



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

***Nuevos Biomarcadores en el
Diagnóstico y Pronóstico de
Enfermedades Cardiovasculares***

○ **Autores:**

- Miguel Rodríguez Reina
- Ana M^a Villarta Aguilera

○ **Tutora:** Prof. M. Almudena Gómez Hernández

○ **Convocatoria:** Febrero 2018

ÍNDICE

1.	Resumen	3
2.	Introducción y Antecedentes	4
2.1	Enfermedad Cardiovascular	4
2.2	Biomarcadores.....	4
2.3	Biomarcadores tradicionales en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad cardiovascular.....	5
2.4	Micro-ARNs.....	5
3.	Objetivos.....	7
4.	Metodología.....	7
5.	Resultados y Discusión.....	7
5.1	MiARN208a.....	7
5.2	MiARN499.....	10
5.3	MiARN1.....	12
5.4	MiARN133a.....	14
5.5	MiARN en plasma.....	15
5.6	MiARNs en el diagnóstico de Enfermedades cardiovasculares.....	16
5.7	Posible acción terapéutica de los MiARNs en enfermedad cardiovascular...	18
6.	Conclusión.....	18
7.	Bibliografía.....	19

1. Resumen

El **Infarto agudo de miocardio (IAM)** es una de las principales causas de morbimortalidad. Actualmente causa 1.8 millones de muertes al año en el mundo. En España, la tasa de mortalidad debido a IAM es del 10%, siendo la cardiopatía isquémica el causante del 30% de las muertes de etiología cardiovascular.

En la actualidad, debido a la necesidad de diagnosticar rápidamente el infarto agudo del miocardio, se están investigando nuevos marcadores séricos que permitan diagnosticar el IAM rápidamente con alta sensibilidad y alto valor predictivo negativo.

Los **microARN (miARN)** han sido descubiertos recientemente como un mecanismo de regulación de la expresión génica. Se ha notado un aumento de su concentración en sangre en episodios de IAM, y estas fluctuaciones en las concentraciones séricas podrían ser detectadas y servir como posibles **biomarcadores de IAM**. Esto ha llevado a la identificación de miARN como **miR-1, miR-208a, miR-499 y miR-133a**, que son liberados a sangre casi exclusivamente en condiciones de daño cardíaco, mostrando que el estudio de perfiles de miARN puede ser útil en la identificación de biomarcadores séricos que reflejen el estado de la función cardíaca.

Palabras clave: Infarto de miocardio, microARN, diagnóstico, biomarcador, cardiovascular, miR-1, miR-133, miR-208, miR-499.

► Abstract

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the main causes of morbidity and mortality in the world. Currently the IAM causes 1.8 million deaths per year in the world. In Spain, the mortality rate due to AMI is 10%, with ischemic heart disease accounting for 30% of cardiovascular etiology deaths.

Currently, due to the need to rapidly diagnose acute myocardial infarction, new serum markers that allow the diagnosis of AMI rapidly with high sensitivity and high negative predictive value are being investigated.

MicroRNAs (miRNA) have recently been discovered as a mechanism for the regulation of gene expression. An increase in blood levels has been noticed in episodes of AMI, and these fluctuations in concentrations can be detected and serve as potential **biomarkers of AMI**. This has led to the identification of miRNAs such as **miR-1, miR-**

208a, miR-499 and miR-133a, which are released to blood almost exclusively in conditions of cardiac damage, showing that the study of miRNA profiles can be useful in the identification of serum biomarkers that reflect the state of cardiac function.

Key words: Myocardial infarction, microRNA, diagnosis, biomarker, cardiovascular, miR-1, miR-133, miR-208, miR-499.

2. Introducción y Antecedentes

2.1 Enfermedad Cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo. El proceso patológico que las desencadena es un engrosamiento de la pared arterial debido a la formación de placas ateroscleróticas, las cuales se complican frecuentemente a un trombo y pueden dar lugar a síndrome coronario agudo o accidente cerebrovascular [1].

El infarto agudo de miocardio es el desenlace más común en la patología cardíaca y conduce a una gran mortalidad en los países desarrollados. Es el resultado de un daño cardíaco agudo causado por condiciones de hipoxia e isquemia acompañadas de estrés oxidativo e inflamación en el área infartada. Un temprano y correcto diagnóstico puede justificar el inicio inmediato de la terapia de reperfusión para disminuir la tasa de mortalidad [2].

2.2 Biomarcadores

Un marcador es una característica que se puede cuantificar o evaluar y que sirve como indicador de un proceso biológico normal, patogénico o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica.

Dentro de los marcadores, un biomarcador, es una medida sistemática de moléculas, proteínas o enzimas que aporta valor diagnóstico o pronóstico reflejando la presencia y evolución de una situación patológica.

Los biomarcadores se pueden clasificar en biomarcadores de diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Un buen biomarcador debe proporcionar información diagnóstica, pronóstica y/o terapéutica adicional a la que se obtiene a partir de los datos clínicos del paciente. Además, debe poseer estas características química-analíticas [3]:

- Alta especificidad y sensibilidad.
- Estabilidad
- Predictivo
- Facilidad de muestreo.
- Relevancia preclínica y clínica
- Representatividad.
- Económico
- Cinética de formación

2.3 Biomarcadores tradicionales en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad cardiovascular.

Los biomarcadores que se usan para establecer el diagnóstico de IAM, han surgido de análisis de proteínas conocidas del miocardio. Actualmente existen varios biomarcadores, entre ellos, las troponinas cardíacas, las cuales, son consideradas el ‘gold standard’ para el diagnóstico temprano de IAM. Estas son liberadas a sangre cuando se produce muerte celular en el miocardio, siendo su concentración plasmática proporcional al daño cardíaco. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las concentraciones de troponinas cardíacas también se encuentran elevadas en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal, lo cual puede interferir en el diagnóstico del IAM. Por ello, es necesario encontrar nuevos biomarcadores con mayor especificidad para IAM [4].

