

Los microRNAs como potenciales biomarcadores diagnósticos

Joan-Carles Vallvé ^{1*}, Dídac Llop¹

1- Facultat de Medicina (URLA), Universitat Rovira i Virgili, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), CIBERDEM, ISCIII
Reus, Catalonia, Spain.

* Corresponding author: Joan-Carles Vallvé, PhD, Facultat de Medicina, Universitat Rovira i Virgili. Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain. (jc.vallve@urv.cat) Telf: +34977759367

FUENTE DE FINANCIACIÓN:

El presente trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III a través del proyecto "FIS PI20/00443", cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional; "Una manera de hacer Europa" y la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA-FEA).

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no presentan relación financiera o personal que pueda suponer un conflicto de intereses

MicroRNAs as potential diagnostic biomarkers

El diagnóstico temprano de muchas enfermedades es uno de los mayores retos de la medicina actual. Además, en algunas patologías, un diagnóstico inequívoco y definitivo es clave para mejorar la prognosis de los pacientes afectados. Si bien es cierto que actualmente existen muchos biomarcadores óptimos para el diagnóstico de muchas enfermedades comunes, no es menos cierto que otros biomarcadores que se están utilizando presentan características que los hacen poco apropiados, tales como una baja sensibilidad o especificidad, una obtención a partir de técnicas invasivas que ocasionan incomodidad, malestar o incluso cierto riesgo para el paciente y un coste elevado que restringe su uso de forma general. Por este motivo, hay un gran interés en la comunidad científica en encontrar nuevos biomarcadores que suplan estas deficiencias y sean efectivos para el diagnóstico de las diferentes enfermedades que afectan a la población. Las características de un buen biomarcador diagnóstico están bien establecidas: debe presentar una buena especificidad y sensibilidad, debe poder cuantificarse fácilmente a partir de técnicas no invasivas, debe ser medible de forma rápida y económica y debe presentar estabilidad *in vivo* y una vez almacenado. Los microRNAs (miRNAs), al cumplir estas características, se han propuesto como potenciales biomarcadores de enfermedad.

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de unos 17 a 25 nucleótidos que se caracterizan por no codificar para proteínas, pero aun así ser claves en la regulación genética celular. Se sintetizan activamente por las células y su biogénesis está altamente regulada. Los miRNAs maduros funcionales actúan controlando la expresión génica de manera postranscripcional uniéndose a los RNAs mensajeros de sus genes diana y de esta forma, promover su degradación o inhibir su traducción, evitando en ambos casos su expresión. Este mecanismo de control de la expresión se engloba dentro del campo de la regulación epigenética dado que no induce cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA o en el número de copias de éste. En la actualidad hay descritos más de 2200 miRNAs que se encargan de ajustar con precisión la traducción de hasta aproximadamente un 60% de los genes codificantes de proteínas en humanos. Pero además de regular genes diana intracelulares, los miRNAs, bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas, pueden ser liberados al plasma sanguíneo de forma activa o

pasiva presentando una expresión anómala que puede cuantificarse. Este hecho permite postular a los miRNAs como potenciales biomarcadores de enfermedad.

