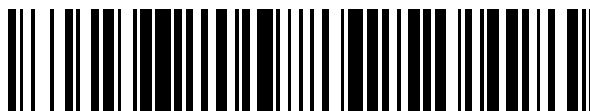


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 034**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2012 E 12788630 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2776580**

54 Título: **Micro-ARN como marcador de actividad de las plaquetas**

30 Prioridad:

11.11.2011 GB 201119571
13.07.2012 GB 201212539

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2016

73 Titular/es:

MICRO-SIGNATURE LTD. (100.0%)
99 Westmead Road, Sutton
Surrey SM1 4HX, GB

72 Inventor/es:

MAYR, MANUEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 586 034 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Micro-ARN como marcador de actividad de las plaquetas

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la actividad de las plaquetas. La presente invención también se refiere a un método para controlar la eficacia de una terapia anti-plaquetas, a un método de predicción y/o diagnóstico de un trastorno relacionado con las plaquetas y a un método para determinar la progresión de un trastorno relacionado con las plaquetas.

Las plaquetas son uno de los elementos clave de la sangre humana. Juegan un papel importante en la trombogénesis, la aterogénesis y la progresión de las lesiones ateroscleróticas (41-42).

10 Las plaquetas no sólo son un importante contribuyente a las enfermedades relacionadas con la sangre, tales como las que se caracterizan por un sangrado prolongado, la actividad anormal de plaquetas también se ha asociado con la patogénesis de otras numerosas enfermedades. Por ejemplo, la interacción de las plaquetas con la pared del vaso y su posterior contribución a la formación de ateroma y la trombosis tienen una importancia fundamental en la etiología y patogénesis de las enfermedades vasculares periféricas, coronarias, cerebrovasculares y otras enfermedades vasculares (43-44).

15 La acumulación de pruebas también sugiere un papel para la activación de las plaquetas en la progresión del cáncer y se ha observado un aumento en la actividad de las plaquetas en pacientes con cáncer metastásico (45-47).

Mientras que cada vez hay más conciencia de que la activación plaquetaria inadecuada juega un papel primordial en estas enfermedades, aún no existe una medida ideal generalmente aceptada de que la activación de las plaquetas indique un estado de "alto riesgo".

20 Los microARN (miARN) son una clase de pequeños ARN no codificantes que funcionan como represores de la traducción. Se unen a través de un emparejamiento de bases canónico a un sitio complementario en la región no traducida 3' (UTR) de sus ARNm diana y pueden dirigir la degradación o la represión traduccional de estos transcritos. (2, 22) Aunque el grado de regulación a la baja de la diana por los miARN tiende a ser pequeño, los miARN ejercen un efecto potente sobre los procesos celulares debido a su capacidad de controlar múltiples genes que funcionan en diferentes etapas en las mismas rutas biológicas. (4, 12, 18-19) Se ha demostrado que los miARN desempeñan un papel importante en el desarrollo, las respuestas al estrés, la angiogénesis y oncogénesis. (33 a 34)

30 Recientemente, Mitchell et al. destacaron la presencia de miARN en el plasma. (20) Estos miARN del plasma no están asociados a células, sino empaquetados en microvesículas que los protegen de la actividad ARNasa endógena. Curiosamente, los miARN del plasma pueden mostrar perfiles de expresión únicos: se identificaron miARN específicos de tumores en pacientes con cáncer (38), mientras que los miARN derivados de tejido constituyen un marcador de lesión (30, 39). Se ha informado de una alteración de los niveles de miARN de plasma en pacientes con insuficiencia cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria y diabetes (1, 5-6, 29-30, 32).

35 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de determinación de actividad de las plaquetas en un individuo que comprende determinar, en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo, el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21.

40 Se ha encontrado que los miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 son altamente expresados en plaquetas y micropartículas de plaquetas. De acuerdo con ello, un mayor nivel de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o miR-21 es indicativo de un aumento del contenido de miARN de plaquetas y, por lo tanto, del aumento de la actividad plaquetaria. Un nivel reducido de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o miR-21 es indicativo de una disminución del contenido de miARN de plaquetas y, por tanto, de la disminución de la actividad de las plaquetas.