Otros biomarcadores utilizados en la actualidad son: la albúmina modificada por isquemia, que cuenta con alto valor predictivo negativo; el ligando de CD40 soluble, que permite la clasificación e individualización del tratamiento; la proteína C reactiva como marcador de riesgo de enfermedad coronaria; la creatinina kinasa MB y la mioglobina que se han usado en el diagnóstico clínico; y las diversas técnicas de alto rendimiento como la proteómica, que permite la detección de múltiples biomarcadores potenciales [1].

Recientes estudios demuestran que los miARNs están también presentes en varios fluidos biológicos como la sangre y el nivel de miARN puede estar ligado al diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Se cree que los miARNs específicos cardíacos se deben liberar a la circulación durante el IAM y podrían ser detectados y monitorizados durante el daño cardíaco [5].

2.4 Micro-ARNs

Un micro-ARN es una secuencia de ARN monocatenario no codificante de 19 a 25 nucleótidos, que juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes a

nivel postranscripcional, bloqueando la síntesis de proteínas mediante la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción [6].

Los miARN son transcritos en el núcleo por la ARN polimerasa II, y son madurados posteriormente, originando un miARN primario (pri-miARN). Los pri-miARN forman estructuras secundarias en forma de horquilla (stem-loop) formadas por complementariedad de bases y con una caperuza en 5' y una cadena de poliA en 3' que son cortadas por la enzima Drosha (Una ARNasa tipo III) ayudada por su cofactor DGCR8. A partir de este proceso se origina el precursor del miARN (pre-miARN) que contiene alrededor de 70 nucleótidos [7].

El pre-miARN generado posee 2 nucleótidos salientes en el extremo 5'terminal, el cual es una huella propia de las RNAsas tipo III, y permite el reconocimiento de la exportina-5 para el traslado del pre-miARN desde el núcleo al citoplasma mediante un proceso dependiente de GTP [8].

En el citoplasma, el pre-miARN es procesado por la ARNasa de tipo III Dicer con sus cofactores TRBP y PRKRA. Dicer actúa eliminando la horquilla y dando lugar a un miARN de pequeño tamaño (19 a 25 nucleótidos) de doble cadena [7].

Los miARN de doble cadena se incorporan a la enzima Argonauta 2 (AGO2) dando lugar a el complejo efector miRISC (RNA-induced silencing complex) donde ejercerá su función de silenciamiento de genes. Las funciones de la proteína AGO2 es escindir las dos hebras del RNA de doble cadena dando lugar al miARN funcional. Mientras una de las hebras se mantiene incorporada en el complejo RISC, la otra se desprende para su posterior degradación. Además, AGO2 es la ARNasa catalíticamente activa en el complejo RISC [6,9].

Los miRNAs inhiben la expresión génica por diferentes mecanismos de acción. El complejo AGO2-miARN reconoce el mRNA blanco por complementariedad de bases (nucleótidos 2 a 8 del extremo 5'del miARN con la región 3' UTR del mRNA). El mecanismo por el cual un miARN ejerce su función depende del grado de complementariedad ambas [7].

Una vez reconocido el ARNm, si la complementariedad entre ambas secuencias es completa, el ARNm diana será degradado por RISC: en primer lugar, se elimina la

cadena de poli Adenina en la región terminal 3' y posteriormente, se modifica la caperuza 5' para finalmente llevarse a la degradación del mRNA por exo- y endonucleasas [6,7].

Sin embargo, si el emparejamiento entre las bases no es perfecto, se producirá la inhibición de la traducción a través de diferentes mecanismos a nivel pre- y postraduccional [6,7].

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar una rigurosa revisión bibliográfica con el fin de analizar la viabilidad de los microARN cardioespecíficos presentes en sangre como biomarcadores de infarto agudo de miocardio. Para ello, nos propusimos como objetivos específicos:

- a) Identificar los microARNs involucrados en el corazón analizando sus dianas y funciones.
- b) Estudiar los resultados obtenidos en modelos experimentales y en ensayos humanos para analizar la viabilidad de dichos microARN en el diagnóstico y/o pronóstico de IAM.

4. Metodología

Se ha empleado como base de datos PubMed, NCBI y diversos buscadores de artículos online. Además de la base científica se han usado páginas web oficiales, como la de la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como de la Asociación Española de Cardiología para obtener otros datos epidemiológicos de la enfermedad cardiovascular.

5. Resultados y Discusión

5.1 MiARN208a

MiR-208 presenta dos isoformas: miR-208a y miR-208b, ambas se encuentran en el cromosoma 14q11.2. Pese a encontrarse en el mismo cromosoma, el miR-208a se encuentra en el intrón 29 del gen MYH6 que codifica la cadena pesada de la miosina alfa cardiaca o miosina rápida (α MHC, mayoritaria durante la cardiogénesis y en corazón adulto) [10], mientras que miR-208b se encuentra en el intrón 31 que codifica para el gen MyH7, que codifica para cadenas pesadas de la miosina B o β MHC (miosina lenta, mayoritaria en el corazón del feto) [2,10-12].

Ambos son secuencias de 22 nucleótidos, y se diferencian en 3 bases. Mientras que miR-208b se encuentra tanto en el músculo esquelético y en el corazón, miR-208a es selectivo del corazón, debido a esto, está siendo investigado como un posible biomarcador selectivo para patologías cardíacas (Figura1) [45].

La expresión de miR-208a está regulado principalmente por el factor de respuesta al suero (SRF) y factor potenciador de miocitos 2 (Mef2), así como por factores de transcripción hélice-bucle-hélice como la miogenina y MYOD, y juega un papel en la cardiogénesis tardía, es decir, en la diferenciación de los mioblastos a cardiomiocitos. MiR-208 regula la expresión de MHC, en el corazón.

La sobreexpresión de miR-208a induce la expresión de β MHC, que produce hipertrofia y remodelación cardíaca (aumento del 50% del tamaño de los cardiomiocitos, un engrosamiento de las paredes ventriculares, fibrosis y pérdida de capacidad de eyección con insuficiencia cardíaca) [13,14].