Los miRNAs circulantes cumplen con los requerimientos comentados anteriormente para considerarse como biomarcadores ideales para muchas patologías clínicas. En plasma, aunque se pudiera pensar lo contrario, presentan una gran estabilidad dado que están protegidos de la degradación por las ribonucleasas plasmáticas, gracias a que son liberados encapsulados en estructuras lipídicas tales como microvesículas y exosomas o formando complejos con proteínas como con la lipoproteína de alta densidad (en inglés *HDL*). Además, el plasma es un fluido corporal fácilmente accesible, de manera que la cuantificación de miRNAs en él garantiza una obtención de muestras mediante técnicas muy poco invasivas y con muy poco riesgo para los pacientes. Por otra parte, los miRNAs también presentan una alta sensibilidad y especificidad. En este sentido, los niveles de los miRNAs circulantes son sensibles y variables en función de la progresión de la enfermedad de estudio. Además, son liberados al plasma por tejidos o células específicas de la patología de estudio, como por ejemplo, los miRNAs específicos de diferentes tipos de tumores¹. Por otra parte, si bien es cierto que el campo de los miRNAs es relativamente nuevo, las técnicas para aislar y cuantificar DNA y RNA llevan muchos años aplicándose en los laboratorios de investigación básica. Actualmente, la técnica de referencia ("*gold-standard*") para la cuantificación de los miRNAs es la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa (en inglés *RT-qPCR*). Esta técnica ha evolucionado muchísimo en los últimos años, tanto desde el punto de vista de la optimización de los reactivos como de los equipos de medida, y esto ha permitido el diseño de ensayos semiautomáticos, la reducción del tiempo de medida y su coste. Aun así, el balance coste-efectividad para la mayoría de miRNAs como biomarcadores diagnóstico no está todavía optimizado y esto repercute en impacto negativo para su aplicación en la práctica clínica de rutina. Si bien, como hemos comentado, los costes para su cuantificación se han reducido considerablemente, los datos existentes para su aplicación son todavía preliminares. Sin embargo, estudios recientes han mostrado diferentes test de miRNAs coste-efectivos para diagnosticar patologías como el cáncer gástrico o el de mama^{2,3}.

Este rápido avance de la tecnología ha permitido progresar a un ritmo tan elevado la investigación sobre los miRNAs que casi en cualquier ámbito de la patología médica existen estudios que los han propuesto como biomarcadores diagnósticos. El reto en este tipo de estudios está en identificar de forma precisa y reproducible los miRNAs individuales, o un conjunto de ellos, asociados a patologías concretas para poder utilizarlos como sus biomarcadores diagnósticos. Las mayores evidencias se han descrito en áreas específicas como la oncología, o las enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, infecciosas o neurológicas, siendo en el campo oncológico y cardiovascular dónde las evidencias son más sólidas. En el ámbito cardiovascular, los miRNAs circulantes se han propuesto como biomarcadores de enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca, miocardiopatía y remodelación cardíaca. Sin el objetivo de hacer un repaso exhaustivo, el miRNA-133a se ha descrito como biomarcador diagnóstico y como diana terapéutica prometedora de infarto de miocardio⁴. En la misma línea, se ha observado que la expresión elevada de miRNAs como el 1254 o 499 podrían tener una importancia diagnóstica en pacientes con insuficiencia cardíaca⁵ y también que aumentos de miRNA-145 presentan una alta capacidad diagnóstica de enfermedad coronaria con valores de área bajo la curva del análisis ROC de 0,95⁶. También se han descrito diversos miRNAs biomarcadores de enfermedad cardiovascular en ciertas enfermedades inflamatorias o metabólicas. Por ejemplo, miRNAs como el 425-5p y el 451 se han asociado diferencialmente en hombres y mujeres a alteraciones en los valores del grosor de la íntima media carotídea en pacientes con artritis reumatoide y se consideran potenciales marcadores diagnóstico de enfermedad cardiovascular en pacientes con esta enfermedad⁷. Del mismo modo, también se ha visto que miRNAs como el 144, 150 o 320, entre otros, podrían tener un papel crucial en el diagnóstico precoz y la progresión de la cardiomiopatía diabética⁸.

En el campo de la oncología, es dónde existen datos más consistentes, diferentes estudios han mostrado que la expresión alterada de miRNAs en tejidos está asociada a la aparición y el desarrollo de tumores. Estos miRNAs pueden actuar como protooncogenes o como genes supresores de tumores. Muchos estudios se han centrado en la precisión de los miRNAs circulantes como marcadores diagnósticos de

diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, y solo por citar algunos, un meta-análisis reciente mostró que la sensibilidad y especificidad de los miRNA-497 y miRNA-199 en el diagnóstico del mieloma múltiple eran del 86% y 96% y del 80% y 80%, respectivamente⁹. Otro ejemplo es el miRNA-200c, el cual mostró una alta precisión diagnóstica para el cáncer de ovario, con una sensibilidad del 84% y una especificidad del 83%¹⁰. Además, se ha propuesto que las firmas de expresión plasmáticas de diferentes miRNAs serían incluso más efectivas como biomarcadores diagnósticos que los resultados de expresión de miRNAs individuales. Por ejemplo, se ha descrito una firma de 6 miRNAs plasmáticos para el diagnóstico del cáncer de pulmón¹¹. Entre otras, también se ha descrito una firma, en este caso de 5 miRNAs séricos, capaz de diferenciar pacientes con cáncer de mama maligno de pacientes con tumores benignos¹². Existen otros estudios en este mismo sentido. Por ejemplo, se ha descrito que los niveles de expresión circulantes del miR-1246 están elevados en pacientes con mieloma múltiple comparados con controles y que su valor diagnóstico es elevado con una sensibilidad del 87% y una especificidad del 95%¹³. Además, también se ha descrito que los valores elevados de miRNA-199a-5p y miRNA 627-5p son potenciales valores diagnósticos de neoplasias colorrectales con una capacidad muy alta de discriminar los pacientes de los controles con áreas bajo la curva ROC de 0,83 y 0,9¹⁴.

Los miRNAs pueden indudablemente ayudar en el proceso diagnóstico ya que conocer, por ejemplo, qué miRNA está implicado en un tipo de cáncer concreto y conocer su papel ayudaría no solo en el diagnóstico de la patología y en la correcta estratificación de los pacientes según su riesgo sino también podría ayudar al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. En este sentido, existen ya ensayos clínicos en humanos de fármacos dirigidos sobre miRNAs implicados, por ejemplo, en AR. En concreto, el fármaco ABX464 (obefazimod) está diseñado para aumentar la expresión del miRNA-124 que se encarga de inhibir la activación de los monocitos y macrófagos y reducir la síntesis de diferentes mediadores de la inflamación implicados en enfermedades inflamatorias como la AR¹⁵.

Estos estudios descritos en el campo cardiovascular y oncológico son sólo unos ejemplos de los muchos datos existentes, en estos y en otros campos, que se pueden encontrar detallados en excelentes revisiones al respecto^{16,17}. Sin embargo, también

existen datos con resultados heterogéneos que a día de hoy muestran una dificultad en la reproducibilidad y consistencia del uso de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos de enfermedad¹⁸. Solo por citar algunos, se ha demostrado que un mismo miRNA, en concreto el miRNA-214 presenta datos de sensibilidad y especificidad muy variables entre diferentes estudios que lo evalúan como marcador pronóstico de mieloma¹⁹. Otro ejemplo es el miRNA-21, que aunque diversos estudios muestran que su expresión está incrementada en pacientes con cáncer de mama, su sensibilidad hasta el momento no es uniforme²⁰.

Las causas de los resultados heterogéneos pueden ser diversas, desde el tipo de diseño del estudio o la falta de poder estadístico, hasta la falta de validación de los resultados en cohortes independientes. Pero sin duda, uno de los problemas más importantes de la falta de reproducibilidad en los estudios sobre los miRNAs como biomarcadores es la necesidad de estandarización de todo el proceso; desde la obtención y selección del tipo de muestra, su transporte y almacenamiento, hasta, y de forma crucial, la metodología de cuantificación utilizada. Sin el objetivo de profundizar excesivamente en este aspecto, factores clave de este proceso son el límite de detección de la técnica, el rango dinámico de la medida y los controles internos y endógenos normalizadores utilizados. Además, no hay que olvidar que el uso de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos de enfermedad está aún en sus inicios y para poderlos incorporar como biomarcadores diagnósticos de patologías es también necesario avanzar en el conocimiento de la modulación de los niveles plasmáticos de miRNAs circulantes por parte de factores como la edad, el sexo, la raza, etc.

A pesar de estos inconvenientes, los miRNAs circulantes presentan las características asociadas a un óptimo biomarcador diagnóstico y aunque los protocolos actuales requieran, tal y como hemos comentado, de una estandarización para su uso en la práctica clínica, existen suficientes evidencias científicas para proponer estas moléculas como prometedoras herramientas útiles en el futuro. Es solo cuestión de tiempo de que se automaticen y se estandaricen totalmente las técnicas de medida y cuantificación para que los miRNAs se determinen de forma rutinaria en los laboratorios clínicos tal y como se lleva haciendo desde hace tiempo en los laboratorios de investigación básica. Además, la incorporación de los miRNAs como una estrategia más

eficaz y segura en el diagnóstico de las patologías aportará un enfoque más novedoso en este campo para aproximarlo a la denominada medicina personalizada de precisión.

