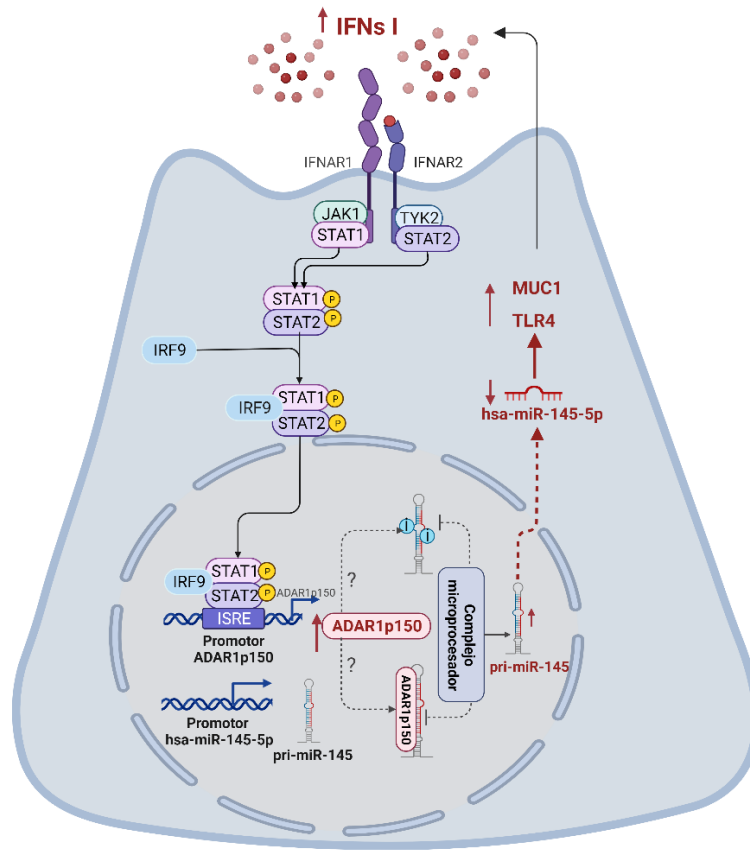


Figura 30. Mecanismo propuesto para la regulación postranscripcional del hsa-miR-145-5p a través de la modulación dependiente de IFNs I de ADAR1p150 y su rol en la modulación de MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS. Niveles aumentados de IFNs I inducen una sobreactivación de esta vía en GSL de pacientes con SS a través de la dimerización de las subunidades del receptor de IFNs I (IFNAR) y la activación de las tirosinas quinasas citoplasmáticas asociadas al receptor JAK1 y TYK2. La activación de estas tirosinas quinasas inducen el reclutamiento y fosforilación de las proteínas transductoras STAT1 y STAT2. Ambas proteínas se liberan del receptor y se unen a IRF9 para formar un complejo denominado ISGF3. ISGF3 se une a secuencias consenso denominadas ISRE en promotores de genes inducidos por IFN I o ISGs como ADAR1p150, induciendo su transcripción. Niveles aumentados de ADAR1p150 podrían desaminar las adeninas del pri-miR-145 e impedir el clivaje por el complejo microprocesador o unirse al pri-miRNA e impedir su procesamiento de manera independiente de su actividad enzimática. El procesamiento disminuido del pri-miR-145 provocaría su acumulación y la consecuente disminución del miRNA maduro hsa-miR-145-5p. Finalmente, niveles disminuidos del hsa-miR-145-5p contribuyen a la sobreexpresión de MUC1 y TLR4, favoreciendo la perpetuación de la inflamación y disfunción glandular. En líneas enteras rojas y letras rojas se muestra los resultados obtenidos en esta tesis en dónde se pudo demostrar causalidad. En líneas rojas punteadas se muestra resultados de esta tesis, pero para los cuales solo se ha observado asociación. En signo de pregunta se describen mecanismos posibles para el rol de ADAR1p150 en la regulación de miRNAs descritos en la literatura pero que no se estudiaron esta tesis. Líneas negras muestran procesos descritos en la literatura. Creado con Biorender.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que los niveles aumentados de IFNs I y la sobreactivación de su vía inducen una disminución de los niveles de hsa-miR-145-5p maduros. Esta podría estar asociada a alteraciones en el procesamiento del pri-miR-145 producto del aumento de ADAR1p150 y tiene como consecuencia el contribuir a la sobreexpresión de MUC1 y TLR4. De esta forma, se confirma la hipótesis propuesta en esta tesis. Estos resultados contribuyen a aumentar el conocimiento acerca de los mecanismos mediante los cuales los IFNs I, a través de la regulación del hsa-miR-145-5p, contribuirían a la disfunción glandular. Esto abre nuevas opciones de blancos de intervención terapéutica que en un futuro permitirían restablecer los niveles de proteínas como MUC1 y TLR4, para disminuir la inflamación glandular y con esto, mejorar la calidad de vida de los pacientes con SS.

PROYECCIONES

Los resultados de esta tesis han permitido aumentar la comprensión de los mecanismos asociados a la disminución del hsa-miR-145-p y como esta disminución puede contribuir en la sobreexpresión de blancos de alta relevancia en la enfermedad, como MUC1 y TLR4 en GSL de pacientes con SS. Pero además han surgido nuevas preguntas que intentaremos responder para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis del SS.

Para determinar el mecanismo por el cual ADAR1p150 modula los niveles del hsa-miR-145-5p de manera dependiente de los interferones tipo I (IFNs I), resultaría interesante emplear estrategias experimentales que permitan secuenciar el pri-miR-145 en células estimuladas con IFNs I, con el propósito de evaluar si se producen cambios de adenosinas a inosinas. En caso contrario, si esto se debe a efectos de interacción de esta isoforma del pri-miRNA, se podría llevar a cabo una inmunoprecipitación de RNA (RIP) utilizando anticuerpos dirigidos contra ADAR1, a fin de detectar el pri-miR-145 en el inmunoprecipitado.

Por otra parte, realizar una hibridación in situ del pri-miR-145 en conjunto a inmunofluorescencia para detectar ADAR1 nos permitiría determinar en qué compartimiento glandular (epitelial o inflamatorio) está ocurriendo la acumulación del pri-miR-145 y si esta ubicación se condice con la localización de ADAR1.

Finalmente, considerando las diversas estrategias desarrolladas para modificar selectivamente los niveles de miRNAs y pri-miRNAs en tejidos específicos, sería interesante evaluar el efecto de la modulación de estos oligonucleótidos en las glándulas salivales de modelos murinos de SS, con el fin de determinar si se reducen los niveles de sus blancos MUC1 y TLR4, y si esto se traduce en una disminución de la inflamación y disfunción glandular.