La hormona tiroidea T3 es un regulador de la transcripción de MHC, ya que es capaz de inhibir la expresión de β MHC y activar la expresión de α MHC. MiR-208a es capaz de reprimir postranscripcionalmente la expresión de Thrap1 (un componente del complejo del receptor nuclear de la hormona tiroidea) por complementariedad parcial de bases [2,14,15], inhibiendo la acción del receptor de la hormona tiroidea de forma que favorece la expresión de β MHC. A su vez miR-208a también es capaz de inhibir la miostatina 2, el cual también es un regulador negativo del crecimiento celular.

Se han realizado ensayos que relacionan la actividad de miR-208a con la expresión de dichas proteínas. En los corazones con miR-208a sobre expresado, los niveles de transcripción de Thrap1 y miostatina se reprimieron en comparación con los corazones de control, mientras que en los miR-208a - / - se vieron incrementados [13,14].

MiR-208a también juega un papel importante en la conducción cardíaca. Diversos estudios ECG muestran que la sobreexpresión de miR-208a respecto a un grupo control

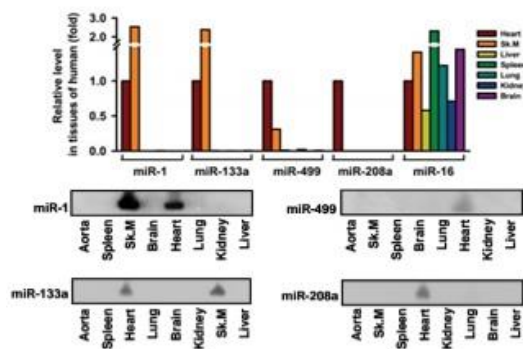


Figura 1. MiR-208a es cardiosselectivo, mientras que miR-1, miR-133a y miR-499 se expresan tanto en corazón como en músculo esquelético (Wang G. et al, 2010) [45].

conlleva a un aumento de los periodos PR (Tiempo entre el inicio de la despolarización auricular y la ventricular) y en consecuencia a bloqueos AV y arritmias [13,15]. A su vez, los grupos miR-208a $-/-$ carecían de ondas P, lo que sugiere fibrilación auricular. La conducción cardíaca se lleva a cabo a través de proteínas de unión GAP llamadas conexinas, y en los grupos miR-208a $-/-$, se redujo en gran proporción la expresión de conexina 40.

Durante eventos coronarios agudos como son el infarto agudo de miocardio y la angina de pecho, la expresión de miR-208a en el corazón se reduce, lo que sugiere una función cardíaca reprimida. Sin embargo, los niveles plasmáticos/séricos aumentan considerablemente, mientras que en situaciones normales no es detectable.

Los niveles sanguíneos aumentan en aproximadamente, en el 90% de los pacientes, tras una hora. Y en el 100% de los pacientes tras 4 horas, mientras que la troponina T, el biomarcador por excelencia para el diagnóstico del IAM, lo hace a partir de la 4-8 horas [45].

Los resultados obtenidos a día de hoy, respecto al potencial del miR-208a como biomarcador de IAM respecto a la troponina T, son ambiguos, algunos estudios sugieren que en ratas con lesión cardíaca aguda inducida con isoprotenerol los niveles de microARN eran superiores a la troponina T [16] manteniendo una buena correlación, mientras que otros sugieren que el valor diagnóstico de la troponina T sigue siendo mayor. Sin embargo, mientras en estudios en ratas los valores de miARN se mantienen altos durante un tiempo, en adultos los niveles no son constantes, esto puede deberse a una interferencia con el miR-208b, debido a la alta homología que hay entre ambos microARNs [17].

Diversos estudios han analizado la expresión en sangre de este miARN, en pacientes con accidentes cerebrovasculares, traumatismos y lesiones renales, observando que no se producía un aumento de los niveles plasmáticos, esto es debido a que miR-208a a diferencia de otros miARNs es cardiospecífico. Lo que lo hace un biomarcador viable al tener alta especificidad (Figura 2) [17,45].

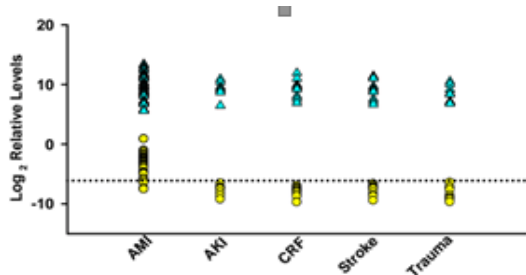


Figura 2. Mir 208a debido a su cardiospecificidad no es detectable en daño renal (n=8) insuficiencia renal (11) accidentes cerebrovasculares (n=11) y traumatismos (n=8) pero sí en IAM (n=33). (Wang G. et al, 2010) [45].

Amarillo: mir208a.

Azul: Control

En definitiva, miR-208a se plantea como un posible biomarcador viable para el diagnóstico de IAM, pero a su vez se necesita más información para poder corroborar esa hipótesis. A su vez, se está estudiando el posible empleo de antagomirs para inhibir la remodelación cardíaca y la hipertrofia en pacientes con hipertensión, con un futuro esperanzador.

5.2 MiARN499

El miR-499 humano está localizado en el intrón 19 del gen MYH7B (también conocido como MYH14) en el cromosoma 20q11.2, y codifica para la cadena pesada de la betamiosina cardíaca, un componente de la miosina de contracción lenta. MiR-499 está compuesto por dos genes (miR-499a y miR-499b) que están localizados en sentido y antisentido de cadenas de ADN de la misma región y transcritas en dirección antiparalela [18,19].

