

Giner M^{1,2}, Montoya MJ³, Vázquez MA³, Miranda C¹, Miranda MJ¹, Pérez-Cano R^{1,3}

1 Unidad de Metabolismo Óseo - UGC Medicina Interna - Hospital Universitario Virgen Macarena - Sevilla (España)

2 Departamento Citología e Histología Normal y Patológica - Facultad Medicina - Universidad de Sevilla (España)

3 Departamento Medicina - Facultad de Medicina - Universidad de Sevilla (España)

¿Qué son los microARNs? Posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000100007>

Correspondencia: Mercè Giner - Departamento Citología e Histología Normal y Patológica - Facultad Medicina - Universidad de Sevilla - Avda. Dr. Fedriani, s/n - 41009 Sevilla (España)

Correo electrónico: mginer@us.es

Fecha de recepción: 17/07/2015

Fecha de aceptación: 17/11/2015

Resumen

Los micro-ARN (miRs) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Generalmente actúan sobre la expresión genética mediante el silenciamiento o degradación de los ARNm, y están implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular. Actualmente son un importante foco de interés para el estudio de diversas enfermedades como el cáncer o la diabetes *mellitus* tipo 2. A nivel del metabolismo óseo, están surgiendo diversos miRs implicados en su regulación, abriendo un campo de investigación importante para identificar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad osteoporótica, de su evolución, así como para diseñar nuevas terapias farmacológicas.

Palabras clave: *epigenética, micro-ARN, biomarcadores y osteoporosis.*

What are microRNAs? Potential biomarkers and therapeutic targets in osteoporosis

Summary

Micro-RNAs (miRs) are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression at post-transcriptional level. Generally, they act on gene expression by silencing or degrading mRNAs, and are involved in regulating various biological processes, such as cell differentiation, proliferation, apoptosis and in embryonic and tissue development. They are currently a major focus of interest in the study of various diseases such as cancer or type 2 diabetes mellitus. At level of bone metabolism, various miRs are emerging that are involved in their regulation, opening an important research field to identify new biomarkers for diagnosis of osteoporosis and its development, and to design new drug therapies.

Key words: *epigenetics, micro-RNA, biomarkers and osteoporosis.*

Introducción

Los miRs fueron descubiertos en 1993 al estudiar la regulación del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*¹. Son pequeñas moléculas de ARN (21-23 nucleótidos), no codificantes para proteínas que constituyen una extensa familia de genes reguladores postranscripcionales. Están implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular². Funcionan como un gen epigenético endógeno y, aunque generalmente silencian genes diferentes de aquellos de los cuales se han transcrito, existen también miRs con función promotora y/o coactivadora para otros genes³.

Desde su descubrimiento se han convertido en uno de los temas más estudiados en el campo de la regulación epigenética de las células, y actualmente se encuentra disponible gran cantidad de información que nos ha llevado a conocer mejor los procesos biológicos en los que están implicados. Todo ello ha hecho que recientemente sean un foco de interés para la medicina como dianas terapéuticas en multitud de enfermedades. Hasta el momento actual, han sido descritas más de 2.000 secuencias distintas de miRs en humanos, recogidas en la base de datos de miRBase (<http://www.mirbase.org>).

Los miRs representan solo un 2-3% del genoma humano, y se calcula que pueden regular la expresión de aproximadamente un 60% de los genes⁴. Un solo miR puede regular alrededor de 200 transcritos diferentes, pudiendo actuar cada uno en una vía celular distinta, así como un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples miRs^{5,6}.