PRODUCTOS GENERADOS

Publicaciones

- **Jara D***, Carvajal P, Castro I, Barrera MJ, Aguilera S, González S, Molina C, Hermoso M, Soto R and González MJ. Type I IFNs dependent ADAR1p150 overexpression modulate hsa-miR-145-5p downregulation in Sjögren's syndrome patients (manuscrito en preparación)
- Núñez M*, Carvajal P*, Aguilera S, Barrera MJ, Matus S, Couto A, Landoni M, Boncompain G, **Jara D**, Indo S, Figueroa L, González S, Molina C, González MJ and Castro I. Giantin mediates Golgi localization of Gal3-O-sulfotransferases and affects mucin sulfation in Sjögren's syndrome patients. (Manuscrito en revision JCI Insight, 2023).
- Carvajal P, Aguilera S, **Jara D**, Indo S, Barrera MJ, González S, Molina C, Heathcote B, Hermoso M, Castro I and González MJ. hsa-miR-424-5p and hsa-miR-513c-3p dysregulation mediated by IFN- γ is associated with salivary gland dysfunction in Sjögren's syndrome patients. *J Autoimmun.* 2023 Jul;138:103037. doi: 10.1016/j.jaut.2023.103037. (ISI: 14,51)
- Patricia Carvajal*, Verónica Bahamondes*, **Daniela Jara***, Isabel Castro, Soledad Matus, Sergio Aguilera, Claudio Molina, Sergio González, María-José Barrera, María-Julieta González. The integrated stress response is activated in the salivary glands of Sjögren's syndrome patients *Front Med (Lausanne)* 2023 Mar 23;10:1118703. doi: 10.3389/fmed.2023.1118703. eCollection 2023 (ISI: 5,058)
- Castro I*, Carvajal P*, **Jara D**, Aguilera S, Heathcote B, Barrera MJ, Aliaga-Tobar V, Maracaja-Coutinho V, Urzúa U, Quest A, González S, Molina C, Hermoso M, González MJ. Small RNA expression profiling reveals hsa-miR-181d-5p downregulation associated with TNF- α overexpression in Sjögren's syndrome patients. *Frontiers in Immunology.*2022 13:870094.doi: 10.3389/fimmu.2022.870094 (ISI: 8,787)
- Barrera MJ, Aguilera S, Castro I, Carvajal P. **Jara D**, Molina C, González S, González MJ. Dysfunctional mitochondria as critical players in the inflammation of autoimmune diseases: potential role in Sjögren's syndrome. *Autoimmunity reviews.* 2022 102867. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102867 (ISI: 17,39)
- **Jara D***, Carvajal P*, Castro I, Barrera MJ, Aguilera S, González S, Molina C, Hermoso M and González MJ. Type I Interferon Dependent hsa-miR-145-5p Downregulation Modulates MUC1 and TLR4 Overexpression in Salivary Glands. From Sjögren's Syndrome Patients. *Frontiers in Immunology.* 2021 12:685837. doi: 10.3389/fimmu.2021.685837 (ISI: 8,787).
- Barrera MJ, Aguilera S, Castro I, Matus S, Carvajal P, Molina C, Gonzalez S, **Jara D**, Hermoso M and González MJ. Tofacitinib counteracts IL-6 overexpression induced by deficient autophagy: Implications in Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2020. Doi: 10.1093/rheumatology/keaa670 (ISI: 7,046)
- Castro I, Albornoz N, Aguilera S, Barrera MJ, González S, Núñez M, Carvajal P, **Jara D**, Lagos C, Molina C, Urzúa U, Hermoso MA, González MJ. Aberrant MUC1 accumulation in salivary glands of Sjögren's syndrome patients is reversed by TUDCA in vitro. *Rheumatology (Oxford.* 2020 Apr 1;59(4):742-753. doi: 10.1093/rheumatology/kez316 (ISI: 7,046).
- Lagos C*, Carvajal P*, Castro I*, **Jara D**, González S, Aguilera S, Barrera MJ, Quest AFG, Bahamondes V, Molina C, Urzúa U, Hermoso MA, Leyton C, González MJ. Association of high 5-hydroxymethylcytosine levels with Ten Eleven Translocation 2 overexpression and inflammation in Sjögren's syndrome patients. *Clinical Immunology* 196 (2018) 85–96 doi:10.1016/j.clim.2018.06.002 (ISI: 10,19).

Presentaciones a congresos internacionales

- **D. Jara**, S. Aguilera, P. Carvajal, I. Castro, MJ. Barrera, S. González, C. Molina, R. Soto and MJ. González. Altered expression of RNA methylation and deamination enzymes in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. Annual XXXVII European Congress of Rheumatology (EULAR) Junio 2023. First Published: *Ann Rheum Dis*: as 10.1136/annrheumdis-2023-eular.595 on 30 May 2023 (ISI: 28,003)

- P. Carvajal*, V. Bahamondes, **D. Jara**, MJ. Barrera, I. Castro, S. Aguilera, S. González, C. Molina, MJ. González. Activation of the cellular integrated stress response in labial salivary glands from Sjögren's syndrome patients. Annual XXXVI European Congress of Rheumatology (EULAR) Junio 2022. DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.313 Published in Ann Rheum Dis: first as 10.1136/annrheumdis-2022-eular.313 on 23 May 2022 (ISI: 28,003)
- MJ. Barrera*, I. Castro, P. Carvajal, S. Aguilera, **D. Jara**, S. González, C. Molina, MJ. González. Tofacitinib decreases inflammatory markers and mitochondrial morphological damage in salivary glands of a murine model of Sjögren's syndrome. Annual XXXVI European Congress of Rheumatology (EULAR) Junio 2022. Published in Ann Rheum Dis: first as DOI: 10.1136/annrheumdis-2022-eular.2110. on 23 May 2022 (ISI: 28,003)
- **D. Jara**, S. Aguilera, P. Carvajal, I. Castro, MJ. Barrera, S. González, C. Molina, MJ. González. Type I interferon dependent hsa-miR-145-5p downregulation modulates MUC1 and TLR4 overexpression in salivary glands from primary Sjögren's syndrome patients. D. Annual XXXV European Congress of Rheumatology (EULAR) Junio 2021, e-congress. First published Ann Rheum Dis: as 10.1136/annrheumdis-2021-eular.2651 on 19 May 2021 (ISI: 28.003)
- P. Carvajal, S. Aguilera, B. Heathcote, I. Castro, **D. Jara**, MJ. Barrera, V. Maracaja-Coutinho, V. Aliaga-Tobar, S. González, C. Molina and MJ. González. Overexpression of hsa-miR-513c-3p decreases XBP-1s correlating with increased inflammation and autoantibodies in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. Annual XXXIV European Congress of Rheumatology (EULAR) Junio 2020, e-congress. First published Ann Rheum Dis: as 10.1136/annrheumdis-2020-eular.2215 on May 2020 (ISI: 28.003)
- P. Carvajal, S. Aguilera, MJ. Barrera, C. Lagos, I. Castro, S. González, **D. Jara**, C. Molina and MJ. González. Promoter DNA methylation and hsa-miR-424-5p levels regulate ATF6alpha expression in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Annual XXXIII European Congress of Rheumatology (EULAR) 12-15 junio 2019, Madrid, España. First published Ann Rheum Dis: as 10.1136/annrheumdis-2019-eular.4712 on May 2019 (ISI: 28.003).
- Barrera MJ, Aguilera S, Carvajal P, Castro I, González S, Molina C, Matus S, **Jara D**, and González MJ. Decreased autophagy in salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients could be associated with an increased expression of inflammatory markers. Annual XXXIII European Congress of Rheumatology (EULAR) 12-15 junio 2019, Madrid, España. First published Ann Rheum Dis: as 10.1136/annrheumdis-2019-eular.4740 on May 2019 (ISI: 28.003).
- Castro I, Nuñez M, Aguilera S, Barrera MJ, González S, Carvajal P, **Jara D**, Molina C, Urzúa U, González MJ. Giantin mislocation may affect the destination of golgi enzymes in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. GlycoAR 3° Simposio argentino de Glicobiología 8-10 mayo 2019, Buenos Aires, Argentina. Poster
- Barrera MJ, Aguilera S, Carvajal P, Castro I, González S, Molina C, Matus S, **Jara D**, González MJ. Tofacitinib Inhibits Increased Inflammatory Marker Expression in a Human Salivary Cell Line Deficient in Autophagy: A Model of Sjögren's Syndrome. ACR/ARP Annual Meeting, 8-13 de noviembre 2019, Atlanta, GA, USA. Arthritis Rheumatol.2019; 71 (suppl 10). Accessed December 18, 2019. Published in Arthritis Rheumatol.2019; 71 (suppl 10). Accessed December 18, 2019. (ISI: 15.483)

Presentaciones a congresos nacionales

- Patricia Carvajal, Verónica Bahamondes, **Daniela Jara**, Isabel Castro, María-José Barrera, Soledad Matus, Sergio Aguilera, Claudio Molina, Sergio González, María-Julieta González. Altered expression of the Integrated Stress Response components in salivary glands of Sjögren's syndrome patients. XXXIV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 12-16 Diciembre 2022, Puerto Varas, Chile.
- **Daniela Jara**, Patricia Carvajal, Isabel Castro, María-José Barrera, Sergio Aguilera, Sergio González, Claudio Molina, Ricardo Soto, María-Julieta González. Altered expression of RNA methylation and