Como miR-208, miR-499 regula la cardiogénesis tardía y es responsable de la diferenciación terminal de los mioblastos a cardiomiocitos. MiR-499 regula negativamente el factor potenciador específico de miocito 2C (MEF2C), que está involucrado en el desarrollo de las células musculares y la cardiogénesis, pero también podría afectar a la expresión de los genes del músculo liso a través de la activación de la miocardina. De hecho, se ha observado que la inhibición de MEF2C, favorece que miR-499 active la diferenciación miogénica frente a la de cardiomiocitos [2, 20].

En las células progenitoras de los cardiomiocitos fetales (CMPCs), miR-499 está regulado positivamente y coopera con miR-1 para conducir la diferenciación de las CMPCs y las ESCs a cardiomiocitos.

La expresión de MYH7B y miR-499 están coordinadas y está regulada por factores de transcripción específicos del músculo como factores reguladores miogénicos (MRFs:

MyoD, miogenina y el factor miogénico Mif5) e Ikaros, un factor de transcripción linfocitario que forma un complejo con MyoD [21].

El miR-499 podría ser de ayuda para distinguir el IAM de otras cardiopatías ya que sus niveles en plasma están elevados en sujetos con IAM, pero están por debajo del nivel de detección en síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca congestiva, y otros controles normales [22, 23].

Varios estudios sugieren que miR-499 tiene mayor exactitud en el diagnóstico del infarto de miocardio en comparación con el ensayo convencional de troponina T cardíaca, sin embargo, otros estudios lo contradicen. No obstante, comparado con las troponinas, miR-499 tiene una ventaja en el diagnóstico temprano de IAM, porque este miARN podría ser detectado en sangre en menos de 4 horas tras el infarto de miocardio, mientras que los niveles detectables de troponinas aparecen después (Figura 3). Por tanto, miR-499 podría mejorar la exactitud de la troponina T para el diagnóstico del IAM y, por lo tanto, ser un marcador fiable de diagnóstico temprano de IAM. Además, los niveles relativos de miR-499 en pacientes con IAM fueron correlacionados positivamente con las concentraciones séricas de la troponina cardíaca (Figura 4) [24].

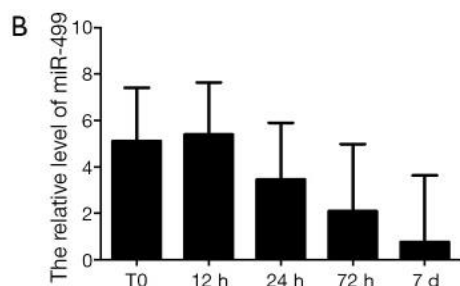


Figura 3. Evolución de los niveles plasmáticos de miR-499 cronológicamente en el transcurso del tiempo (Chen X et al., 2015) [24].

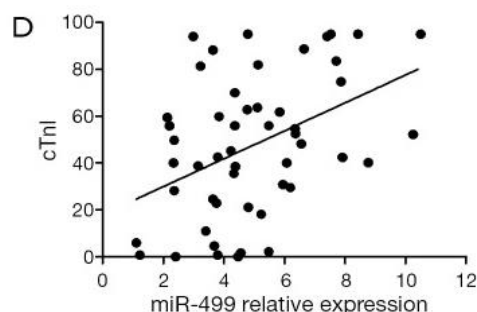


Figura 4. Correlaciones entre los niveles de miR-499 y la concentración de cTnI. Los niveles relativos de miR-499 en pacientes con IAM, están directamente relacionados con las concentraciones séricas de cTnI. ($r=0.384$, $P<0.01$) (Chen X et al., 2015) [24].

MiR-499 tiene como dianas muchos reguladores proapoptóticos, por lo que inhibe la apoptosis actuando a diversos niveles, por ejemplo, podría inhibir la apoptosis de células cardíacas mediante la regulación negativa del Sox-6 que suprime la proliferación celular e intensifica la apoptosis [25].

Los efectos antiapoptóticos y proliferativos de miR-499 son importantes durante el desarrollo del corazón y podrían servir de ayuda como aplicación terapéutica de este

miARN. Debido a la capacidad cardioespecífica regenerativa de miR-499 podría promover la diferenciación de células cardíacas stem (CSCs) a cardiomiocitos maduros funcionales en tratamientos post infarto [26].

5.3 MiARN1

El miR-1 humano tiene dos isómeros (miR-1-1 y miR-1-2) que tienen secuencias idénticas, pero están codificadas por distintos genes. MiR-1-1 está codificado por el grupo de genes miR1-1/miR-133a-2 localizados en el cromosoma 20q13.3 y transcrito en un precursor común para ambos miARNs. MiR-1-2 está codificado por el grupo de genes miR-133a-1/miR-1-2 localizados en el intrón 12 de la ubiquitina ligasa E3 (MIB1) en el cromosoma 18q11 [27-29].

MiR-1 está muy expresado tanto en músculo cardíaco como en músculo esquelético y juega un papel crucial en la diferenciación y proliferación de las células musculares [30]. El análisis global del transcriptoma muestra un continuo incremento en la expresión de miR-1 en la cardiogénesis.

La expresión de miR-1 está regulada por diversos factores. El factor de respuesta sérica (SRF), la proteína 1 de diferenciación miogénica (MyoD), la miocardina y el factor potenciador específico de miocito son activadores primarios de la transcripción de la expresión de miR-1. La miogenina aumenta la expresión de miR-1/miR-133 mediante la unión a la región potenciadora del gen diana. Sin embargo, la miostatina actúa como un regulador negativo de la expresión de este microARN. [2].

En ratones, la supresión de miR-1 conduce a fallos en el desarrollo del corazón y de la función cardíaca incluyendo arritmias y alteraciones en la conducción cardíaca [31]. Además, la sobreexpresión de miR-1 incrementa la excitación-contracción cardíaca y promueve la arritmogénesis, también incrementa la fosforilación del receptor de rianodina (RyR2) por la proteína-kinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) que impulsa la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico e induce oscilaciones espontáneas arritmogénicas en los cardiomiocitos [32].

