

La inhibición de miR-33a/b en primates no humanos incrementa los niveles plasmáticos de HDL y disminuye los triglicéridos de VLDL

Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, Ray TD, Sheedy FJ, Goedeke L, Liu X, Khatsenko OG, Kaimal V, Lees CJ, Fernandez-Hernando C, Fisher EA, Temel RE, Moore KJ. *Nature*. 2011;478:404-7.

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de mortalidad en los países desarrollados, a pesar de la existencia de tratamientos óptimos para la reducción de los niveles del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL). La búsqueda de nuevas terapias encaminadas a reducir este riesgo residual se ha centrado en el incremento de los niveles del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), con el objetivo de explotar sus efectos ateroprotectores. Los microARN (miARN) han emergido como importantes reguladores postranscripcionales del metabolismo lipídico y son, por lo tanto, una nueva diana para la intervención terapéutica. Los microARN-33a y microARN-33b (miR-33a/b) son miARN intrónicos cuya región codificante se encuentra dentro de los genes que codifican para las proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides SREBF2 y SREBF1, respectivamente. Estos miARN reprimen la expresión del transportador de colesterol ABCA1, un regulador clave de la biogénesis de las HDL. Estudios recientes en ratones sugieren que el antagonismo de miR-33a podría ser una estrategia efectiva para incrementar los niveles de HDL en plasma, confirmando por lo tanto protección frente a la aterosclerosis. No obstante, la extrapolación de estos resultados a humanos es complicada debido al hecho de que los ratones carecen de miR-33b, que solo se encuentra en el gen SREBF1 de mamíferos medianos y grandes. Aquí demostramos, en el mono verde africano, que la administración sistémica de oligonucleótidos anti-miARN que inhiben miR-33a y miR-33b simultáneamente, incrementan la expresión hepática de ABCA1 e inducen un incremento sostenido de los niveles plasmáticos de HDL en 12 semanas. Cabe destacar que el antagonismo de miR-33 en este modelo primate no humano también incrementó la expresión de genes diana de miR-33 implicados en la oxidación de ácidos grasos (*CROT*, *CPT1A*, *HADHB* y *PRKAA1*) y redujo la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos (*SREBF1*, *FASN*, *ACLY* y *ACACA*), resultando en una marcada supresión de los niveles plasmáticos de triglicéridos asociados a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), hecho que no se había observado previamente en el ratón. Estos datos demuestran, en un modelo que es de gran importancia para los seres humanos, que la inhibición farmacológica de miR-33a y miR-33b podría ser una estrategia terapéutica útil para incrementar los niveles plasmáticos de HDL y reducir los niveles de triglicéridos de VLDL en el tratamiento de las dislipemias que incrementan el riesgo cardiovascular.

Comentario

Los microARN (miR o miARN) son un tipo de ARN pequeño y no codificante que inhibe la expresión génica de manera específica y que participa en múltiples procesos biológicos esenciales, como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, aunque también se han asociado a procesos patológicos como las enfermedades cardiovasculares¹. Estas moléculas de ARN son inicialmente transcritas por la ARN polimerasa II en forma de transcritos largos, conocidos como miARN primarios. Estos son procesados en el núcleo para generar un miARN precursor, de unos 70-100 nucleótidos de longitud, que puede ser transportado fuera del núcleo, donde otra ARN polimerasa III generará dúplex de miARN maduros de 19-25 nucleótidos. Finalmente, estos complejos de miARN se disociarán en una sola cadena, y mientras una de las cadenas se incorporará al complejo de silenciamiento del ARN inducido (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*), la otra se degradará. El mecanismo implicado en la inhibición de la expresión por parte de los miARN parece ser la hibridación imperfecta entre el complejo RISC-miARN y el ARN mensajero diana, inhibiendo su traducción, o bien favoreciendo su degradación^{1,2}. No obstante, algunos estudios también han demostrado que el miARN maduro puede unirse a secuencias reguladoras del ADN para regular directamente la transcripción³. Por todo ello, el desarrollo de anti-miR y miméticos de miARN se ha postulado como una potencial herramienta farmacológica en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las cardiovasculares. Los anti-miR o antagomiR son oligonucleótidos anti-sentido con la secuencia reversa complementaria a los miARN diana, mientras que los miméticos de miARN son dúplex de ARN sintéticos en los cuales una cadena es idéntica al miARN maduro.

Un estudio previo de este mismo grupo, objeto de un comentario en esta misma sección del número de septiembre-octubre de la revista *Clinica e Investigación en Arteriosclerosis*, había descrito cómo la sobreexpresión de miR-33a/b reducía la expresión hepática de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos y la señalización de la insulina⁴. Este trabajo, antesala del que aquí se expone, demostraba que el miR-33a/b regula las vías que controlan 3 de los factores de riesgo para el síndrome metabólico: los niveles de HDL, los de triglicéridos, y la señalización de la insulina⁴. Esto sugería, por lo tanto, que los inhibidores de miR-33a/b podrían ser útiles para el tratamiento de las enfermedades metabólicas. Ahora, el estudio de Rayner et al. avanza un paso más y demuestra la utilidad terapéutica de un oligonucleótido anti-miR-33a/b en un modelo de mono verde africano. En humanos existen dos formas de miR-33: miR-33a, localizado en el intrón 16 del gen *SREBF2*, y miR-33b, localizado en el intrón 17 del gen *SREBF1*⁴. Por el contrario, en el ratón solo existe miR-33a, hecho que podría ser relevante en condiciones en las cuales la transcripción de *SREBF2* se encuentra incrementada, como sucede por ejemplo durante la resistencia a la insulina. Es por este motivo que el uso del mono verde africano como modelo animal en este estudio es muy interesante y necesario para poder sacar conclusiones extrapolables a los seres humanos.