La génesis de los miRs ha sido bien estudiada y caracterizada por varios autores⁷⁻⁹. En primer lugar, en el interior del núcleo los genes que codifican para miRs se transcriben en forma de precursores largos, dando lugar a los llamados miRs primarios, cuya longitud varía entre cientos de pares de nucleótidos. Este precursor es cortado por las ribonucleasas Drosha y Pasha/DGCR8 en una o más moléculas de ARN con forma de horquilla, transformándolo en premiRs de 60-70 nucleótidos. Los premiRs salen del núcleo hacia el citoplasma ayudados por la Exportina-5, donde tendrá lugar el proceso de maduración del miR. En el citoplasma, el premiR es transportado por el complejo RLC (RISC loading complex) formado por la RNasa Dicer, TRBP (proteína de unión a ARN en respuesta a transactivación), PRKRA (proteína quinasa activadora dependiente de ARN) y Ago2. Este complejo produce el clivaje del premiR generando un dúplex con una cadena madura de miR y su complementaria. La cadena madura junto con Ago2 formarán el complejo RISC (complejo silenciador inducido por ARN) y la cadena complementaria será eliminada. RISC se une con una molécula de ARNm (generalmente en la región 3' no traducida) que posee una secuencia complementaria a su componente miR y corta el ARNm, lo que lleva a la degradación del ARNm o a modificar su traducción. Algunos miRs también sirven como guías para la metilación de secuencias complementarias;

ambos procesos afectan a la transcripción. La biogénesis y el mecanismo por el cual los miRs regulan la expresión se ilustra en la figura 1.

La secuencia complementaria entre el ARNm y el miR es de tan solo 7 nucleótidos, con lo que se cree que cada miR podría potencialmente aparearse con cientos de ARNm diferentes. Del mismo modo, una única molécula de ARN podría tener múltiples sitios de unión a miRs. La inhibición de la traducción debe requerir la unión de varios complejos RISC a la misma molécula de ARNm¹⁰.

MicroARNs como biomarcadores

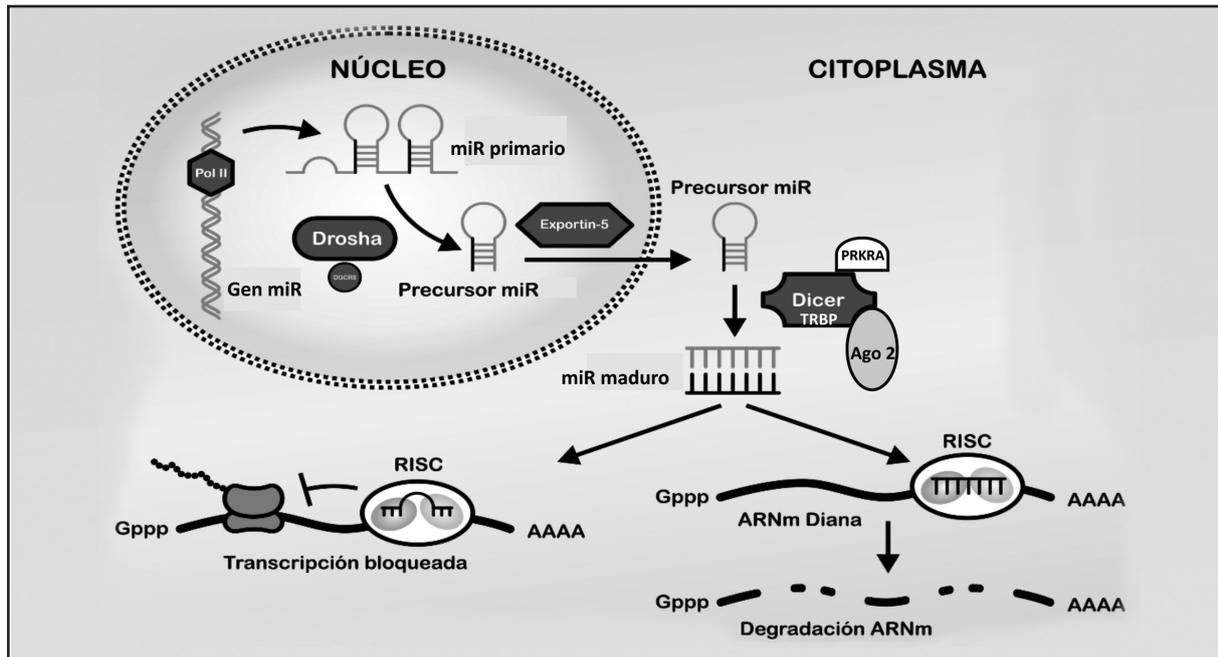
La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una disminución de la masa ósea y una alteración de su calidad, con deterioro de la microarquitectura, que lleva al aumento del riesgo de fracturas con traumatismos mínimos. A pesar de que actualmente disponemos de varias herramientas para evaluar el riesgo de fracturas osteoporóticas, muchos pacientes con bajo riesgo sufren fracturas y a la inversa. Los miRs podrían añadir información para mejorar la predicción de este riesgo. Uno de los desafíos en el campo de la osteoporosis es la detección precoz de la enfermedad osteoporótica, lo que permitiría una actuación temprana y la obtención de mejores resultados en los tratamientos. Para ello es necesario desarrollar métodos no invasivos más eficaces que sean predictores de la pérdida de masa ósea, del riesgo de fractura y/o de la respuesta terapéutica, y que nos permitan monitorizar y valorar la eficacia del tratamiento farmacológico.

