

## **“Utilidad de los MiRNAs como biomarcadores en el diagnóstico del asma”**

Dr. Manuel Rial Prado.

*Servicio de Alergología. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña.*

Los eosinófilos son granulocitos diferenciados que desempeñan un papel clave en la patogénesis del asma. En procesos alérgicos y en el asma estas células son reclutadas a la vía aérea desde la médula ósea a través del torrente sanguíneo<sup>1</sup>. Una vez en las vías respiratorias, los eosinófilos liberan proteínas catiónicas, citoquinas, quimiocinas y mediadores lipídicos contenidos en sus gránulos citoplásmicos<sup>2</sup>. Estas moléculas pueden actuar sobre otras células y sobre los propios eosinófilos, y puede contribuir a la perpetuación de la inflamación y el daño tisular<sup>3</sup>.

Los eosinófilos pueden liberar exosomas que contienen una gran cantidad de proteínas y microRNAs (miRNAs) que serán transferidos a las células receptoras. De esta manera los eosinófilos pueden transportar miRNAs a otras células.

Los miRNAs son secuencias de ARN de cadena simple de 19-24 nucleótidos de longitud que no se traducen en proteínas. Actúan como reguladores de la expresión génica al unirse a la región 3' no traducible del ARNm diana (región UTR), lo que resulta en la inhibición de la traducción de proteínas o degradación de ARNm. Los MiRNAs tienen diferentes perfiles de expresión dependiendo del tipo de célula y estado de la enfermedad. Los miRNAs presentes en suero son muy estables y resistentes a las RNasas sanguíneas y se ha descrito que algunos están diferencialmente expresados en varias patologías respiratorias<sup>4</sup>. Todas estas características hacen a los miRNAs un campo emergente en el asma alérgica, concretamente como posibles biomarcadores.

El asma es una enfermedad que cuesta en España 3.022 millones de euros anuales, diagnosticando por síntomas compatibles<sup>5</sup>, esto hace que sea de gran utilidad y necesario encontrar un posible biomarcador diagnóstico con una elevada sensibilidad y especificidad para poder disminuir el sobre tratamiento y el sobre diagnóstico. El objetivo de estas líneas es traer la información disponible del grupo de investigación en el que trabajo sobre la expresión diferencial entre miRNAs de individuos sanos y asmáticos, y para evaluar si la expresión de los microRNAs en suero se puede utilizar como biomarcador de diagnóstico y seguimiento en individuos asmáticos.

Se han publicado estudios que investigan la expresión diferencial de miRNAs en fluidos biológicos entre pacientes con asma y controles, al igual que su papel en los subconjuntos de células inmunitarias. En estos estudios<sup>6</sup>, se ha abordado el desarrollo de miRNAs como marcadores de respuesta al tratamiento. El miRNA-146a se ha implicado en la autoinmunidad y la inflamación alérgica y el miRNA-155 en el desarrollo de la atopía<sup>6</sup>. Estos hallazgos recientes necesitan ser confirmados, pero adelantan que los miRNAs pueden tener un papel potencial como biomarcadores del estado de la enfermedad o como respuesta al tratamiento. El uso de los miRNAs como terapia para el asma quedaría por determinar y su uso como dianas terapéuticas en el pulmón no está claro.

En el trabajo realizado por el grupo de Inmunología y Alergia del Instituto de investigación sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz<sup>7</sup> para identificar las diferencias de miRNA en eosinófilos de sujetos asmáticos y sanos, analizaron el miRNAome en 6 muestras de eosinófilos de asmáticos y 4 muestras de individuos sanos. Los investigadores observaron 539 miRNAs maduros en eosinófilos y 24 de ellos se expresaron diferencialmente entre ambos tipos de eosinófilos (sanos y asmáticos).

De estos, 14 estaban “upregulados” en eosinófilos de asmáticos y los otros 10 estaban regulados a la baja. Estos resultados obtenidos por la técnica NGS (Next generation sequencing) fue validada por PCR cuantitativa (qPCR).