- deamination enzymes in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. XXXIV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 12-16 Diciembre 2022, Puerto Varas, Chile.
- María-José Barrera, Patricia Carvajal, Salvador Campos, **Daniela Jara**, Isabel Castro, Sergio Aguilera, Claudio Molina, Sergio González, María-Julieta González. Dysfunctional mitochondria and increased pattern-recognition receptors expression in Sjögren's syndrome patients. XXXIV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 12-16 Diciembre 2022, Puerto Varas, Chile.
 - Patricia Carvajal, Sergio Aguilera, **Daniela Jara**, Sebastián Indo, Isabel Castro, María José Barrera, Sergio González, Claudio Molina, María Julieta González. hsa-miR-424-5p and hsa-miR-513c-3p dysregulation mediated by IFN-g is associated with altered cellular proteostasis related with salivary gland dysfunction in Sjögren's syndrome patients. XXXIV Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 12-16 Diciembre 2022, Puerto Varas, Chile.
 - Barrera MJ, Carvajal P, Castro I, **Jara D**, Gonzalez S, Gonzalez MJ. Jak-inhibitor ameliorates salivary mitochondrial alterations in Sjögren's syndrome mice. XXXIV Reunión Annual International Association for Dental Research División Chilena 03-05 Noviembre 2022, Santiago, Chile..
 - **D. Jara.**, Carvajal P., Aguilera S., Castro I., Barrera M.J., González S., Molina C. and González M.J. Type I interferon dependent hsa-miR-145-5p downregulation modulates MUC1 and TLR4 overexpression in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. colloquium series in cell biology: young investigators" 29 Noviembre – 1° Diciembre, 2021.
 - Patricia Carvajal, Sergio Aguilera, **Daniela Jara**, Isabel Castro, María José Barrera, Maracaja-Coutinho V, Aliaga-Tobar V, Sergio González, Claudio Molina, Benjamín Heathcote and María Julieta González. hsa-miR-424-5p levels regulate ATF6 α expression in salivary glands of primary Sjögren's syndrome patients. XXXIII Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 25-29 noviembre 2019, Puerto Varas, Chile.
 - **Jara D**, Carvajal P, Aguilera S, Barrera MJ, Castro I, Nuñez M, Heathcote B, González S, Molina, C and González MJ. miR-145-5p modulate MUC1 and TLR4 overexpression in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. XXXIII Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 25-29 noviembre 2019, Puerto Varas, Chile.
 - Benjamin Heathcote, Patricia Carvajal, Sergio Aguilera, **Daniela Jara**, Isabel Castro, María-José Barrera, Sergio González, Claudio Molina, Matilde Nuñez and María Julieta González. Overexpression of hsa-miR-513c-3p contributes to IFN- γ -mediated IRE1 α /XBP1 pathway inhibition by targeting XBP1 in salivary glands from patients with Sjögren's Syndrome. XXXIII Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 25-29 noviembre 2019, Puerto Varas, Chile.
 - Matilde Nuñez, Isabel Castro, Soledad Matus, Sergio Aguilera, María José Barrera, Patricia Carvajal, **Daniela Jara**, Benjamín Heathcote, Sergio González, Claudio Molina and María Julieta González. Giantin forms complexes with Gal3-O-sulfotransferase enzymes of the Golgi apparatus in salivary gland epithelial cells. XXXIII Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 25-29 noviembre 2019, Puerto Varas, Chile.
 - Isabel Castro, Matilde Nuñez, Sergio Aguilera, María José Barrera, Patricia Carvajal, **Daniela Jara**, Benjamín Heathcote, Sergio González, Claudio Molina and María Julieta González. CRISPR editing of GOLGB1 gene reproduced the altered localization of Giantin observed in labial salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. XXXIII Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 25-29 noviembre 2019, Puerto Varas, Chile.
 - María-José Barrera, Sergio Aguilera, Soledad Matus, Isabel Castro, Patricia Carvajal, **Daniela Jara**, Sergio González, Claudio Molina, and María-Julieta González Altered autophagy in Sjögren's syndrome patients is associated with increased pro-inflammatory markers expression. XXXIII Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology 25-29 noviembre 2019, Puerto Varas, Chile.

REFERENCIAS

- [1] C. P. Mavragani, H. M. Moutsopoulos. Sjögren's syndrome. *Annu Rev Pathol*, 2014;9:273-85.
- [2] I. Castro, D. Sepúlveda, J. Cortés, A. F. Quest, M. J. Barrera, V. Bahamondes S. Aguilera, U. Urzúa, C. Alliende, C. Molina, S. González, M. A. Hermoso, C. Leyton, M. J. González. Oral dryness in Sjögren's syndrome patients. Not just a question of water. *Autoimmun Rev*, 2013;12:567-74.
- [3] G. Cafaro, C. Croia, O. D. Argyropoulou, M. C. Leone, M. Orlandi, F. Finamore, A. Cecchetti, F. Ferro, C. Baldini, E. Bartoloni. One year in review 2019: Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 2019;37 Suppl 118:3-15.
- [4] O. D. Argyropoulou, A. G. Tzioufas. Update on Sjögren's Syndrome 2018. *Mediterr J Rheumatol*, 2018;29:193-8.
- [5] J.-M. Anaya, P. A. Correa, García-Carrasco, M., Cervera, R. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. Corporación para investigaciones biológicas, Medellín, Colombia; 2005.
- [6] P. Oxholm, T. E. Daniels, K. Bendtzen. Cytokine expression in labial salivary glands from patients with primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity*, 1992;12:185-91.
- [7] P. C. Fox, M. Brennan, P. Di Sun. Cytokine expression in human labial minor salivary gland epithelial cells in health and disease. *Arch Oral Biol*, 1999;44 Suppl 1:S49-52.
- [8] N. Roescher, P. P. Tak, G. G. Illei. Cytokines in Sjögren's syndrome. *Oral Dis*, 2009;15:519-26.
- [9] N. Del Papa, A. Minniti, M. Lorini, V. Carbonelli, W. Maglione, F. Pignataro, N. Montano, R. Caporali, Cl. Vitali. The Role of Interferons in the Pathogenesis of Sjögren's Syndrome and Future Therapeutic Perspectives. *Biomolecules*, 2021;11.
- [10] C. P. Mavragani, H. M. Moutsopoulos. The geoepidemiology of Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev*, 2010;9:A305-10.
- [11] J. O'Brien, H. Hayder, Y. Zayed, C. Peng. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018;9:402.
- [12] R. M. O'Connell, D. S. Rao, D. Baltimore. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, 2012;30:295-312.
- [13] S. Cha, M. Mona, K. E. Lee, D. H. Kim, K. Han. MicroRNAs in Autoimmune Sjögren's Syndrome. *Genomics Inform*, 2018;16:e19.
- [14] M. Ha, V. N. Kim. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014;15:509-24.
- [15] T. Treiber, N. Treiber, G. Meister. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019;20:5-20.
- [16] M. Reale, C. D'Angelo, E. Costantini, M. Laus, A. Moretti, A. Croce. MicroRNA in Sjögren's Syndrome: Their Potential Roles in Pathogenesis and Diagnosis. *J Immunol Res*, 2018;2018:7510174.
- [17] J. Imgenberg-Kreuz, J. K. Sandling, G. Nordmark. Epigenetic alterations in primary Sjögren's syndrome - an overview. *Clin Immunol*, 2018;196:12-20.
- [18] J. R. Pekow, U. Dougherty, R. Mustafi, H. Zhu, M. Kocherginsky, D. T. Rubin . miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes. *Inflamm Bowel Dis*, 2012;18:94-100.
- [19] L. O'Leary, K. Sevinç, I. M. Papazoglou, B. Tildy, K. Detillieux, A. J. Halayko, K.F Chung, M.M Perry. Airway smooth muscle inflammation is regulated by microRNA-145 in COPD. *FEBS Lett*, 2016;590:1324-34.
- [20] P. M. Das, R. Singal. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, 2004;22:4632-42.
- [21] M. C. Lu, N. S. Lai, H. C. Chen, H. C. Yu, K. Y. Huang, C. H. Tung, H.B. Huang, C. L. Yu. Decreased microRNA(miR)-145 and increased miR-224 expression in T cells from patients with systemic lupus erythematosus involved in lupus immunopathogenesis. *Clin Exp Immunol*, 2013;171:91-9.
- [22] H. Zhu, Y. Li, S. Qu, H. Luo, Y. Zhou, Y. Wang, H. Zhao, Y. You, X. Xiao, X. Zuo. MicroRNA expression abnormalities in limited cutaneous scleroderma and diffuse cutaneous scleroderma. *J Clin Immunol*, 2012;32:514-22.