45 Dado que los niveles de microARN circulante representan el efecto neto de la liberación (micropartículas) y aclaramiento (dímero-D, que es un marcador para la resolución de trombos), un aumento del nivel de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o miR-21 también es indicativo de un mayor nivel de liberación de miARN de plaquetas a la circulación, una disminución del aclaramiento de micropartículas de plaquetas y/o un incremento de la resolución de trombos.

50 En respuesta a la lesión por I/R (isquemia /reperfusión) aguda en la que la compensación de la liberación de microARN de plaquetas y el aclaramiento de micropartículas de plaquetas puede no producirse, los niveles de todos estos microARN aumentan y se correlacionan con las mediciones de micropartículas de plaquetas, que son marcadores de activación de las plaquetas.

En las enfermedades, tales como la diabetes y la enfermedad cardiovascular, donde en realidad se puede producir un aumento compensatorio en el aclaramiento, los niveles de los microARN pueden disminuir. También se ha encontrado que los niveles de estos microARN en el momento inicial (es decir, sin lesión I/R) se correlacionan con dímero-D, que es un marcador de la resolución de trombos.

5 La determinación de un nivel alto o bajo de microARN se basa en un nivel de control, que se determina típicamente a partir de una población relevante de individuos que tienen actividades normales de plaquetas. La población relevante puede ser definida basándose, por ejemplo, en la dieta, estilo de vida, edad, origen étnico o cualquier otra característica que puede afectar a los niveles normales de los marcadores. Una vez que se conocen los niveles de control, los niveles medidos se pueden comparar y determinar la significación de la diferencia utilizando métodos estadísticos convencionales. Si hay una diferencia sustancial entre el nivel medido y el nivel de control (es decir, una diferencia estadísticamente significativa), se puede considerar que el individuo del que se han medido los niveles tiene una actividad anormal de las plaquetas. Al determinar el nivel de actividad de las plaquetas utilizando el método de la presente invención, es posible predecir si un individuo está en riesgo de desarrollar una enfermedad que puede estar caracterizada por un nivel anormal de actividad de las plaquetas (es decir, un trastorno relacionado con plaquetas). La actividad plaquetaria anormal se refiere a un nivel de actividad de las plaquetas que es mayor o menor que el nivel en un individuo sano sin la enfermedad. Además, la determinación del nivel de actividad de las plaquetas permite la evaluación de la eficacia de una terapia para semejante enfermedad.

10 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de control de la eficacia de una terapia anti-plaquetas, comprendiendo el método las etapas de determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo antes de la terapia, determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de suero o plasma obtenida de un individuo durante o después de la terapia, y comparar los niveles determinados en el individuo antes y durante o después de la terapia.

15 Puesto que se descubrió que miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 son altamente expresados en las plaquetas y que sus niveles se puede utilizar como una indicación del nivel de actividad de las plaquetas en un individuo, la realización de la determinación expuesta anteriormente permite determinar la eficacia de una terapia anti-plaquetas.

20 Como se mencionó en el primer aspecto de la presente invención, un mayor nivel de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o miR-21 durante o después de la terapia es indicativo de un aumento del contenido de miARN de las plaquetas y, por lo tanto, de un aumento de actividad de las plaquetas.

25 Si la terapia antiplaquetaria reduce la liberación de microARN de plaquetas, en ese caso, una disminución del nivel de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o miR-21 durante o después de la terapia es una indicación positiva de la eficacia de la terapia, es decir, una reducción de la actividad de las plaquetas.

30 Por otro lado, si la terapia anti-plaquetaria de plaquetas reduce tanto la liberación de microARN como el aclaramiento de micropartículas de plaquetas, en ese caso el cambio en los niveles de los microARN depende de la medida en la que se reduzcan la liberación y el aclaramiento.

35 Un aumento o disminución del nivel de un microARN después o durante la terapia significa que el nivel de microARN obtenido después o durante la terapia es mayor o menor que el obtenido antes de la terapia, respectivamente.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de predicción y/o diagnóstico de un trastorno relacionado con plaquetas que comprende la determinación en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo del nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21, y la comparación del nivel determinado en el individuo con un nivel de control.