Se ha demostrado la implicación de los miARNs en la regulación de la despolarización cardíaca. MiR-1 tiene como diana el gen CACNA1C que codifica la subunidad $\alpha 1c$ de los canales de calcio tipo L que juegan un papel muy relevante en el mantenimiento del flujo de Ca^{2+} en las células musculares cardíacas [33].

El miR-1 también está involucrado en la conducción entre células musculares cardiacas y esto se debe a que una de sus dianas moleculares es la conexina-43. En corazones post infartados, las condiciones hipóxicas estimulan la expresión de miR-1 lo que conduce a un descenso en la expresión de la proteína Cx43 lo que puede llevar a defectos en el ritmo del corazón y en la arritmogénesis [34].

Como el miR-1 está implicado en la regulación de la contractilidad cardiaca, alteraciones en la expresión de este miARN podría estar involucrado en la patogénesis del infarto de miocardio. Pero hay que tener en cuenta que los niveles de expresión del miR-1 circulante no pueden reflejar directamente su actual expresión en los cardiomiocitos. Sin embargo, los niveles en sangre de miR-1 fue demostrado que estaban significativamente elevados en pacientes en IAM [35].

Debido a que los niveles circulantes de miR-1 están incrementados en pacientes con IAM, este miARN está propuesto para ser usado como biomarcador para diagnóstico temprano de IAM y para diferenciar entre IAM y otros eventos cardiacos como la angina de pecho, infarto de miocardio no agudo, y otras enfermedades cardiovasculares (Figura 5).

Además, en pacientes con síndrome coronario agudo, los niveles séricos de miR-1 se encuentran altamente correlacionados con los niveles de troponina T, un marcador establecido de daño cardiaco. Sin embargo, el valor diagnóstico de miR-1 y otros miARN específicos cardiacos (miR133a, miR-208b y miR-499) no era superior al observado con la troponina T (Figura 6) [36].

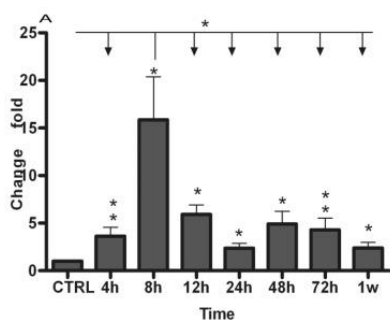


Figura 5. Evolución temporal de los niveles de miARN circulante en pacientes con IAM, presentando un claro pico de concentración máxima a las 8 horas tras la instauración del IAM (Li YQ et al, 2013) [36].

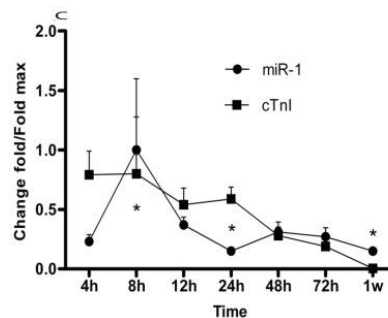


Figura 6. Evolución temporal de los niveles de miR-1 circulante en comparación con la concentración de cTnI en las mismas muestras plasmáticas de pacientes con IAM (Li YQ et al, 2013) [36].

Debido a que miR-1 muestra efectos de deterioro en la patología del corazón, representa una potencial diana terapéutica en el tratamiento de enfermedad cardiovascular. En cardiomiocitos en situación de hipoxia o de isquemia, la inhibición de miR-1 con oligonucleótidos antisentido produjo una respuesta cardioprotectora mediante la inhibición de la apoptosis, incrementando la resistencia al estrés oxidativo y atenuando las oscilaciones espontáneas arritmogénicas. Además, la regulación negativa de miR-1 podría ser beneficiosa para el tratamiento de la isquemia de miocardio y las complicaciones post infarto [2].

5.4 MiARN133a

El miR-133 humano tiene tres isoformas, el miR-133a1, miR-133a2 y el miR-133b, estos contienen una secuencia de aminoácidos muy similar de 22 aminoácidos, que únicamente difiere en el aminoácido terminal en el extremo 3' (guanina para miR-133a y adenina para el miR-133b).

La familia de miR-133 se transcribe como transcripciones bicistronicas; el miR-133b está agrupado con miR-206 en el cromosoma 6p12.2, el miR-133a-1 y el miR-133a2 son dos isómeros idénticos codificados por genes diferentes, estos están asociados a miR-1-2 (cromosoma 20q13.33) y miR1-1 (cromosoma 18q11.2), respectivamente [37-40].

En los clústeres miR-1/miR-133 cada gen de miARN tiene sus propios reguladores transcripcionales, de hecho, la expresión de uno es completamente independiente a la del otro. La expresión del miR-133a en las células musculares está regulada a través de diferentes factores, como son los factores de transcripción miogénica Mef2 y MyoD, la miocardina y el SFR.

La isoforma miR-133a se expresa tanto en los cardiomiocitos, como en el músculo esquelético, mientras que la expresión del cluster miR-133b/miR-206 es específico del músculo esquelético [37].

Existen estudios que demuestran que el miR-133a es imprescindible para el desarrollo, la función, y la regeneración del músculo esquelético y del corazón [37], en los que, si se suprimían las dos isoformas 133a1 y 133a2, los ratones padecían anomalías en la miogénesis, mientras que el grupo control o el grupo deficiente de uno de los dos mi-

ARN respondía con normalidad. Esto refuerza la afirmación de que el cluster miR-1/miR-133a está altamente expresado en el músculo esquelético.

Se ha comprobado que miR-133a tiene funciones anti-apoptóticas en el corazón infartado [2] al contrario que miR-1, ya que promueve la proliferación de mioblastos al inhibir SRF y la ciclinaD2, a la vez que es capaz de inhibir la caspasa-9 y otras proteínas proapoptóticas como son BCL-2 y BMF. A su vez, miR-133a es capaz de interactuar postrascriptionalmente con la parte 3' del ARNm de genes profibróticos, como son el factor CTGF, y el gen colageno-1A1 previo a su traducción, inhibiendo la síntesis de colágeno e inhibiendo el proceso necrótico [2,41].