- [23] Z. Cai, W. Xiang, X. Peng, Y. Ding, W. Liao, X. He. MicroRNA-145 Involves in the Pathogenesis of Renal Vascular Lesions and May Become a Potential Therapeutic Target in Patients with Juvenile Lupus Nephritis. *Kidney Blood Press Res*, 2019;44:643-55.
- [24] Y. Ding, W. Liao, Z. Yi, W. Xiang, X. He. Association of miRNA-145 expression in vascular smooth muscle cells with vascular damages in patients with lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015;8:12646-56.
- [25] J. Wang, S. Zheng, N. Xin, C. Dou, L. Fu, X. Zhang *et al.* Identification of novel MicroRNA signatures linked to experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis: down-regulated miR-145 promotes pathogenetic Th17 cell response. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013;8:1287-302.
- [26] B. Stypinska, A. Wajda, E. Walczuk, M. Olesinska, A. Lewandowska, M. Walczyk *et al.* The Serum Cell-Free microRNA Expression Profile in MCTD, SLE, SSc, and RA Patients. *J Clin Med*, 2020;9.
- [27] Y. Chen, X. Wang, M. Yang, W. Ruan, W. Wei, D. Gu *et al.* miR-145-5p Increases Osteoclast Numbers In Vitro and Aggravates Bone Erosion in Collagen-Induced Arthritis by Targeting Osteoprotegerin. *Med Sci Monit*, 2018;24:5292-300.
- [28] H. B. Søndergaard, D. Hesse, M. Krakauer, P. S. Sørensen, F. Sellebjerg. Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 2013;19:1849-57.
- [29] R. Gandhi, B. Healy, T. Gholipour, S. Egorova, A. Musallam, M. S. Hussain *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 2013;73:729-40.
- [30] I. Alevizos, S. Alexander, R. J. Turner, G. G. Illei. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, 2011;63:535-44.
- [31] J. Q. Chen, G. Papp, S. Póliska, K. Szabó, T. Tarr, B. L. Bálint *et al.* MicroRNA expression profiles identify disease-specific alterations in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *PLoS One*, 2017;12:e0174585.
- [32] I. Castro, P. Carvajal, D. Jara, S. Aguilera, B. Heathcote, M. J. Barrera *et al.* Small RNA Expression Profiling Reveals hsa-miR-181d-5p Downregulation Associated With TNF- α Overexpression in Sjögren's Syndrome Patients. *Front Immunol*, 2022;13:870094.
- [33] H. H. Sung, I. Castro, S. González, S. Aguilera, N. I. Smorodinsky, A. Quest *et al.* MUC1/SEC and MUC1/Y overexpression is associated with inflammation in Sjögren's syndrome. *Oral Dis*, 2015;21:730-8.
- [34] M. J. Barrera, S. Aguilera, E. Veerman, A. F. Quest, D. Díaz-Jiménez, U. Urzúa *et al.* Salivary mucins induce a Toll-like receptor 4-mediated pro-inflammatory response in human submandibular salivary cells: are mucins involved in Sjögren's syndrome? *Rheumatology (Oxford)*, 2015;54:1518-27.
- [35] I. Castro, N. Albornoz, S. Aguilera, M. J. Barrera, S. González, M. Núñez *et al.* Aberrant MUC1 accumulation in salivary glands of Sjögren's syndrome patients is reversed by TUDCA in vitro. *Rheumatology (Oxford)*, 2020;59:742-53.
- [36] L. M. Herbert, J. F. Grosso, M. Dorsey, T. Fu, I. Keydar, M. A. Cejas *et al.* A unique mucin immunoenhancing peptide with antitumor properties. *Cancer Res*, 2004;64:8077-84.
- [37] S. Cascio, L. Zhang, O. J. Finn. MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- κ B p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain. *J Biol Chem*, 2011;286:42248-56.
- [38] T. Zeinali, B. Mansoori, A. Mohammadi, B. Baradaran. Regulatory mechanisms of miR-145 expression and the importance of its function in cancer metastasis. *Biomed Pharmacother*, 2019;109:195-207.
- [39] L. Lin, J. Hou, F. Ma, P. Wang, X. Liu, N. Li *et al.* Type I IFN inhibits innate IL-10 production in macrophages through histone deacetylase 11 by downregulating microRNA-145. *J Immunol*, 2013;191:3896-904.
- [40] N. Marketos, I. Cinoku, A. Rapti, C. P. Mavragani. Type I interferon signature in Sjögren's syndrome: pathophysiological and clinical implications. *Clin Exp Rheumatol*, 2019;37 Suppl 118:185-91.
- [41] I. L. A. Bodewes, A. Björk, M. A. Versnel, M. Wahren-Herlenius. Innate immunity and interferons in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2019.

- [42] G. D. Kalliolias, L. B. Ivashkiv. Overview of the biology of type I interferons. *Arthritis Res Ther*, 2010;12 Suppl 1:S1.
- [43] A. N. Theofilopoulos, R. Baccala, B. Beutler, D. H. Kono. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*, 2005;23:307-36.
- [44] G. Schreiber, J. Piehler. The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. *Trends Immunol*, 2015;36:139-49.
- [45] T. L. W. Muskardin, T. B. Niewold. Type I interferon in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2018;14:214-28.
- [46] U. Båve, G. Nordmark, T. Lövgren, J. Rönnelid, S. Cajander, M. L. Eloranta *et al.* Activation of the type I interferon system in primary Sjögren's syndrome: a possible etiopathogenic mechanism. *Arthritis Rheum*, 2005;52:1185-95.
- [47] J. J. Hooks, H. M. Moutsopoulos, S. A. Geis, N. I. Stahl, J. L. Decker, A. L. Notkins. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med*, 1979;301:5-8.
- [48] L. Zheng, Z. Zhang, C. Yu, L. Tu, L. Zhong, C. Yang. Association between IFN-alpha and primary Sjogren's syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009;107:e12-8.
- [49] E. S. Emamian, J. M. Leon, C. J. Lessard, M. Grandits, E. C. Baechler, P. M. Gaffney *et al.* Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun*, 2009;10:285-96.
- [50] C. P. Mavragani, T. B. Niewold, N. M. Moutsopoulos, S. R. Pillemer, S. M. Wahl, M. K. Crow. Augmented interferon-alpha pathway activation in patients with Sjögren's syndrome treated with etanercept. *Arthritis Rheum*, 2007;56:3995-4004.
- [51] M. E. Wildenberg, C. G. van Helden-Meeuwsen, J. P. van de Merwe, H. A. Drexhage, M. A. Versnel. Systemic increase in type I interferon activity in Sjögren's syndrome: a putative role for plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2008;38:2024-33.
- [52] T. B. Niewold, T. L. Rivera, J. P. Buyon, M. K. Crow. Serum type I interferon activity is dependent on maternal diagnosis in anti-SSA/Ro-positive mothers of children with neonatal lupus. *Arthritis Rheum*, 2008;58:541-6.
- [53] P. Pérez, J. M. Anaya, S. Aguilera, U. Urzúa, D. Munroe, C. Molina *et al.* Gene expression and chromosomal location for susceptibility to Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*, 2009;33:99-108.
- [54] S. C. Forster, M. D. Tate, P. J. Hertzog. MicroRNA as Type I Interferon-Regulated Transcripts and Modulators of the Innate Immune Response. *Front Immunol*, 2015;6:334.
- [55] M. Correia de Sousa, M. Gjorgjieva, D. Dolicka, C. Sobolewski, M. Foti. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing. *Int J Mol Sci*, 2019;20.
- [56] T. Conrad, A. Marsico, M. Gehre, U. A. Orom. Microprocessor activity controls differential miRNA biogenesis In Vivo. *Cell Rep*, 2014;9:542-54.
- [57] J. L. Wiesen, T. B. Tomasi. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol*, 2009;46:1222-8.
- [58] J. Witteveldt, A. Ivens, S. Macias. Inhibition of Microprocessor Function during the Activation of the Type I Interferon Response. *Cell Rep*, 2018;23:3275-85.
- [59] C. R. Alarcón, H. Lee, H. Goodarzi, N. Halberg, S. F. Tavazoie. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 2015;519:482-5.
- [60] C. R. Alarcón, H. Goodarzi, H. Lee, X. Liu, S. Tavazoie, S. F. Tavazoie. HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*, 2015;162:1299-308.
- [61] G. Jia, Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*, 2011;7:885-7.
- [62] G. Zheng, J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C. M. Huang, C. J. Li *et al.* ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility. *Mol Cell*, 2013;49:18-29.
- [63] P. Wang, K. A. Doxtader, Y. Nam. Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Mol Cell*, 2016;63:306-17.