40 Puesto que se encontró que miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 son altamente expresados en las plaquetas y que sus niveles varían de acuerdo con el estado de activación de las plaquetas, se puede utilizar el nivel de estos microARN como una indicación o marcador biológico del nivel de actividad de las plaquetas de un individuo, pronosticando o diagnosticando de este modo un trastorno relacionado con las plaquetas.

45 El término "un trastorno relacionado con las plaquetas" se refiere a una enfermedad o afección que implica una actividad plaquetaria anormal, que puede ser mayor o menor que el nivel de actividad de las plaquetas en un individuo sano sin el trastorno. Los trastornos relacionados con las plaquetas incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de von Willebrand, el síndrome de Bernard-Soulier, la tromboastenia de Glanzmann, la trombocitopenia, la púrpura de Henoch-Schonlein, la púrpura trombocitopénica trombótica, el síndrome urémico hemolítico, la anemia aplásica adquirida, el síndrome de Wiskott-Aldrich, el síndrome de las plaquetas grises, el cáncer y la leucemia. Preferiblemente, un trastorno relacionado con plaquetas no incluye diabetes, enfermedades vasculares o enfermedades cardiovasculares, aunque se sabe que se produce una función plaquetaria anormal.

50 Al hacer la determinación establecida anteriormente, es posible determinar con alta especificidad y sensibilidad si un individuo tiene o es propenso a desarrollar un trastorno relacionado con las plaquetas. La especificidad se define como la proporción de verdaderos negativos (individuos que no tienen o no desarrollan un trastorno relacionado con las plaquetas) identificados como tales en el método. La sensibilidad se define como la proporción de verdaderos positivos (individuos que tienen o pueden desarrollar un trastorno de las plaquetas) identificados como tales en el método. El método proporciona un ensayo de alta precisión que se puede realizar con relativa facilidad utilizando cualquiera de los biomarcadores.

Basándose en la naturaleza de la actividad de las plaquetas (mencionada anteriormente) en un trastorno relacionado con las plaquetas concreto, los niveles de microARN en un individuo que tiene, o que puede desarrollar, el trastorno relacionado con las plaquetas, pueden ser mayores o menores que un nivel de control.

5 Para un trastorno relacionado con las plaquetas que se caracteriza por un contenido de miARN de plaquetas anormalmente alto, un aumento de la liberación de miARN de plaquetas a la circulación, una disminución del aclaramiento de micropartículas de plaquetas y/o una mejor resolución de trombos (es decir, aumento de la actividad de las plaquetas), un mayor nivel de miR-126, MIR -197, miR-223 y/o miR-24 es una indicación positiva del trastorno o la probabilidad de desarrollar un trastorno de este tipo.

10 Para un trastorno relacionado con plaquetas que se caracteriza por un contenido anormalmente bajo de miARN de plaquetas, la disminución de la liberación de miARN de plaquetas en la circulación, el aumento del aclaramiento de micropartículas de plaquetas y/o el deterioro de la resolución de trombos (es decir, disminución de la actividad de las plaquetas), la disminución del nivel de miR-126, MIR -197, miR-223 y/o miR-24 es una indicación positiva del trastorno o la probabilidad de desarrollar un trastorno de este tipo.

15 El método de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención permite la identificación de los individuos con un trastorno relacionado con plaquetas. El método también permite la identificación de los individuos que son propensos a desarrollar un trastorno relacionado con plaquetas. Por lo tanto, el método permite adoptar medidas preventivas, tales como los cambios en la dieta y el estilo de vida del individuo, así como la intervención médica.

20 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método de control de la progresión de un trastorno relacionado con plaquetas que comprende las etapas de determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo en un primer punto temporal, determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo en un segundo punto temporal y comparar los niveles determinados en el individuo en el primer y segundo puntos temporales.

25 El segundo punto temporal está después del primer punto temporal y los dos puntos temporales están suficientemente espaciados como para permitir que el estado del trastorno cambie de tal manera que se permita controlar la progresión del trastorno.

30 Puesto que se ha encontrado que los niveles de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 se pueden utilizar como una indicación del nivel de actividad de las plaquetas en un individuo, la realización de la determinación expuesta anteriormente permite controlar la progresión de un trastorno relacionado con plaquetas.