Se ha demostrado en diferentes estudios en ratas la función anti apoptótica del miR-133a en modelos de infarto de miocardio, en los que la expresión del microARN favorece la función cardiaca, al disminuir la fibrosis y la hipertrofia y al aumentar la proliferación de cardiomiocitos [42].

Los niveles cardiacos de miR-133a presentan una regulación negativa en pacientes con infarto de miocardio. Se ha descrito que los niveles plasmáticos/séricos de miR-133a en los humanos sanos son relativamente bajos, pero en el miocardio afectado, tras una estimulación con Ca^{+2} , una elevada concentración de miR-133a es liberada a la circulación sanguínea, por lo que dicha concentración se dispara.

Diversos estudios demuestran que la expresión de miR-133a en sangre aumenta en pacientes con enfermedad coronaria aguda (ya sea angina de pecho o infarto de miocardio). Debido a esto miR-133a puede ser utilizado como biomarcador de muerte en los cardiomiocitos. [44, 45]

5.5 MiARN en plasma

Se ha observado que en situaciones de isquemia se estimula en células cardiacas la liberación de ciertos miARN a sangre. El mecanismo por el que los miARNs pasan a sangre no está completamente determinado, aun así, se cree que existen diferentes vías: el transporte pasivo de miARN en células muertas y la secreción activa de miARN en células vivas, ya sea a través de microvesículas o exosomas, unidos a proteínas (AGO2) o lipoproteínas (colesterol). Independientemente del sistema de liberación, los microARN circulantes pueden ejercer funciones paracrinias y endocrinas al actuar sobre

células diferentes a la fuente de origen. Este mecanismo de transporte sugiere un complejo sistema de señalización intercelular.

Pese a la gran cantidad de ARNasas que hay presente en sangre, los miARN parecen ser estables es dicho fluido. Esto puede deberse a que los miARN vayan asociados a estos transportadores que los protejan de la degradación enzimática, así como también, del pH y temperatura. Lo que permite ser detectables en sangre y su posible uso como biomarcadores. [43].

5.6 MiARNs en el diagnóstico de Enfermedades cardiovasculares.

Para comprobar el potencial diagnóstico de los microARNs en pacientes de IAM, la evaluación de la expresión de miARNs específicos cardíacos en sangre en comparación con los valores diagnósticos de la troponina T cardíaca, considerada el gold estándar para el diagnóstico del IAM, constituye un punto crítico. Existen numerosos estudios que sugieren resultados dispares:

Ying-Qing Li et al. estudiaron la expresión de estos microARNs medidos a través de una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), comparándolas con las concentraciones plasmáticas de troponina T cardíaca, medidas utilizando inmunoensayos. En este, los niveles plasmáticos de miR-1, miR-133a, miR-208b, y miR -499 fueron significativamente superiores en los pacientes con IAM ($p < 0.001$) que en los voluntarios sanos. La expresión de los miARNs disminuyó hasta los niveles basales prácticamente en el momento del alta hospitalaria ($p > 0.05$) (Figuras 7 y 8) [36].

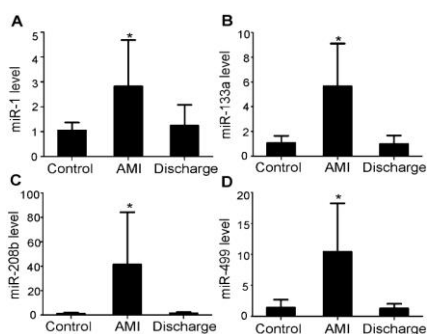


Figura 7. Alteración de los niveles plasmáticos de miARN en pacientes con IAM en muestras recogidas durante las primeras horas de establecimiento del IAM y en el momento del alta hospitalaria en comparación con pacientes sanos (A-D). (Li YQ et al. 2013) [36].

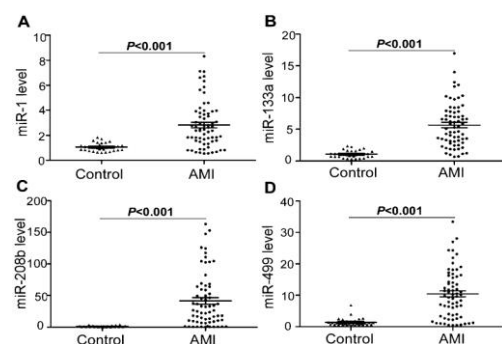


Figura 8. Niveles de los cuatro miARN estudiados en pacientes con IAM en comparación con los controles. (Li YQ et al. 2013) [36].

En un análisis de curva ROC (Receiver Operating Characteristic) en el que se representa gráficamente la sensibilidad frente a la especificidad, se demostró que los microARNs presentan alta especificidad y sensibilidad, pero no son superiores a la troponina T cardíaca para el diagnóstico de IAM ($p > 0.05$) (Figura 9) [36].

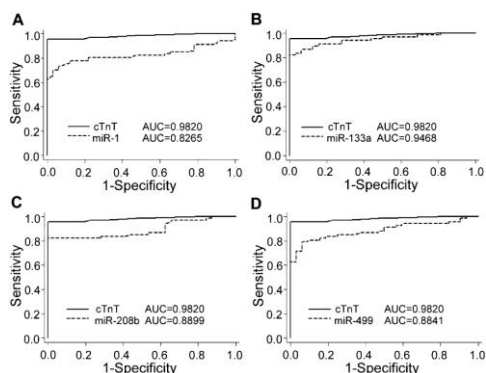


Figura 9: Curva ROC. Comparación de la sensibilidad y especificidad de los miARNs plasmáticos y la cTnT para el diagnóstico de IAM. Los miARN presentan un menor valor diagnóstico que la CTnT (Li YQ et al. 2013) [36].