- [64] C. Zhang, J. Fu, Y. Zhou. A Review in Research Progress Concerning m6A Methylation and Immunoregulation. *Front Immunol*, 2019;10:922.
- [65] J. Wang, S. Yan, H. Lu, S. Wang, D. Xu. METTL3 Attenuates LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages via NF- κ B. *Mediators Inflamm*, 2019;2019:3120391.
- [66] Q. Luo, J. Rao, L. Zhang, B. Fu, Y. Guo, Z. Huang *et al.* The study of METTL14, ALKBH5, and YTHDF2 in peripheral blood mononuclear cells from systemic lupus erythematosus. *Mol Genet Genomic Med*, 2020:e1298.
- [67] M. A. Zipeto, A. C. Court, A. Sadarangani, N. P. Delos Santos, L. Balaian, H. J. Chun *et al.* ADAR1 Activation Drives Leukemia Stem Cell Self-Renewal by Impairing Let-7 Biogenesis. *Cell Stem Cell*, 2016;19:177-91.
- [68] M. M. Lamers, B. G. van den Hoogen, B. L. Haagmans. ADAR1: "Editor-in-Chief" of Cytoplasmic Innate Immunity. *Front Immunol*, 2019;10:1763.
- [69] C. R. Walkley, J. B. Li. Rewriting the transcriptome: adenosine-to-inosine RNA editing by ADARs. *Genome Biol*, 2017;18:205.
- [70] N. I. Vlachogiannis, A. Gatsiou, D. A. Silvestris, K. Stamatelopoulos, M. G. Tektonidou, A. Gallo *et al.* Increased adenosine-to-inosine RNA editing in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 2020;106:102329.
- [71] D. Laxminarayana, K. S. O'Rourke, S. Maas, I. Olorenshaw. Altered editing in RNA editing adenosine deaminase ADAR2 gene transcripts of systemic lupus erythematosus T lymphocytes. *Immunology*, 2007;121:359-69.
- [72] C. H. Shiboski, S. C. Shiboski, R. Seror, L. A. Criswell, M. Labetoulle, T. M. Lietman *et al.* 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*, 2017;76:9-16.
- [73] T. E. Daniels. Labial salivary gland biopsy in Sjögren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum*, 1984;27:147-56.
- [74] M. Sato, Y. Hayashi, T. Yanagawa, H. Yoshida, Y. Yura, M. Azuma *et al.* Intermediate-sized filaments and specific markers in a human salivary gland adenocarcinoma cell line and its nude mouse tumors. *Cancer Res*, 1985;45:3878-90.
- [75] M. W. Pfaffl, G. W. Horgan, L. Dempfle. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002;30:e36.
- [76] A. Kozomara, M. Birgaoanu, S. Griffiths-Jones. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, 2019;47:D155-D62.
- [77] Z. Brkic, N. I. Maria, C. G. van Helden-Meeuwsen, J. P. van de Merwe, P. L. van Daele, V. A. Dalm *et al.* Prevalence of interferon type I signature in CD14 monocytes of patients with Sjogren's syndrome and association with disease activity and BAFF gene expression. *Ann Rheum Dis*, 2013;72:728-35.
- [78] I. L. A. Bodewes, A. Björk, M. A. Versnel, M. Wahren-Herlenius. Innate immunity and interferons in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2021;60:2561-73.
- [79] T. Tokar, C. Pastrello, A. E. M. Rossos, M. Abovsky, A. C. Hauschild, M. Tsay *et al.* mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res*, 2018;46:D360-D70.
- [80] D. Karagkouni, M. D. Paraskevopoulou, S. Chatzopoulos, I. S. Vlachos, S. Tastsoglou, I. Kanellos *et al.* DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res*, 2018;46:D239-D45.
- [81] D. Jara, P. Carvajal, I. Castro, M. J. Barrera, S. Aguilera, S. González *et al.* Type I Interferon Dependent hsa-miR-145-5p Downregulation Modulates MUC1 and TLR4 Overexpression in Salivary Glands From Sjögren's Syndrome Patients. *Front Immunol*, 2021;12:685837.
- [82] Y. Zhou, P. Zeng, Y. H. Li, Z. Zhang, Q. Cui. SRAMP: prediction of mammalian N6-methyladenosine (m6A) sites based on sequence-derived features. *Nucleic Acids Res*, 2016;44:e91.

- [83] M. Bhattacharyya, M. Das, S. Bandyopadhyay. miRT: a database of validated transcription start sites of human microRNAs. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2012;10:310-6.
- [84] C. X. George, Z. Gan, Y. Liu, C. E. Samuel. Adenosine deaminases acting on RNA, RNA editing, and interferon action. *J Interferon Cytokine Res*, 2011;31:99-117.
- [85] W. Liao, X. J. He, W. Zhang, Y. L. Chen, J. Yang, W. Xiang *et al.* MiR-145 participates in the development of lupus nephritis by targeting CSF1 to regulate the JAK/STAT signaling pathway. *Cytokine*, 2022;154:155877.
- [86] L. Tan, L. Liu, J. Yao, C. Piao. miR-145-5p attenuates inflammatory response and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting (NADPH) oxidase homolog 1. *Exp Anim*, 2021;70:311-21.
- [87] J. Wu, Y. He, Y. Luo, L. Zhang, H. Lin, X. Liu *et al.* MiR-145-5p inhibits proliferation and inflammatory responses of RMC through regulating AKT/GSK pathway by targeting CXCL16. *J Cell Physiol*, 2018;233:3648-59.
- [88] Y. Hui, Y. Yin. MicroRNA-145 attenuates high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal endothelial cells through regulating TLR4/NF- κ B signaling. *Life Sci*, 2018;207:212-8.
- [89] M. P. Spachidou, E. Bourazopoulou, C. I. Maratheftis, E. K. Kapsogeorgou, H. M. Moutsopoulos, A. G. Tzioufas *et al.* Expression of functional Toll-like receptors by salivary gland epithelial cells: increased mRNA expression in cells derived from patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2007;147:497-503.
- [90] M. Sachdeva, Y. Y. Mo. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res*, 2010;70:378-87.
- [91] H. Wu, Z. Xiao, K. Wang, W. Liu, Q. Hao. MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013;441:693-700.
- [92] L. Yu, H. Qu, Y. Yu, W. Li, Y. Zhao, G. Qiu. LncRNA-PCAT1 targeting miR-145-5p promotes TLR4-associated osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *J Cell Mol Med*, 2018;22:6134-47.
- [93] S. E. McGeary, K. S. Lin, C. Y. Shi, T. M. Pham, N. Bisaria, G. M. Kelley *et al.* The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*, 2019;366.
- [94] L. Wang, X. Wu, B. Wang, Q. Wang, L. Han. Mechanisms of miR-145 regulating invasion and metastasis of ovarian carcinoma. *Am J Transl Res*, 2017;9:3443-51.
- [95] C. Jin, A. Wang, L. Liu, G. Wang, G. Li, Z. Han. miR-145-5p inhibits tumor occurrence and metastasis through the NF- κ B signaling pathway by targeting TLR4 in malignant melanoma. *J Cell Biochem*, 2019;120:11115-26.
- [96] K. C. Miranda, T. Huynh, Y. Tay, Y. S. Ang, W. L. Tam, A. M. Thomson *et al.* A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*, 2006;126:1203-17.
- [97] D. Ilkovitch, M. E. Handel-Fernandez, L. M. Herbert, D. M. Lopez. Antitumor effects of Mucin 1/sec involves the modulation of urokinase-type plasminogen activator and signal transducer and activator of transcription 1 expression in tumor cells. *Cancer Res*, 2008;68:2427-35.
- [98] A. Baruch, M. Hartmann, M. Yoeli, Y. Adereth, S. Greenstein, Y. Stadler *et al.* The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res*, 1999;59:1552-61.
- [99] S. Cascio, L. Zhang, O. J. Finn. MUC1 protein expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with nuclear factor- κ B p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain. *J Biol Chem*, 2011;286:42248-56.
- [100] P. Menu, A. Mayor, R. Zhou, A. Tardivel, H. Ichijo, K. Mori *et al.* ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis*, 2012;3:e261.