En este estudio se explica cómo la administración sistémica en el mono, por vía subcutánea, de un oligonucleótido

anti-miR-33a/b induce la expresión hepática de ABCA1, proteína clave en el transporte reverso del colesterol desde los tejidos periféricos hacia las HDL, e incrementa los niveles plasmáticos de HDL de manera sostenida. Esto se explica porque miR-33a y miR-33b se transcriben conjuntamente con sus genes huésped *SREBF2* y *SREBF1*, respectivamente, regulando la homeostasis del colesterol de manera concertada con sus genes huésped y con los genes diana de estos, como son *ABCA1*, *ABCG1* y *NPC1L1*⁴. Asimismo, los autores describen un aumento en la expresión de genes diana de miR-33a/b implicados en la oxidación de ácidos grasos, y una reducción en la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos, resultando en una marcada supresión de los niveles plasmáticos de triglicéridos asociados a VLDL. Además, las HDL obtenidas de estos animales tratados con el anti-miR-33a/b eran más eficientes *in vitro* en cuanto a su capacidad para promover el transporte reverso del colesterol y en la protección que conferían a las células endoteliales de la inflamación inducida por citocinas. En conjunto, Rayner et al. demuestran que la inhibición farmacológica de miR-33 podría ser útil para reducir el riesgo residual lipídico en pacientes con enfermedad cardiovascular. Este riesgo residual se define como la presencia de complicaciones cardiovasculares en pacientes con un buen control del colesterol LDL, y se atribuye fundamentalmente a la presencia de niveles bajos de colesterol HDL y triglicéridos elevados. Es el caso, por ejemplo, del tratamiento con estatinas, la principal estrategia terapéutica para la hipercolesterolemia, que no evita completamente el riesgo residual de presentar episodios cardiovasculares adversos porque las estatinas tienen un efecto muy potente sobre las LDL, pero mucho menor o neutro sobre las HDL y los triglicéridos.

La ruta preferida de administración sistémica de los anti-miR terapéuticos es la vía subcutánea, pues facilita la diseminación eficiente a tejidos como el hígado, el riñón y el tejido adiposo. No obstante existen otras vías alternativas, como son la vía intravenosa, la intraperitoneal, la intratraqueal, la intracerebral o la intranasal, que se seleccionan básicamente en función del órgano diana deseado. Normalmente, la administración *in vivo* de anti-miR, incluyendo también la vía subcutánea, se realiza mediante la conjugación de estos con colesterol, para facilitar así su entrada a la célula³. Aquí, la conjugación con colesterol no sería viable, pues evidentemente esto podría alterar alguno de los parámetros lipídicos analizados en plasma. Alternativamente, los autores conjugan el anti-miR-33a/b con 2'-fluoro/metoxietil y fosforotioato (o S-oligos), dos modificaciones que incrementan su potencia y su viabilidad. No obstante, pueden existir otros problemas derivados de la administración sistémica, como son la alteración de la expresión del miARN en órganos o células sanas, la afectación de otros genes diana no deseados, o la presencia de efectos temporales de estos miARN. Por lo que se refiere a este trabajo, este último aspecto no sería

un inconveniente, pues se obtuvo un incremento sostenido de los niveles plasmáticos de HDL durante 12 semanas. No obstante, no se describen los efectos potencialmente perjudiciales de este antagomiR sobre otros órganos y tejidos.

En resumen, Rayner et al. dan un paso muy relevante y novedoso en la terapia de la aterosclerosis, pues, aunque todavía en una fase muy precoz, este estudio muestra una estrategia terapéutica útil basada en la administración de anti-miR para reducir el riesgo residual lipídico en pacientes con enfermedad cardiovascular. Existen otros miARN que intervienen durante el proceso aterogénico, ya sea modulando la función inflamatoria de las células endoteliales, la adhesión de los monocitos, la respuesta de los macrófagos a las LDL oxidadas, o promoviendo la proliferación de células del músculo liso vascular y células endoteliales^{3,5,6}. Con respecto a la aterosclerosis, sería interesante por ejemplo comprobar la viabilidad y la eficacia de un tratamiento combinado con anti-miR-33 y miméticos de miR-146a, pues se ha visto que estos últimos reducen significativamente los niveles de colesterol LDL (incluyendo las LDL oxidadas), así como la secreción de interleucina (IL)-6, IL-8, quimiocinas (CCL2) y metaloproteasas⁶. Otro anti-miR potencialmente interesante sería el de miR-155, que en condiciones aterogénicas presenta un efecto protector⁵.

Bibliografía

1. Malizia AP, Wang DZ. MicroRNAs in cardiomyocyte development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;3:183–90.
2. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Lerner-Svensson HM, Lindsay MA. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J Immunol*. 2008;180:5689–98.
3. Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*. 2010;121:1022–32.
4. Davalos A, Goedeke L, Smbert P, Ramirez CM, Warriar NP, Andreo U, et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:9232–7.
5. Schroen B, Heymans S. Small but smart-microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovasc Res*. 2011, doi:10.1093/cvr/cvr268.
6. Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Lett*. 2011;585:854–60.

Xavier Palomer
Centro de Investigación
Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades
Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)
Correo electrónico: xpalomer@ub.edu

doi:10.1016/j.arteri.2012.01.003