BIBLIOGRAFÍA

1. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
2. Kapoor R, So JBY, Zhu F, Too HP, Yeoh KG, Yoong JSY. Evaluating the Use of microRNA Blood Tests for Gastric Cancer Screening in a Stratified Population-Level Screening Program: An Early Model-Based Cost-Effectiveness Analysis. *Value Heal*. 2020;23:1171–9.
3. Salim DB, Kandaswamy DA, MV DA, Vijayakumar DM, R DA. micro RNA based cancer screening by blood test: a review. *Public Heal Rev Int J Public Heal Res*. 2018;5:16–25.
4. Xiao Y, Zhao J, Tuazon JP, Borlongan C V., Yu G. MicroRNA-133a and Myocardial Infarction. *Cell Transplant*. 2019;28:831–8.
5. Çakmak HA, Demir M. Microna and cardiovascular diseases. *Balkan Med J*. 2020;37:60–71.
6. Abdallah HY, Hassan R, Fareed A, Abdelgawad M, Mostafa SA, Mohammed EA-M. Identification of a circulating microRNAs biomarker panel for non-invasive diagnosis of coronary artery disease: case–control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22.
7. Taverner D, Llop D, Rosales R, Ferré R, Masana L, Vallvé JC, et al. Plasma expression of microRNA-425-5p and microRNA-451a as biomarkers of cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep*. 2021;11.
8. Deng J, Liao Y, Liu J, Liu W, Yan D. Research Progress on Epigenetics of Diabetic Cardiomyopathy in Type 2 Diabetes. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9.
9. Gao SS, Wang YJ, Zhang GX, Zhang WT. Potential diagnostic value of circulating miRNA for multiple myeloma: A meta-analysis. *J Bone Oncol*. 2020;25:100327.
10. Ankasha SJ, Shafiee MN, Wahab NA, Ali RAR, Mokhtar NM. Oncogenic role of mir-200c-3p in high-grade serous ovarian cancer progression via targeting the 3'-untranslated region of dlc1. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18.
11. Wani JA, Majid S, Imtiyaz Z, Rehman MU, Alsaffar RM, Shah NN, et al. MiRNAs in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2022;12:1610.
12. Wu HJ, Chu PY. Current and Developing Liquid Biopsy Techniques for Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14.
13. Zhao G, Jing X, Li Z, Wu X, Gao Z, Ma R. The diagnostic and prognostic values of circulating miRNA-1246 in multiple myeloma. *Hematology*. 2022;27:778–84.
14. Zhao D-Y, Zhou L, Yin T-F, Zhou Y-C, Zhou G-Y-J, Wang Q-Q, et al. Circulating miR-627-5p and miR-199a-5p are promising diagnostic biomarkers of colorectal neoplasia. *World J Clin Cases*.

2022;10:5165–84.

15. Daien C, Krogulec M, Gineste P, Steens J-M, Desroys du Roure L, Biguenet S, et al. Safety and efficacy of the miR-124 upregulator ABX464 (obefazimod, 50 and 100 mg per day) in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate and/or anti-TNF α therapy: a placebo-controlled phase II study. *Ann Rheum Dis.* 2022;81:annrheumdis-2022-222228.
16. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells.* 2020;9.
17. Wang X, He Y, MacKowiak B, Gao B. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Gut.* 2021;70:784–95.
18. Li J, Zhang M, Wang C. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Lab Anal.* 2020;34.
19. Xiang Y, Zhang L, Xiang P, Zhang J. Circulating miRNAs as Auxiliary Diagnostic Biomarkers for Multiple Myeloma: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Recommendations. *Front Oncol.* 2021;11:698197.
20. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2020;20:409–20.