- [101] M. J. Barrera, M. Sánchez, S. Aguilera, C. Alliende, V. Bahamondes, C. Molina *et al.* Aberrant localization of fusion receptors involved in regulated exocytosis in salivary glands of Sjögren's syndrome patients is linked to ectopic mucin secretion. *J Autoimmun*, 2012;39:83-92.
- [102] J. Z. Zaretsky, I. Barnea, Y. Aylon, M. Gorivodsky, D. H. Wreschner, I. Keydar. MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ERalpha) in regulation of the MUC1 gene expression. *Mol Cancer*, 2006;5:57.
- [103] N. Jonckheere, I. Van Seuningen. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie*, 2010;92:1-11.
- [104] S. Yokoyama, H. Iwaya, T. Akahane, T. Hamada, M. Higashi, S. Hashimoto *et al.* Sequential evaluation of MUC promoter methylation using next-generation sequencing-based custom-made panels in liquid-based cytology specimens of pancreatic cancer. *Diagn Cytopathol*, 2022;50:499-507.
- [105] N. Yamada, Y. Nishida, H. Tsutsumida, T. Hamada, M. Goto, M. Higashi *et al.* MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Res*, 2008;68:2708-16.
- [106] L. M. Ganley-Leal, Y. Liang, M. Jagannathan-Bogdan, F. A. Farraye, B. S. Nikolajczyk. Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Mol Immunol*, 2010;48:82-8.
- [107] L. Lamot, I. Niemietz, K. L. Brown. Methods for type I interferon detection and their relevance for clinical utility and improved understanding of rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 2019;37:1077-83.
- [108] M. J. Barrera, S. Aguilera, I. Castro, S. Matus, P. Carvajal, C. Molina *et al.* Tofacitinib counteracts IL-6 overexpression induced by deficient autophagy: implications in Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, 2021;60:1951-62.
- [109] A. Nezos, F. Gravani, A. Tassidou, E. K. Kapsogeorgou, M. Voulgarelis, M. Koutsilieris *et al.* Type I and II interferon signatures in Sjogren's syndrome pathogenesis: Contributions in distinct clinical phenotypes and Sjogren's related lymphomagenesis. *J Autoimmun*, 2015;63:47-58.
- [110] W. M. Wang, F. Li, H. Z. Jin. Role of interferon regulatory factor-mediated signaling in psoriasis. *Int J Med Sci*, 2021;18:3794-9.
- [111] J. Tang, S. Yi, Y. Liu. Long non-coding RNA PVT1 can regulate the proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by targeting microRNA-145-5p. *Hum Cell*, 2020;33:1081-90.
- [112] J. J. Yan, M. Qiao, R. H. Li, X. T. Zhao, X. Y. Wang, Q. Sun. Downregulation of miR-145-5p contributes to hyperproliferation of keratinocytes and skin inflammation in psoriasis. *Br J Dermatol*, 2019;180:365-72.
- [113] Y. Wang, Y. Cao. miR-145-5p inhibits psoriasis progression by regulating the Wnt/ β -catenin pathway. *Am J Transl Res*, 2021;13:10439-48.
- [114] N. Ehtesham, F. Khorvash, M. Kheirollahi. miR-145 and miR20a-5p Potentially Mediate Pleiotropic Effects of Interferon-Beta Through Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in Multiple Sclerosis Patients. *J Mol Neurosci*, 2017;61:16-24.
- [115] D. Sun, M. R. Emmert-Buck, P. C. Fox. Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Autoimmunity*, 1998;28:125-37.
- [116] C. H. Yang, J. Yue, M. Fan, L. M. Pfeffer. IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis. *Cancer Res*, 2010;70:8108-16.
- [117] T. J. Pugh, W. Yu, J. Yang, A. L. Field, L. Ambrogio, S. L. Carter *et al.* Exome sequencing of pleuropulmonary blastoma reveals frequent biallelic loss of TP53 and two hits in DICER1 resulting in retention of 5p-derived miRNA hairpin loop sequences. *Oncogene*, 2014;33:5295-302.
- [118] T. Conrad, E. Ntini, B. Lang, L. Cozzuto, J. B. Andersen, J. U. Marquardt *et al.* Determination of primary microRNA processing in clinical samples by targeted pri-miR-sequencing. *RNA*, 2020;26:1726-30.

- [119] J. Ji, M. Anwar, E. Petretto, C. Emanuelli, P. K. Srivastava. PPMS: A framework to Profile Primary MicroRNAs from Single-cell RNA-sequencing datasets. *Brief Bioinform*, 2022;23.
- [120] M. Winkle, S. M. El-Daly, M. Fabbri, G. A. Calin. Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions. *Nat Rev Drug Discov*, 2021;20:629-51.
- [121] M. Morlando, M. Ballarino, N. Gromak, F. Pagano, I. Bozzoni, N. J. Proudfoot. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol*, 2008;15:902-9.
- [122] S. Yin, Y. Yu, R. Reed. Primary microRNA processing is functionally coupled to RNAP II transcription in vitro. *Sci Rep*, 2015;5:11992.
- [123] H. Liu, C. Liang, R. K. Kollipara, M. Matsui, X. Ke, B. C. Jeong *et al.* HP1BP3, a Chromatin Retention Factor for Co-transcriptional MicroRNA Processing. *Mol Cell*, 2016;63:420-32.
- [124] V. A. Church, S. Pressman, M. Isaji, M. Truscott, N. T. Cizmecioglu, S. Buratowski *et al.* Microprocessor Recruitment to Elongating RNA Polymerase II Is Required for Differential Expression of MicroRNAs. *Cell Rep*, 2017;20:3123-34.
- [125] A. Louloui, E. Ntini, J. Liz, U. A. Ørom. Microprocessor dynamics shows co- and post-transcriptional processing of pri-miRNAs. *RNA*, 2017;23:892-8.
- [126] J. Zhang, R. Bai, M. Li, H. Ye, C. Wu, C. Wang *et al.* Excessive miR-25-3p maturation via N. *Nat Commun*, 2019;10:1858.
- [127] T. Berulava, S. Rahmann, K. Rademacher, L. Klein-Hitpass, B. Horsthemke. N6-adenosine methylation in MiRNAs. *PLoS One*, 2015;10:e0118438.
- [128] J. Wang, M. Ishfaq, L. Xu, C. Xia, C. Chen, J. Li. METTL3/m. *Front Pharmacol*, 2019;10:517.
- [129] J. Z. Ma, F. Yang, C. C. Zhou, F. Liu, J. H. Yuan, F. Wang *et al.* METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N. *Hepatology*, 2017;65:529-43.
- [130] W. Sun, Y. Li, D. Ma, Y. Liu, Q. Xu, D. Cheng *et al.* ALKBH5 promotes lung fibroblast activation and silica-induced pulmonary fibrosis through miR-320a-3p and FOXM1. *Cell Mol Biol Lett*, 2022;27:26.
- [131] W. Liu, T. Jiang, W. Zheng, J. Zhang, A. Li, C. Lu *et al.* FTO-mediated m6A demethylation of pri-miR-3591 alleviates osteoarthritis progression. *Arthritis Res Ther*, 2023;25:53.
- [132] Q. Luo, B. Fu, L. Zhang, Y. Guo, Z. Huang, J. Li. Decreased Peripheral Blood. *Dis Markers*, 2020;2020:8193895.
- [133] L. J. Deng, X. Y. Fang, J. Wu, Q. R. Li, Y. M. Mao, R. X. Leng *et al.* ALKBH5 Expression could Affect the Function of T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Case-control Study. *Curr Pharm Des*, 2022;28:2270-8.
- [134] Q. Luo, Y. Gao, L. Zhang, J. Rao, Y. Guo, Z. Huang *et al.* Decreased. *Biomed Res Int*, 2020;2020:5735279.
- [135] J. Tang, Z. Yu, J. Xia, R. Jiang, S. Chen, D. Ye *et al.* METTL14-mediated m6A modification of TNFAIP3 involved in inflammation in patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2023.
- [136] Y. Wang, L. Xu, S. Luo, X. Sun, J. Li, H. Pang *et al.* The m6A methylation profiles of immune cells in type 1 diabetes mellitus. *Front Immunol*, 2022;13:1030728.
- [137] Q. Xiao, X. Wu, C. Deng, L. Zhao, L. Peng, J. Zhou *et al.* The potential role of RNA N6-methyladenosine in primary Sjögren's syndrome. *Front Med (Lausanne)*, 2022;9:959388.
- [138] L. Cheng, H. Li, H. Zhan, Y. Liu, X. Li, Y. Huang *et al.* Alterations of m6A RNA methylation regulators contribute to autophagy and immune infiltration in primary Sjögren's syndrome. *Front Immunol*, 2022;13:949206.
- [139] Y. Liu, J. Zhu, L. Ding. Involvement of RNA methylation modification patterns mediated by m7G, m6A, m5C and m1A regulators in immune microenvironment regulation of Sjögren's syndrome. *Cell Signal*, 2023;106:110650.
- [140] J. Ma, X. Wang, X. Yang, T. Tan, H. Fang, Y. Zhong *et al.* Increased METTL3 expression and m. *BMC Ophthalmol*, 2023;23:252.
- [141] E. Desvaux, J. O. Pers. Autoimmune epithelitis in primary Sjögren's syndrome. *Joint Bone Spine*, 2023;90:105479.