Basándose en la naturaleza de la actividad de las plaquetas (mencionada anteriormente) en un trastorno relacionado con plaquetas concreto, la progresión del trastorno relacionado con plaquetas puede ser indicada por niveles más altos o más bajos de los microARN.

35 Para un trastorno relacionado con plaquetas caracterizado por un contenido de miARN de plaquetas anormalmente alto, una mayor liberación de miARN de plaquetas a la circulación, una disminución del aclaramiento de micropartículas de plaquetas y/o una mejor resolución de trombos (es decir, aumento de la actividad de las plaquetas), el mayor nivel de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o el miR-21 es una indicación positiva de la progresión del trastorno relacionado con plaquetas.

40 Para un trastorno relacionado con plaquetas caracterizado por un contenido de miARN de plaquetas anormalmente bajo, una disminución de la liberación de miARN de plaquetas a la circulación, un aumento del aclaramiento de micropartículas de plaquetas y/o un deterioro en la resolución de trombos (es decir, disminución de la actividad de las plaquetas), la disminución del nivel de miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y/o el miR-21 es una indicación positiva de la progresión del trastorno relacionado con plaquetas.

45 Un aumento o una disminución del nivel de un microARN significan que el nivel del microARN obtenido en el segundo punto temporal es mayor o menor que el obtenido en el primer punto temporal, respectivamente.

Los métodos de acuerdo con todos los aspectos de la presente invención se llevan a cabo en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo. La muestra puede ser cualquier muestra adecuada en la que sea posible medir los microARN mencionados anteriormente.

50 miR-21 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-21 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de acceso NR_029493.1, versión GI: 262205659.

miR-24 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-24 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de acceso NR_029496.1, versión GI: 262205676.

miR-126 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-126 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de acceso NCBI 029695.1, versión GI: 262205369.

5 miR-197 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-197 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de acceso NC_029583.1, versión GI: 262206094.

miR-223 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-223 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de acceso NC_029637.1, versión GI: 262206350.

10 miR-150 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-150 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de NR_029703.1, versión GI: 262205410.

15 miR-93 es un término convencional bien conocido por los expertos en la técnica. En particular, la secuencia de la forma humana de miR-93 se proporciona en la base de datos de proteínas NCBI con el número de NR_029510.1, versión GI: 262205737.

20 Para evitar dudas, las secuencias específicas de los marcadores mencionados anteriormente se definen con respecto a la versión presente en la base de datos en la fecha de prioridad de la presente solicitud. Las secuencias específicas de los marcadores son ilustrativas. Los expertos en la técnica apreciarán que existen variantes polimórficas en la población humana y que la identificación de tales variantes polimórficas es una práctica convencional para los expertos en la técnica.

25 Existen numerosas formas de determinar el nivel de los microARN, incluyendo la transferencia Northern, las matrices de microARN, los métodos de RT-PCR en tiempo real, la secuenciación de la siguiente generación, la presentación diferencial, la interferencia de ARN, los métodos de protección de ARNasa, etc. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase por ejemplo Ach et al., BMC Biotechnology, 8, 69, 2008). Preferiblemente, los niveles de los microARN se miden utilizando métodos de RT-PCR en tiempo real.

En algunas realizaciones, se determinan los niveles de una pluralidad de micro ARN seleccionados del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21. Por ejemplo, se determinan los niveles de dos, tres, cuatro o los cinco microARN.

30 Dado que estos microARN se expresan en diferentes tipos de células (es decir, no exclusivamente en las plaquetas), mediante la determinación de los niveles de más de un microARN y su relación entre sí, se puede obtener una información más fiable sobre la actividad de las plaquetas.

En algunas realizaciones, se determinan los niveles de al menos dos microARN seleccionados del grupo que comprende miR-126, miR-197 y miR-223 o miR-24. Las combinaciones preferidas de tres microARN se muestran en la Tabla 5 a continuación.

35 En realizaciones concretas, se determinan los niveles de i) miR-126, miR-197 y miR-223; ii) miR-126, miR-197 y miR-24; o iii) miR-126, miR-24 y miR-150; iv) miR-126, miR-223 y miR-93; o v) miR-126, miR-197, miR-223 y miR-24. Preferiblemente, se determinan los niveles de i) miR-126, miR-197 y miR-223; o ii) miR-126, miR-197 y miR-24.