En otro estudio, Yuri d Alessandra et al. estudiaron la cinética de los microARNs 1, 133a y 499 frente a la troponina. Entre los resultados encontraron que miR-1 y miR-133 presentan su pico antes que la cTnI mientras que miR-499, a pesar de tener el pico más tarde, presenta una cinética más lenta. A partir de las 15 horas los niveles de los miARNs son estables mientras que los de troponina son detectables hasta aproximadamente 33h post AMI (Figura10) [44].

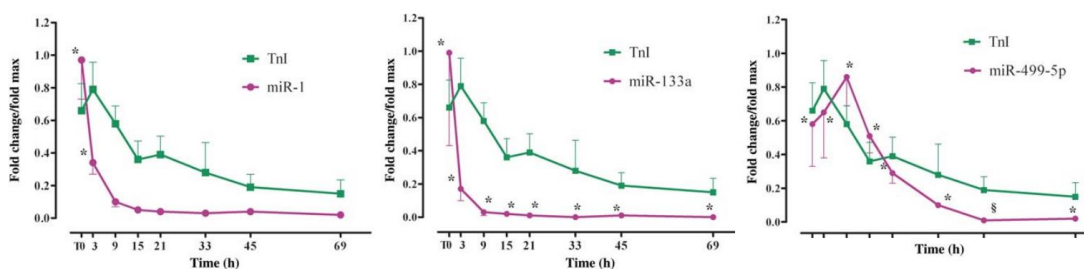


Figura 10. Cronología de los niveles plasmáticos de miR-1, miR-133a y miR-499 (7900HT Fast Real-Time PCR System) frente a TnI (ELISA) en pacientes STEMI. La primera muestra (t0) se tomo a los 156 ± 72 min después de los síntomas (Yuri d Alessandra et al, 2010) [44].

Wang G. et al. detectaron que miR-208a presentaba mayor especificidad y sensibilidad que el resto, además estudiaron la cinética de miR-208a observando que la expresión de este, indetectable en pacientes sanos, empezaba a ser detectable entre 1h-4h después del IAM, mientras que los niveles de cTnI comenzaban a ser detectables a partir de 6-8 horas después del accidente. Viéndose a su vez, que miR-208a presenta una sensibilidad

similar a cTnI (mayor incluso para detecciones antes de 4 horas). Widera. et al. corroboraron los datos al estudiar el incremento de la expresión de miR-208a y IAM en 444 pacientes (Figura 11) [45].

Supplemental Table s2. Comparison of the sensitivity between miR-208a and cTnI for AMI Diagnosis

Biomarkers	Sensitivity		
	Symptom to admission		Total (n=33)
	≤4 hours (n=20)	>4 hours (n=13)	
miR-208a	100.0% (20/20)	84.6% (11/13)	90.9%
Initial cTnI	85.0% (17/20)	100.0% (13/13)	90.9%

Figura 11. Comparación de sensibilidad de miR-208a (Real-Time PCR) frente a TnI (ELISA) en pacientes STEMI. En diagnóstico antes de 4 horas miR-208a presenta mayor sensibilidad que CTnI (Wang G. et al,2013) [45].

Yumiko Hiura et al. analizaron las concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo del miR-208a y la troponina I, observando una alta correlación de ambas, de hecho, miR-208a presentaba dos picos (3 y 6h) mayores que la troponina I (Figura 12) [46].

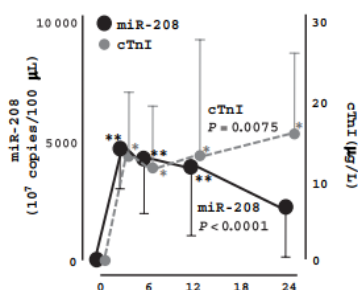


Figura 12. Cronología de los niveles plasmáticos de miR-208, (Real-Time PCR) frente a CTnI (ELISA) en ratas con IAM inducido con isoproterenol (n=8). Se muestra una alta correlación entre ambas hasta las 12 horas post AMI. (Xu Ji et al, 2009) [46].

5.7 Posible acción terapéutica de los MiARNs en enfermedad cardiovascular

Muchos estudios han demostrado que las variaciones en miARNs juegan un papel clave en el proceso de la enfermedad cardíaca. Estos datos sugieren una posible aplicación terapéutica de los miARNs antagonizando los miARNs sobreexpresados e incrementando aquellos que se encuentran regulados negativamente.

La modulación de los miARNs está basada en la tecnología antisentido y en los avances en terapia génica. Utilizando antimicroARNs dirigidos a miARNs se pueden reducir niveles elevados de miARNs en situaciones patogénicas permitiendo la activación de la expresión génica o, por el contrario, mediante el uso de agonistas de miARNs se podrían elevar los niveles de aquellos que se encuentran disminuidos, permitiendo la supresión de la expresión génica con un efecto beneficioso para la enfermedad.

6. Conclusión

La investigación basada en microARNs y su potencial aplicación clínica se están desarrollando rápidamente. En los últimos años han aportado importantes descubrimientos en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares.

A la vista de los resultados en nuestra revisión bibliográfica, los microARNs no solo juegan un papel clave en el desarrollo fisiológico del miocardio, sino que podrían actuar como potenciales biomarcadores de diagnóstico de enfermedades, en este caso de la detección temprana del infarto de miocardio. A pesar del gran progreso, son necesarios un mayor número de estudios, ya que esta vía de investigación es relativamente nueva y los estudios no son concluyentes.

Además, el uso de los moduladores de miARN con un enfoque terapéutico supone una novedosa área de intervención en la terapia de la enfermedad isquémica cardíaca, que junto a las terapias tradicionales podrían mejorar el efecto terapéutico en estas patologías.

«La búsqueda del biomarcador ideal continúa y probablemente no acabará nunca».