En este sentido, los miRs pueden ser unos nuevos biomarcadores de gran interés, ya que se ha demostrado que son resistentes a la actividad RNasa en sangre periférica, lo que les confiere una elevada estabilidad en suero y plasma. Por otro lado, son reproducibles y tienen una elevada especificidad tisular entre individuos^{11,12}. Conocemos que los niveles de expresión de varios miRs varían con el envejecimiento, y que un miR específico puede tener un efecto positivo y negativo en una misma célula dependiendo de su estado de diferenciación¹³. Además, ya están descritas distintas alteraciones en la expresión de los miRs fuertemente relacionadas con la aparición y desarrollo de enfermedades como el cáncer, diabetes *mellitus* tipo 2, Alzheimer, osteoartritis, etc.^{14,15}, y su cuantificación ya está siendo utilizada como biomarcadores en el diagnóstico y progresión de dichas enfermedades¹⁶⁻¹⁸.

En estos últimos años han empezado a describirse distintos miRs relacionados con la enfermedad osteoporótica y/o el riesgo de fractura^{14,19-20}, aunque todavía los datos son escasos.

El miR-2861 ha sido el primer miR al que se le ha atribuido una implicación clínica en la osteoporosis humana²¹. El miR-2861 tiene como molécula diana una histona deacetilasa (HDAC5) la cual regula de manera negativa RunX2. Mutaciones en el *locus* que lo codifica inducen osteoporosis, y animales tratados con inhibidores de miR-286 presentan un fenotipo de baja masa ósea. Posteriormente se han descrito otros miRs que pueden desempeñar un papel importante en la regulación del metabo-

Figura 1. Biogénesis del micro-ARN



lismo óseo teniendo como diana a varios genes que codifican factores de transcripción cruciales en el remodelado óseo; sin embargo, aún se desconoce cuáles de ellos están relacionados con una mayor o menor tasa de recambio óseo y baja masa ósea. En las figuras 2a y 2b podemos observar los distintos miRs que actúan tanto a nivel de células de estirpe osteoblástica como osteoclastica²²⁻²⁸.

Entre los diversos miRs descritos hasta el momento actual cabe destacar el papel de algunos de ellos como posibles biomarcadores del riesgo de fractura osteoporótica en nuestra población. En concreto, encontramos que miR-21, miR-23a, miR-24, miR-25, miR-100, miR-125b, miR-518f y miR-328-3p se encuentran sobre-expresados en el suero de mujeres con fractura osteoporótica, mientras que la expresión de miR-187 se ve disminuida^{1,13,29}. Otros estudios apuntan a miR-194-5p y miR-133a como posibles biomarcadores asociados a la enfermedad osteoporótica, demostrando que en el suero de mujeres postmenopáusicas existen niveles más elevados de dichos miRs y, además, se correlacionan negativamente con la DMO de columna y de cuello de fémur^{20,30}.

A pesar de que cada vez conocemos un mayor número de miRs implicados en el metabolismo óseo y que conocemos mejor la función biológica y su mecanismo de acción, todavía desconocemos el mecanismo previo por el cual el miR llega a la circulación sanguínea, y su función en sangre tampoco es del todo bien conocida. Futuros estudios que aclaren ambos aspectos nos podrán ayudar a buscar nuevos y mejores biomarcadores y seleccionar con más criterio los ya propuestos.