La presente invención se describirá a continuación con detalle a modo de ejemplo solamente con referencia a las siguientes figuras.

40 La Figura 1A muestra las correlaciones por pares entre los miARN circulantes

La Figura 1B muestra la firma de miARN circulante para un incidente de IM. Análisis de regresión de Cox penalizado de tipo L1 (método LASSO "least absolute shrinkage and selection operator"). El gráfico muestra los coeficientes de regresión de Cox de los miARN (eje y) para los diferentes niveles de penalización (el parámetro de ajuste λ_1 se intensifica más allá de 20). Las variables que resisten la contracción hasta valores λ_1 altos son los más relevantes para la predicción de la enfermedad.

45 La Figura 2 muestra las estimaciones de riesgo para los tres miARN más consistentemente asociados con IM. Los tres miARN fueron identificados por los modelos basados en AIC y la técnica de mínima contracción absoluta y operador de selección. Las razones de riesgo (IC 95%) se obtuvieron a partir de los modelos de regresión de Cox convencionales con un ajuste progresivo. Los niveles de expresión se normalizaron a la expresión U6.

50 La Figura 3 muestra el estudio de intervención para identificar grupos de miARN. A. Modelo de lesión I/R en la extremidad en voluntarios sanos. Las flechas indican los puntos temporales de toma de muestras. B. Grupos de miARN. La agrupación temporal por propagación de afinidad agrupa los 30 miARN en 6 grupos distintos.

La Figura 4 muestra el grupo de miARN asociados con IM. El grupo 2 contiene todos los miARN asociados con IM. Los cambios temporales fueron evaluados por QPCR. Se utilizó cel-miR-39 añadido ("spike-in") exógeno como un control de normalización. Las barras de color rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con el momento inicial.

- 5 La Figura 5 muestra la expresión de miARN en la cohorte de IR en el momento inicial y en diferentes puntos temporales, según lo evaluado por medio de QPCR. Se utilizó cel-miR-39 añadido exógeno como un control de normalización. Las barras de color rojo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en comparación con el momento inicial.

- 10 La figura 6 muestra la contribución de las plaquetas a la firma de miARN para IM. (A) Perfil de miARN de las plaquetas, tal como se determina mediante escrutinio de micromatrices. El valor medio de Ct se utilizó como un control de normalización. Los niveles de expresión ($2^{-\text{Dct}}$) fueron transformados en log. (B) Perfil de miARN correspondiente de micropartículas de plaquetas (MPP). Los miARN asociados con IM son abundantes en las plaquetas y micropartículas de plaquetas. (C) Expresión de miARN específico del tipo de célula. Comparación de la expresión de miR-126, miR-223, miR-197, miR-21 y miR-24 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), plaquetas (PLT) y células endoteliales (CE) utilizando QPCR (panel superior). Los valores de Ct sin procesar se normalizaron a expresión U6 (media \pm DT, $n = 3$). La correlación de los niveles de miARN con los recuentos MPP (panel inferior) en el momento inicial (puntos negros) y 2 días después de la lesión I/R (puntos grises). Los valores R son coeficientes de correlación de Pearson ($N = 11$, $P < 0,05$ para $R > 0,602$).

- 20 La Figura 7 muestra las 20 mejores combinaciones de tres miARN trazadas basándose en los valores de AIC derivada e IDI mostrados en la Tabla 5 a continuación.

La Figura 8 muestra el nivel de miARN en muestras de plasma obtenidas de pacientes sanos y en pacientes con estenosis sintomática de la carótida que están recibiendo terapia anti-plaquetaria.