- [142] J. Qu, H. Yan, Y. Hou, W. Cao, Y. Liu, E. Zhang *et al.* RNA demethylase ALKBH5 in cancer: from mechanisms to therapeutic potential. *J Hematol Oncol*, 2022;15:8.
- [143] C. Zeng, W. Huang, Y. Li, H. Weng. Roles of METTL3 in cancer: mechanisms and therapeutic targeting. *J Hematol Oncol*, 2020;13:117.
- [144] Y. Du, G. Hou, H. Zhang, J. Dou, J. He, Y. Guo *et al.* SUMOylation of the m6A-RNA methyltransferase METTL3 modulates its function. *Nucleic Acids Res*, 2018;46:5195-208.
- [145] J. H. Bahn, J. Ahn, X. Lin, Q. Zhang, J. H. Lee, M. Civelek *et al.* Genomic analysis of ADAR1 binding and its involvement in multiple RNA processing pathways. *Nat Commun*, 2015;6:6355.
- [146] W. Gao, C. Zhang, W. Li, H. Li, J. Sang, Q. Zhao *et al.* Promoter Methylation-Regulated miR-145-5p Inhibits Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Progression by Targeting FSCN1. *Mol Ther*, 2019;27:365-79.
- [147] M. Sachdeva, S. Zhu, F. Wu, H. Wu, V. Walia, S. Kumar *et al.* p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106:3207-12.
- [148] L. Xu, Y. Zhang, J. Tang, P. Wang, L. Li, X. Yan *et al.* The Prognostic Value and Regulatory Mechanisms of microRNA-145 in Various Tumors: A Systematic Review and Meta-analysis of 50 Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019;28:867-81.
- [149] W. Yang, T. P. Chendrimada, Q. Wang, M. Higuchi, P. H. Seeburg, R. Shiekhattar *et al.* Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*, 2006;13:13-21.
- [150] T. Chen, J. F. Xiang, S. Zhu, S. Chen, Q. F. Yin, X. O. Zhang *et al.* ADAR1 is required for differentiation and neural induction by regulating microRNA processing in a catalytically independent manner. *Cell Res*, 2015;25:459-76.
- [151] S. Ma, C. Zhang, Z. Zhang, Y. Dai, R. Gu, R. Jiang. Geniposide protects PC12 cells from lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury via up-regulation of miR-145-5p. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019;47:2875-81.
- [152] S. Domingo, C. Solé, T. Moliné, B. Ferrer, J. Cortés-Hernández. MicroRNAs in Several Cutaneous Autoimmune Diseases: Psoriasis, Cutaneous Lupus Erythematosus and Atopic Dermatitis. *Cells*, 2020;9.

ANEXO



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2

26 ABR. 2016



**ACTA DE APROBACIÓN
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

Con fecha 26 de abril de 2016, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria Ejecutiva
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular
Dra. María Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Infectólogo (miembro suplente)

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: "**CYTOKINES INDUCE ALTERATIONS IN STRESS RESPONSE PATHWAYS OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM IN SALIVARY GLANDS OF SJÖGREN'S SYNDROME PATIENTS: CAN THESE BE MODULATED BY EPIGENETIC MECHANISMS?**" y cuyo investigador responsable es la **Dra. María Julieta González**, quien desempeña funciones en el **Programa de Biología Molecular y Celular, ICBM** de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de Investigación in extenso.*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.*
- *Carta de aceptación de las autoridades de las instituciones en que se realizará el estudio.*
- *Consentimiento Informado versión 1.2, Final, 03 de diciembre de 2015.*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: No cautiva, no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Sí.
- c) Riesgos y Beneficios: Balanceados.
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Sí.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



2/2
26 ABR. 2016

- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No aplica, sólo se hará una biopsia de labio que es para el manejo clínico del paciente.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto. Sí.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio:

- Clínica INDISA
- Escuela de Odontología, Universidad Mayor
- Laboratorio Biología Celular, Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Santiago, 26 de abril de 2016.

Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

GRB/mfp.
c.c: - Archivo Proyecto Nº 010 -2016.
- Acta Nº 003.

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

26 ABR. 2018.



COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERIES HUMANOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

"Citoquinas inducen alteraciones en las vías de respuesta a estrés de retículo endoplásmico en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren: ¿Pueden estas alteraciones ser moduladas por mecanismos epigenéticos?"

Investigador Responsable:

- Dra. María Juleta González Burgos, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Tel: 229786017, e-mail: jgonzale@med.uchile.cl

Co-investigadores:

- Dr. Sergio Aguilera Covarrubias, Reumatología, Clínica INDISA, Tel: 227955897, e-mail: elcolhue@gmail.com
- Dr. Claudio Molina Castillo, Escuela de Odontología, Universidad Mayor, Tel: 223281771, e-mail: ctmolina@gmail.com
- Dr. Sergio González Providell, Escuela de Odontología, Universidad Mayor, Tel: 223281771, e-mail: sergiogprovidell@yahoo.com
- Dra. Isabel Castro Massó, Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Tel: 229786888, e-mail: iv_castro@med.uchile.cl

Invitación a participar

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Citoquinas inducen alteraciones en las vías de respuesta a estrés de retículo endoplásmico en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren: Pueden estas alteraciones ser moduladas por mecanismos epigenéticos?". Nuestro equipo dirige una investigación que busca comprender los mecanismos celulares y moleculares que puedan explicar la pérdida en la producción y calidad de saliva en los pacientes con síndrome de Sjögren. En este documento se explican los beneficios y riesgos de la participación en este estudio para que usted tome una decisión informada. Al final del documento hay un anexo donde se explica 1. ¿Qué es el síndrome de Sjögren? 2. Boca Seca y 3. ¿Cómo se hace el diagnóstico?

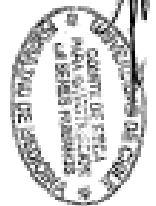
Objetivos

El objetivo de nuestro estudio es investigar los mecanismos que pueden explicar la baja producción y cambios en la calidad de la saliva y sensación de boca seca que sufren los pacientes con síndrome de Sjögren. Su médico tratante le solicitó una biopsia, que junto a otros exámenes, ayudarán a establecer o a descartar si usted padece de esta enfermedad. Esta biopsia es necesaria para el correcto diagnóstico y no se toma con fines exclusivos para este estudio. En caso que se confirme o descarte esta enfermedad lo invitamos a participar en este estudio.

Procedimientos

Si acepta participar, será sometido a una biopsia de glándula salival de labio. La biopsia se hace en un sillón dental con anestesia local (al igual que cualquier atención en el dentista). Se hace un corte superficial en la cara interna del labio inferior (1 a 2 cms) y se sacan de 3-6 glándulas cercanas al sitio del

26 ABR. 2016



corte, cada glándula tiene el tamaño de un grano de arroz. Luego se colocan puntos (entre 3 a 5) que deben retirarse en una semana. Todo el procedimiento demora entre 15 a 20 minutos y es ambulatorio. No es necesario guardar reposo después, aunque si debe tener algunos cuidados posteriores, tales como: consumir alimentos fríos, cepillado dental suave, hablar lo menos posible. La biopsia será hecha por dentistas con experiencia en este procedimiento, Drs. Sergio González y Claudio Molina, académicos de la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor. El análisis de las muestras se realizará en el Laboratorio de Biología Celular, del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, bajo la dirección de la investigadora principal de este proyecto, Dra. María Julieta González.