Para evaluar si la firma de MiRNAs podría usarse como un biomarcador, analizaron si se conservaba en suero. Analizaron los 14 miRNAs en sueros de 138 pacientes asmáticos y 39 sujetos sanos. De los 14 miRNAs, miR-1246, miR144-5p, miR-320a, miR-185-5p y miR-21-5p se encontraron regulados al alza en los sueros de pacientes asmáticos en comparación con los controles sanos. La calidad del biomarcador de cada miRNA para el diagnóstico de asma se determinó mediante la curva ROC, estableciendo un área bajo el valor de la curva (AUC) por encima de 0.7. El miR-185-5p resultó como el mejor biomarcador de asma, con un AUC de 0,78, seguido de miR-320a (AUC = 0,72). El miR-185-5p mostró en esta población un mejor rendimiento diagnóstico que la periostina sérica, un biomarcador descrito anteriormente (AUC 0,56). Los autores también quisieron estudiar si estos miRNAs tenían una expresión diferente en el grupo asmático dependiendo de la gravedad de la enfermedad. La expresión de miR-185-5p estaba relacionada con la gravedad, ya que es mayor en los asmáticos intermitentes y leves en comparación con los controles, e incluso ligeramente mayor en los asmáticos persistentes moderados y severos. Cuando analizaron las curvas ROC, solo miR-185-5p tiene un AUC superior a 0.7 cuando se compara cada subgrupo de gravedad con individuos sanos. Cuando estudiaron si la expresión de este miRNA tenía alguna relación con otros indicadores de gravedad, la expresión de miR-185-5p era mayor en pacientes con asma de inicio en la edad adulta (> 18 años) en comparación con el asma de inicio precoz, y también era mayor en pacientes que ingresaron al menos una vez en la unidad de cuidados intensivos. Otro miRNA que podría estar relacionado con la gravedad de la enfermedad es miR-1246, que está altamente incrementada su expresión en los eosinófilos de los asmáticos en comparación con los controles y además encontraron una sobreexpresión en los pacientes tratados con antileucotrienos en comparación con los asmáticos no tratados (P <0.01). Cuando estudiaron si había diferencias en la expresión de los miRNAs cuando se compararon pacientes asmáticos con o sin pólipos nasales, sinusitis, rinitis o atopía, no se

observaron diferencias estadísticamente significativas. Otro hallazgo interesante que encontraron los autores fue una correlación significativa entre la expresión de algunos miRNAs y valores espirométricos como la capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEMS). Estos resultados podrían sugerir que a una mayor expresión de estos miRNAs habría un mayor empeoramiento de los valores espirométricos.

Para una mejor discriminación entre asmáticos y sanos, los autores crearon un modelo de regresión logística multivariable utilizando los valores de corte de miR-185-5p, miR-1246 y miR-144-5p. El modelo que combina estos tres miRNAs mostró un AUC de 0,86, con una sensibilidad de 0,89 y una especificidad de 0,77. También crearon dos modelos de Random Forest, un método de aprendizaje automático supervisado utilizado para la clasificación de muestras según un conjunto de variables, en este caso la expresión de los miRNAs en suero. El primer modelo se ejecutó para discriminar entre el estado de salud y el de asma, y el segundo para crear un modelo predictivo para clasificar a los sujetos en función de la gravedad de la enfermedad asmática (intermitente, leve persistente, persistente moderada y persistente grave). Al usar miR-185-5p, miR-320a y miR-320b en el primer modelo, fueron capaces de clasificar a los sujetos en asmáticos o sanos con un AUC de 0.84 y una sensibilidad y especificidad de 0.75. En el segundo modelo, encontraron que la expresión de miR-320a, miR-185-5p y miR-144-5p puede clasificar a los sujetos en función de la gravedad con un AUC de 0,75, una sensibilidad de 0,5 y una especificidad de 0,87. En resumen, este es el primer estudio que muestra el perfil de expresión diferencial de miRNA en eosinófilos asociados con la patología del asma. Además, algunos de estos miRNAs se encontraban en el suero y se podrían integrar en modelos estadísticos para el diagnóstico de asma.