También tenemos que tener en cuenta que, para el uso correcto de los miRs como biomarcadores en la práctica clínica, es necesario establecer previamente una estandarización metodológi-

ca en el proceso de recogida de la muestra y en las técnicas de normalización de la PCR *real-time*.

Los miRs como dianas terapéuticas

Los miRs juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo óseo. Variaciones en sus expresiones génicas pueden producir alteraciones en el remodelado óseo y tener consecuencias negativas en el esqueleto. Todo ello abre una nueva ventana de posibilidades para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas patologías óseas como la osteoporosis.

Actualmente la industria farmacéutica está investigando dianas farmacológicas dirigidas a normalizar los niveles tisulares de miRs específicos, silenciando aquellos que se sobre-expresan o aumentando sus niveles en aquellos que presentan un déficit. Los miRs pueden ser silenciados mediante las moléculas llamadas anti-miARNs (AMOs). Éstas son oligonucleótidos no codificantes sintéticos que inhiben competitivamente la interacción entre los miRs y su ARNm diana. Los AMOs más ampliamente utilizados son: 2'-O-methyl AMO, 2'-O-methoxyethyl AMO y el Locked Nucleic Acids (LNAs)³¹. Por otro lado, estamos observando a menudo que los miRs trabajan en grupo para regular los procesos patológicos, de manera que en lugar de diseñar distintos anti-miRs para un mismo tratamiento, se están desarrollando los llamados miRs "esponja", los cuales son capaces de fijar numerosos miRs a la vez.

Contrariamente, si lo que queremos es restaurar los niveles disminuidos de un miR, la estrategia es administrar miRs miméticos (miRmímics), que son moléculas de ARN de doble cadena alterados químicamente que imitan a los miRs endógenos. Al ser introducidos en las células, los miRmímics son reconocidos por la maquinaria de la biogénesis de los miRs y procesados como tal.

Figura 2a. Dianas y función de los micro-ARN sobre la diferenciación y proliferación de los osteoblastos