Riesgos

Previo a la biopsia todos los pacientes serán sometidos a un examen médico completo con especial énfasis en la parte cardiovascular y de coagulación. La administración de anestesia local no tiene efectos secundarios comúnmente, excepto en algunos pacientes que pueden sentirse mareados. Si el paciente sufre de presión alta se usa anestesia local adecuada para estos casos. El pabellón dental donde se realizará la biopsia reúne todos los recursos para los eventuales casos en que se presente alguna complicación.

La biopsia de labio puede causar ocasionalmente alguna(s) de las siguientes molestias:

- Hinchazón y/o dolor, controlable con analgésicos habituales.
- Sangrado o la formación de un pequeño hematoma.
- Sensación de hormigueo en el labio.
- En muy raras ocasiones, infección.

• Sin embargo, se tomarán todas las precauciones para prevenir o reducir su aparición.

Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de la toma de biopsia debe comunicarlo al Dr. Sergio Aguilera (227955897-Clinica INDISA, 223354979-Residencia) o al Dr. Sergio González (Tel-Universidad Mayor, 223281771; Celular 75786231)

Costos

La toma de la biopsia, los controles médico-odontológicos, el procesamiento de las glándulas salivales labiales y el informe histopatológico no tendrá ningún costo para los pacientes que participen en el estudio. Las muestras procesadas de las glándulas salivales y las placas histológicas para análisis microscópico estarán a disposición de los pacientes y de sus médicos tratantes que eventualmente las soliciten (Teléfono: 229786581). La evaluación clínica habitual de esta enfermedad y otros exámenes necesarios y propios de su enfermedad, deberán ser financiados por el paciente y su sistema previsional.

Beneficios

Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio traerá, como se indica arriba, el beneficio de la biopsia e informe de biopsia sin costo para usted, para tener un diagnóstico de acuerdo a los criterios internacionales utilizados actualmente.

Alternativas

Si usted decide no participar en esta investigación, recibirá las evaluaciones y tratamiento que se aplica habitualmente al resto de los pacientes, la atención y dedicación entregada por su médico tratante no será afectada. En este caso la biopsia será tomada solamente con fines diagnósticos y tendrá el costo habitual que establece para este tipo de procedimientos el servicio de diagnóstico de la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor.

Compensación

Usted no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada con estricta confidencialidad. Cada participante tendrá un código, el que se establecerá previo a la obtención de los datos. En cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación, no se entregarán detalles que puedan involucrar la privacidad o permitir la identificación de los participantes. El personal de colaboración será entrenado para que observe un comportamiento ético respecto de la información de los participantes.

De la biopsia extraída se obtendrá material genético (DNA) que se utilizará en su totalidad en este estudio.

Toda la información y el material de estudio serán mantenidos en lugares protegidos, en forma totalmente confidencial, el profesional responsable del resguardo de las muestras es la Dra. María Julieta González.

Usos potenciales de los resultados de la investigación

Las glándulas salivales labiales obtenidas y los datos entregados serán utilizados sólo para los fines de la investigación y divulgación científica de los resultados. En caso de que estas glándulas puedan usarse en otros estudios, se solicitará un nuevo consentimiento a los participantes.

Voluntariedad

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad.

Complicaciones

En la eventualidad de que usted presente complicaciones directamente relacionadas con la administración de anestesia local o del procedimiento de biopsia, usted recibirá el tratamiento médico-odontológico oportuno para dicha complicación, en el mismo pabellón donde se realizará la biopsia, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias del curso natural de su enfermedad.

Derechos del participante

Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

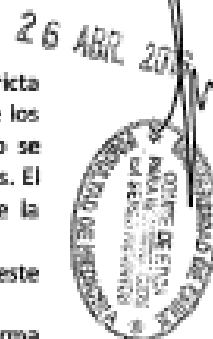
Investigador Principal: María Julieta González Burgos, fono 229786017, e-mail: jgonzale@med.uchile.cl

Autoridad de la institución: Dra. Carmen Larrañaga, fono 229786067, e-mail: clarrana@med.uchile.cl

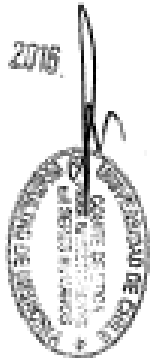
Las placas histopatológicas y/o copias de los informes de biopsias estarán a disposición de los pacientes y de sus médicos tratantes que eventualmente las soliciten al investigador responsable.

Otros Derechos del participante

En caso de dudas sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 229789536, Email: comitecelsh@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.



26 ABR. 2016



Conclusión

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Citoquinas Inducen alteraciones en las vías de respuesta a estrés de retículo endoplásmico en glándulas salivales de pacientes con síndrome de Sjögren: Pueden estas alteraciones ser moduladas por mecanismos epigenéticos?"

Nombre del participante	Firma	Fecha
RUT: _____		

Nombre del informante	Firma	Fecha
RUT: _____		

Nombre del investigador	Firma	Fecha
RUT: _____		

Si se trata de un paciente con discapacidad psíquica o intelectual, registrar nombre del paciente y de su apoderado, en cumplimiento artículo 28 ley 20.584.

ANEXO

26 ABR 2008



¿Qué es el síndrome de Sjögren?

El síndrome de Sjögren es una enfermedad crónica, sistémica y autoinmune, en la cual los glóbulos blancos (ejemplo linfocitos) equivocadamente invaden las glándulas productoras de lágrimas y saliva, causando inflamación y disminuyendo la secreción. La edad de las manifestaciones de los síntomas y signos es por lo general alrededor de los cuarenta años, y el 90% de los pacientes con síndrome de Sjögren son mujeres. Este síndrome fue inicialmente caracterizado y diagnosticado por el médico sueco, Dr. Henrik Sjögren, en 1933. Los pacientes con síndrome de Sjögren también pueden tener otras enfermedades autoinmunes asociadas, tales como artritis reumatoidea, lupus sistémico y esclerodermia, cuando esto ocurre se llama síndrome de Sjögren secundario, si no existe otra enfermedad autoinmune se llama síndrome de Sjögren primario. Aunque lo característico de este síndrome es la sequedad de los ojos y boca, también puede causar sequedad de otros órganos y afectar riñones, sistema gastrointestinal, vasos sanguíneos, pulmones, hígado, páncreas, y sistema nervioso. Muchos pacientes sufren de fatiga y dolores articulares. Esta es una enfermedad seria, pero generalmente no es fatal. Un porcentaje menor (10%) de los pacientes pueden complicarse y desarrollar un cáncer (linfoma). Las causas no se conocen, pero hay evidencias que las infecciones virales, la herencia y las hormonas pueden contribuir a originar esta enfermedad.

Boca Seca

Un síntoma característico del síndrome de Sjögren es la boca seca. Generalmente causado por disminución en la cantidad y/o calidad de la saliva. Casi todos los pacientes con esta enfermedad sienten algún grado de sequedad de la boca.

La boca seca puede tener muchas causas, tales como: 1. uso prolongado de medicamentos (ejemplo, diuréticos, anti-histamínicos, anti-depresivos) 2. Enfermedades crónicas (síndrome de Sjögren, hepatitis C, diabetes, depresión).

La saliva es un fluido que protege y limpia la mucosa oral, ayuda a masticar, tragar y hablar, protege los dientes contra las caries, protege contra las infecciones y ayuda a sentir el sabor de los alimentos.

Por las importantes funciones que cumple la saliva en nuestra vida diaria es relevante determinar la causa de la boca seca.

¿Cómo se hace el diagnóstico?

El síndrome de Sjögren no es fácil de diagnosticar y con frecuencia es mal diagnosticado. Los síntomas pueden confundirse con otras enfermedades, como Lupus, fibromialgia, artritis reumatoidea, entre otras.

El diagnóstico del síndrome de Sjögren se basa en la historia clínica y los signos y síntomas del paciente, por ejemplo: 1. presencia de sequedad de boca o en otros sitios, tales como ojos, vagina, piel, 2) crecimiento (hinchazón) de glándulas parótidas y/o submaxilares, 3) flujo salival alterado, 4) cintigrafía alterada y 5) biopsia de glándulas salivales de labio alterada.

Los exámenes fundamentales para apoyar el diagnóstico son la presencia de algunos marcadores sanguíneos como anti-Ro (SS-A) y anti-La (SS-B), y la biopsia de labio con inflamación.