Para poder establecer si los MiRNAs son estables a lo largo del tiempo cuando la enfermedad asmática se mantiene estable, se diseñó un nuevo estudio, en el que se utilizó otra cohorte de pacientes distinta<sup>8</sup>, utilizando las sondas de MiRNAs arriba mencionadas. Fueron seleccionados 20 pacientes asmáticos de manera arbitraria, en estos pacientes, los miRNAs se midieron mediante PCR cuantitativa. Estos mismos miRNAs se han vuelto a medir entre seis y 12 meses más tarde en las visitas de seguimiento. No se hicieron cambios en el tratamiento recibido para el asma. Las mismas mediciones se realizaron en pacientes sanos (no asmáticos, no atópicos) y los resultados obtenidos se compararon entre pacientes sanos y asmáticos y entre asmáticos en visita basal y en las visitas de seguimiento. Al hacer el análisis estadístico para datos pareados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en asmáticos al inicio del estudio y en las visitas de seguimiento en ninguno de los miRNAs analizados. Al comparar los datos en pacientes sanos (no asmáticos, no atópicos) versus pacientes asmáticos al inicio del estudio, se encontró una sobreexpresión estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ) de los miRNAs miR-1246 y miR-320-a en pacientes asmáticos. La falta de diferencias significativas entre la visita basal y las visitas de seguimiento en pacientes asmáticos (para quienes no se realizaron cambios terapéuticos) significa que los miRNAs permanecen estables a lo largo del tiempo en el mismo paciente, cuando la enfermedad asmática permanece estable. A su vez, se ha encontrado una sobreexpresión en pacientes asmáticos versus sanos en miRNAs 1246, 320-a y 320-b, por lo que podrían tener un papel como biomarcadores de diagnóstico en el asma, además estos mismos miRNAs también salían sobreexpresados en el trabajo ya comentado<sup>7</sup>, lo que hace estos resulta-

dos reproducibles. Este es el primer estudio que muestra la estabilidad de los miRNAs a lo largo del tiempo en sujetos asmáticos. Además, algunos de estos miRNAs están sobreexpresados en pacientes asmáticos versus sanos, por lo que podrían integrarse como biomarcadores para el diagnóstico de asma.

## Referencias:

1. Johansson MW. Eosinophil Activation Status in Separate Compartments and Association with Asthma. *Front Med* 2017;4:75.
2. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2012;13:9-22.
3. Melo RCN, Liu L, Xenakis JJ, Spencer LA. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. *Allergy* 2013;68:274-284.
4. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:10513-10518.
5. Martínez-Moragón E, Serra-Batlles J, De Diego A, Palop M, Casan P,
6. Rubio-Terrés C et al. Economic cost of treating the patient with asthma in Spain: the AsmaCost study. *Arch Bronconeumol*. 2009 Oct;45(10):481-6.
7. Perry MM, Adcock IM, Chung KF. Role of microRNAs in allergic asthma: present and future. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015 Apr;15(2):156-62.
8. Rodrigo-Muñoz JM, Cañas JA, Sastre B, Rego N, Greif G, Rial M et al. Asthma diagnosis using integrated analysis of eosinophil microRNAs. *Allergy*. 2018 Jul 24. doi: 10.1111/all.13570. [Epub ahead of print]
9. Muñoz X, Álvarez-Puebla MJ, Arismendi E, Arochena L, Ausín MDP, Barranco P et al. The MEGA Project: A Study of the Mechanisms Involved in the Genesis and Disease Course of Asthma. *Asthma Cohort Creation and Long-Term Follow-Up*. *Arch Bronconeumol*. 2018 Mar 19. pii: S0300-2896(18)30009-7. doi: 10.1016/j.arbres.2017.12.012. [Epub ahead of print]