Ejemplo

Materiales y métodos

- 25 Sujetos del estudio. El estudio de Bruneck es un estudio prospectivo de supervivencia basado en la población iniciado en 1990 como una muestra aleatoria estratificada por sexo y edad de todos los habitantes de Bruneck de 40 a 79 años (125 mujeres y 125 hombres en la quinta y octava década) (15). El presente análisis se centra en 820 participantes de la evaluación de 1995, para los cuales se disponía de ARN extraído de muestras de sangre. El seguimiento en 2000 y 2005 se completó en 100% para los criterios de valoración clínica y se completó >90% de exámenes de laboratorio repetidos. Se determinaron los IM fatales y no fatales siguiendo los criterios de la OMS para estados de enfermedad definidos (11). La diabetes fue codificada como presente si el individuo tenía una glucosa en ayunas ≥ 140 mg/dL, un nivel de glucosa a las dos horas ≥ 200 mg/dL después de la carga de 75 g de glucosa o un diagnóstico de diabetes confirmado pre-establecido. La presión arterial sistólica y diastólica fue tomada con un esfigmomanómetro de mercurio convencional después de al menos diez minutos de descanso (media de tres mediciones independientes). El colesterol de LDL se evaluó mediante la ecuación de Friedewald (9). Para explorar el origen de los miARN circulantes, los voluntarios sanos ($n = 11$, 19-51 años) se sometieron a I/R de la extremidad mediante inflación del manguito en el muslo. Las muestras de plasma se tomaron en el momento inicial a los 10 min, 1h, 5h, 2 días y 7 días después de la lesión. Los protocolos de ambos estudios fueron aprobados por los comités de ética apropiados y todos los sujetos del estudio dieron su consentimiento informado por escrito antes de entrar en el estudio.

- 35 **Aislamiento de ARN, transcripción inversa y pre-amplificación.** Se extrajeron los miARN circulantes utilizando el kit miRNeasy (Quiagen) como se ha descrito previamente (32). Se utilizó un volumen establecido de 3 μ l de los 25 μ l de producto eluido de ARN como entrada en cada reacción de transcripción inversa. Se llevaron a cabo una reacción de RT y una etapa de pre-amplificación como se ha descrito anteriormente (32). En resumen, los miARN fueron sometidos a transcripción inversa utilizando Megaplex Primer Pools (Human Pools A v2.1, Applied Biosystems). Los productos de reacción de RT se amplificaron adicionalmente utilizando Megaplex PreAmp Primers (Primers A v2.1) como recomienda el fabricante. Los productos tanto de la RT como de la PreAmp se almacenaron a -20°C .

- 45 **Análisis qPCR de TaqMan.** Se utilizaron análisis de miARN de Taqman para evaluar la expresión de los miARN individuales. Se combinaron 0,5 μ l de producto de pre-amplificación diluido con 0,25 μ l de Análisis de miARN de Taqman (20x) (Applied Biosystems) y 2,5 μ l de Mezcla Maestra para PCR Universal de Taqman No AmpErase UNG (2x) a un volumen final de 5 μ l. La qPCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems 7900HT a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 min. Todas las muestras se realizaron por duplicado. La cuantificación relativa se realizó usando el soporte lógico SDS2.2 (Applied Biosystems). Se utilizó la expresión de U6 con fines de normalización. En una segunda ronda, el valor medio de Ct de todos los miARN se aplicó como un control de normalización adicional. Se espera que este enfoque utilizado comúnmente de como resultado asociaciones más débiles porque los niveles de miARN individuales y sus agrupaciones contribuyen al promedio de Ct.

5 Escrutinio de miARN en plaquetas y micropartículas de plaquetas. Se aislaron plaquetas de sujetos sanos (23). En resumen, se extrajo sangre utilizando dextrosa con citrato ácido como anticoagulante (ACD: 120 mmoles/L de citrato de sodio, 110 mmoles/L de glucosa, 80 mmoles/L de ácido cítrico, 1:7 vol/vol) y se centrifugó durante 17 minutos a 200 g y 30°C en presencia de indometacina (10 µmoles/L; Sigma-Aldrich). A continuación, el plasma rico en
 10 plaquetas se centrifugó durante otros 10 minutos en 1000g en presencia de prostaciclina (0,1 µg/ml; Sigma-Aldrich). Las plaquetas resultantes se resuspendieron en solución de Tyrode tamponada con HEPES (145 mmoles/L de NaCl, 2,9 mmoles/L de KCl, 10 mmoles/L de HEPES, 1 mmol/L de MgCl₂, 5 mmoles/L de glucosa, pH 7,3) a una concentración de 4×10^8 /mL. Se aislaron las micropartículas de plaquetas después de la activación de las plaquetas con trombina (0,1 U/ml; Sigma-Aldrich). La agregación de plaquetas se controló con un método turbidimétrico (Chronolog 490; Chronolog). Las micropartículas de plaquetas se recogieron por ultracentrifugación a 100000g durante 90 minutos a 4°C. El sedimento se lisó en reactivo Qiazol y el ARN se extrajo como se ha descrito anteriormente. El ARN total se eluyó en 25 µl de H₂O libre de nucleasa. El ARN se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop y se utilizaron 20 ng de ARN total para la transcripción inversa. El perfil de expresión de las plaquetas y micropartículas de plaquetas se evaluó utilizando Human Taqman miRNA Array Card A (Applied Biosystems) como se ha descrito anteriormente (32).