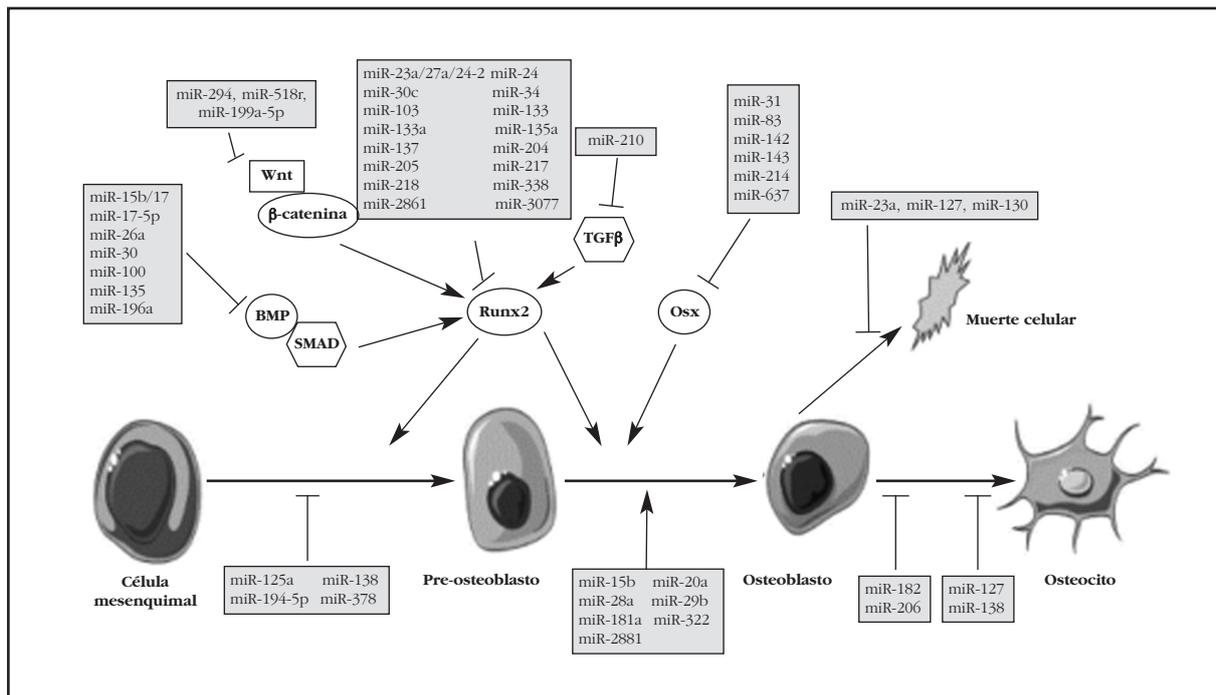
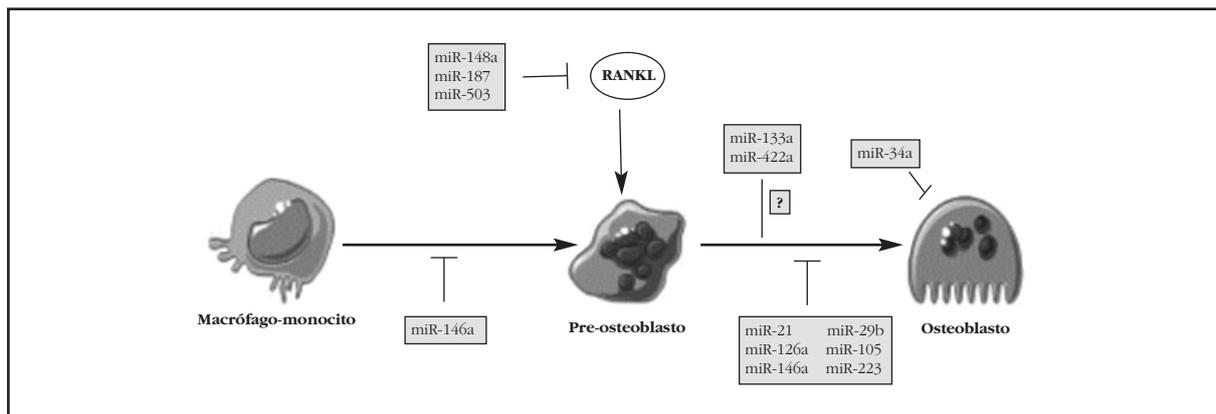


Figura 2b. Dianas y función de los micro-ARN sobre la diferenciación y proliferación de los osteoclastos



El uso de miRs como agentes farmacológicas ya está siendo habitual en algunas patologías tumorales y víricas³¹. En el momento actual, existen distintas moléculas farmacológicas con acción inhibitoria de miRs que están siendo utilizadas en fase II y III para el tratamiento de la hepatitis C, miR-1 (miravirsin)³² y RG-101³³.

En cuanto al campo del metabolismo óseo, los avances en terapia son menores. Únicamente podemos encontrar algunos estudios aislados que trabajan en modelos celulares o de animales. Cabe destacar un estudio reciente publicado en Nature en el que se señala al miR-34a como un nuevo supresor de la formación de osteoclastos y reabsorción ósea, lo que conlleva importantes implicaciones para el tratamiento de la osteoporosis o metástasis óseas. En este estudio se muestra cómo ratones con niveles aumentados de miR-34a tienen una mayor densidad ósea y menor tasa de fracturas óseas. Tras la inyección de nanopartículas que contienen el microARN,

se reduce tanto la pérdida de masa ósea en los ratones con osteoporosis postmenopáusia como la metástasis ósea en modelos de ratón de cáncer de mama o piel¹⁹. Wang *et al.* inyectaron anti-miR-214 en ratones y también observaron una menor pérdida de la masa ósea en los animales tratados¹⁵. Actualmente existen dos grandes limitaciones para el uso de los miRs como agentes farmacológicos. La primera es que un mismo miR suele tener diferentes genes diana a la vez y, además, puede comportarse como inhibidor o promotor, dependiendo del gen diana y del estadio de diferenciación celular del momento. Esta complejidad explica las dificultades en la predicción del espectro de acción y de los perfiles de toxicidad asociados a la terapia con miRs. Para evitar este aspecto, recientes investigaciones se centran en comprobar la estabilidad de los miRs y dirigir su acción a los tejidos o células diana. La segunda limitación es que los miRs no modificados pueden desencadenar reacciones inespecíficas del

interferón en los tejidos; la presencia de anti-miR o miRmímics modula la expresión de genes estimuladores del interferón, provocando alteraciones en la respuesta inmunológica.