7. Bibliografía

- [1] Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM et al. Biomarcadores en la medicina cardiovascular. Rev Esp Cardiol. [Internet] 2009; 62:677-88 - Vol. 62 Núm.06
- [2] Dimitry AC, Alexander O. Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). JMCC.2016; 94: 107-121 Journal of Molecular and Cellular Cardiology (2016).
- [3] Eduardo Fernández, MD.(1); Carlos García, MD et al. Cardiac biomarkers: present and future. Rev. Colomb.Cardiol. vol.19 no.6 Bogota Nov./Dec. 2012.
- [4] Miguel Santaló Bel, Josep Guindo Soldevila et al. Marcadores biológicos de necrosis miocárdica. Rev Esp Cardiol.[Internet] 2003;56:703-20 - Vol. 56 Núm.07
- [5] Carrasco ID, Rasco AG, et al. ¿Qué son los micro-RNA? ¿Para qué sirven? ¿Qué potenciales beneficios podrían tener en el contexto asistencial? cardiocore . 2 0 1 6;51(4):161–166.
- [6] Garrido RRE, Velázquez-Flores MA. NUEVOS E INESPERADOS MECANISMOS DE BIOGÉNESIS Y ACCIÓN DE LOS microRNAs. REB 2016;35(3): 55-70
- [7] Pabón-Martínez V. MicroARNs: una visión molecular MicroRNA: A molecular view Y. Salud UIS 2011; 43 (3): 289-297
- [8] Cavarretta E, Frati G. MicroRNAs in Coronary Heart Disease: Ready to Enter the Clinical Arena?. BioMed Research International. 2016;2150763:10
- [9] MacFarlane LA, Murphy PL. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer Current Genomics, 2010; 11, 537-561 537
- [10] MIR208A microRNA 208a [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406990>
- [11] MIR208B microRNA 208b [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100126336>
- [12] Weiss A, Leinwand LA. The mammalian myosin heavy chain gene family. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 1996; 12:417-439.
- [13] Callis TE, Pandya K, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest. 2009;119(9):2772-86.
- [14] Van Rooij E, Sutherland LB et al. Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA Science. 2007; 27:316(5824):575-9.
- [15] Van Rooij E, Olson EN MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. J Clin Invest. 2007; 117(9): 2369-2376.
- [16] Liu L, Aguirre SA et al. miR-208a as a biomarker of isoproterenol-induced cardiac injury in Sod2^{+/-} and C57BL/6J wild-type mice. Toxicol Pathol. 2014;42(7):1117-29.
- [17] Sayed ASM, Xia K et al.. Circulating microRNAs: A Potential Role in Diagnosis and Prognosis of Acute Myocardial Infarction Dis Markers. 2013; 35(5): 561–566.

- [18] Wilson KD, Shen P et al. A rapid, high-quality, cost-effective, comprehensive, and explandable targeted next-generation sequencing assay for inherited heart diseases. *Circ Res* 2015;117:603-11.
- [19] MIR499A microRNA 499a [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/574501>
- [20] Evan Rooij E, Marshall WS et al. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 2008;103:919-28.
- [21] Yeung F, Chung E, et al. Myh7b/miR-499 gene expression is transcriptionally regulated by MRFs and Eos. *Nucleic Acids Res* 2012;40:7303-18.
- [22] Adachi T, Nakanishi M, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2010;56:1183-5.
- [23] Zhang L, Chen X et al. Circulating miR-499 are novel and sensitive biomarker of acute myocardial infarction. *J Thorac Dis* 2015;7:303-8.
- [24] Chen X, Zhang L et al. Kinetics of plasma microRNA-499 expression in acute myocardial infarction. *J Thorac Dis* 2015;7:890-6.
- [25] Li X, Wang J et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1. *PLoS One* 2013;8:e74504.
- [26] Hosoda T, Zheng H et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation* 2011;123:1287-96.
- [27] Li J, Dong X, et al. MicroRNA-1 in Cardiac Diseases and Cancers. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014;18:359-63.
- [28] MIR1-1 microRNA 1-1 [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406904>
- [29] MIR1-2 microRNA 1-2 [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406905>
- [30] Chen JF, Mandel EM et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 2006;38:228-33.
- [31] Tao G, Martin JF. MicroRNAs get to the heart of development. *Elife* 2013;2:e01710.
- [32] Terentyev D, Belevych AE et al. miR-1 overexpression enhances Ca(2+) release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circ Res* 2009;104:514-21.
- [33] Turner C, Hilton-Jones D. Myotonic dystrophy: diagnosis, management and new therapies. *Curr Opin Neurol* 2014;27:599-606.
- [34] Yang B, Lin H et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;13:486-91.
- [35] Long G, Wang F et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction. *Int J Biol Sci* 2012;8:811-8.
- [36] Li YQ, Zhang MF, et al. Comparing the diagnostic values of circulating microRNAs and cardiac troponin T in patients with acute myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68:75-80.
- [37] Liu N1, Bezprozvannaya S et al. MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008 Dec; 22(23):3242-54.
- [38] MIR133A1 microRNA 133a-1 [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406922>
- [39] MIR133A2 microRNA 133a-2 [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406923>
- [40] MIR133B microRNA 133b [Homo sapiens (human)] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/442890>
- [41] Abdellatif M. The role of miR-133 in cardiac hypertrophy uncovered. *Circ Res.* 2010 Jan; 106(1): 16–18.
- [42] Izarra A, Moscoso I et al. miR-133a Enhances the Protective Capacity of Cardiac Progenitors Cells after Myocardial Infarction. *CellPress.* 2014 dec; 3(6): 1029-1042.
- [43] Cameron V.A, Pilbrow A.P. Circulating MicroRNAs as Biomarkers in Coronary Heart Disease and Heart Failure microRNA. *Diagn. Ther.* 2014; 1: 58–74.
- [44] Yuri D'Alessandra , Paolo Devanna et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal* (2010) 31, 2765–2773 . doi:10.1093/eurheartj/ehq167.
- [45] Wang G., Zhu J. et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *European Heart Journal* (2010)31, 659–666
- [46] Xu Ji, Rie Takahashi et al Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clinical Chemistry* (2009)55:11.