Conclusiones

1. El papel de los miRs en la regulación génica es fundamental. Están implicados en la regulación de varios procesos biológicos como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular.

2. La expresión diferencial de los miRs induce cambios en la mayoría de las etapas del desarrollo del esqueleto, de manera que el proceso de remodelado óseo también se ve regulado por distintos miRs.

3. El estudio de los distintos perfiles diferenciales de la expresión de los miRs en las patologías del metabolismo óseo nos conducen a identificar nuevos biomarcadores de la enfermedad osteoporótica y de su evolución.

4. Teniendo en cuenta que los miRs tienen un papel crucial en el tejido óseo, su mejor conocimiento nos puede llevar a tener nuevas dianas terapéuticas.

5. La mejor comprensión de la biogénesis de los miRs y su papel en los procesos patogénicos nos ayudará a tener nuevas herramientas en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad osteoporótica, así como nuevas dianas terapéuticas.

Bibliografía

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;3;75:843-54.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;16;431:350-5.
- Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. *Bone* 2014;66:46-55.
- Cho WC. MicroRNAs as therapeutic targets and their potential applications in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:747-59.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495-500.
- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009;7:147-54.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432:235-40.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004;118:57-68.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, et al. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008;3:e3148.
- 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 U S A* 2008;105:10513-8.
- Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013;19:93-100.
- Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, et al. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2014;29:1718-28.
- Borgonio Cuadra VM, González-Huerta NC, Romero-Córdoba S, Hidalgo-Miranda A, Miranda-Duarte A. Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PLoS One*. 2014 Jun 5;9:e97690.
- Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 2010;101:2087-92.
- Chien HY, Lee TP, Chen CY, Chiu YH, Lin YC, Lee LS, et al. Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications. *J Chin Med Assoc* 2015;78:204-11.
- Jingsheng S, Yibing W, Jun X, Siqun W, Jianguo W, Feiyan C, et al. MicroRNAs are potential prognostic and therapeutic targets in diabetic osteoarthritis. *J Bone Miner Metab* 2015;33:1-8.
- Krzyszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, et al. miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature* 2014;512:431-5.
- Li H, Wang Z, Fu Q, Zhang J. Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers* 2014;18:1-4.
- Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009;119:3666-77.
- Kim KM, Lim SK. Role of miRNAs in bone and their potential as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* 2014;16:133-41.
- Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6139-44.
- Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng XH, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2014;9:e97098. doi:10.1371/journal.pone.0097098. eCollection 2014.
- Zuo B, Zhu J, Li J, Wang C, Zhao X, Cai G, et al. MicroRNA-103a functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit bone formation through targeting Runx2. *J Bone Miner Res* 2015;30:330-45.
- Wang Y, Li L, Moore BT, Peng XH, Fang X, Lappe JM, et al. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 2012;7:e34641.
- Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol* 2014;11:1355-63.
- Ell B, Kang Y. MicroRNAs as regulators of bone homeostasis and bone metastasis. *Bonekey Rep* 2014;3:549.
- Garmilla-Ezquerria P, Sañudo C, Delgado-Calle J, Pérez-Núñez MI, Sumillera M, Riancho JA. Analysis of the bone microRNome in osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2015;96:30-7.
- Meng J, Zhang D, Pan N, Sun N, Wang Q, Fan J, et al. Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *Peer J* 2015 May 21;3:e971. doi: 10.7717/peerj.971. eCollection 2015.
- van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res* 2012;110:496-507.
- Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013;368:1685-94.
- Regulus Therapeutics: RG-101 Targeting miR-122 for HCV [Internet]. A leading microRNA Therapeutics Company; [actualizado en 2015; acceso 1 julio 2015]. Disponible en <http://www.regulurx.com/therapeutic-areas/rg-101/>.