20 Otros tipos de células. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de acuerdo con el protocolo convencional. La sangre entera heparinizada (5 a 8 mL) se diluyó a 10 mL con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4), se dispuso en capas en la parte superior de 5 mL de Histopaque 1083, y se centrifugó durante 30 minutos a 400 g. Las PBMC se lavaron dos veces, se resuspendieron en PBS, y se contaron con un hemocitómetro. Las células endoteliales (CE) de vena umbilical humana se adquirieron de Cambrex y se cultivaron en matraces recubiertos de gelatina en medio M199 con un suplemento de 1 ng/mL de factor de crecimiento de células endoteliales (Sigma), 3 µg/mL de suplemento de crecimiento endotelial de tejido neural bovino (Sigma), 10 U/mL de heparina, 1,25 µg/mL de timidina, suero bovino fetal al 10%, 100 µg/mL de penicilina y estreptomina. Las células se subcultivaron cada 3 días a una razón 1:4.

25 Análisis estadístico. Los datos fueron analizados mediante los paquetes estadísticos SPSS versión 15.0 y STATA versión 10.1. Las variables continuas con distribución normal se presentaron como la media \pm desviación típica (DT), las variables con una distribución asimétrica como medias geométricas \pm DT geométrica, y las variables dicotómicas como números y porcentajes. Se utilizaron la prueba de la T y la prueba exacta de Fisher para analizar las diferencias en las características de los participantes entre aquellos que desarrollaron IM durante el seguimiento y aquellos que no lo hicieron. Se utilizaron transformaciones Log_e de los miARN para todos los cálculos para aproximarse a una distribución de Gauss. Las correlaciones entre los miARN se evaluaron utilizando los coeficientes de correlación de Pearson con valores de P ajustados de Bonferroni. Los modelos de regresión de riesgos proporcionales de Cox se ajustaron para evaluar la asociación entre los niveles de transformaciones Log_e de los miARN y el IM. Para identificar el subconjunto o patrón de miARN con la capacidad de pronóstico más alta para el futuro IM, se utilizaron dos enfoques diferentes: (1) El primero era un procedimiento de dos etapas. Con el fin de reducir el número de miARN candidatos y los subsiguientes requisitos computacionales, se ajustaron los análisis de regresión de Cox hacia delante y hacia atrás, por etapas, con criterios de inclusión y exclusión relajados ($P_{\text{entrada}} = 0,15$ y $P_{\text{eliminación}} = 0,20$; ajustado por edad, sexo y enfermedad cardiovascular previa). Se seleccionaron siete miARN constantemente detectables en la circulación en uno o ambos de los análisis (miR-24, miR-126, miR-140, miR-150, miR-197, miR-223, y miR-486) y se consideraron elegibles para la segunda etapa del "mejor subconjunto". Los modelos de regresión de Cox de todas las combinaciones de miARN elegibles se calcularon y se compararon de acuerdo el criterio de información de Akaike (AIC) de los modelos que se basa en la probabilidad logarítmica maximizada e impone una penalización para aumentar el número de parámetros en el modelo. Los valores más bajos de AIC indican el modelo preferido, que es el que tiene menor número de parámetros que todavía proporcionan un ajuste adecuado (solución de compromiso entre la precisión y la complejidad). (2) El segundo enfoque utilizó la técnica denominada penalización L1 que implementa el "algoritmo de contracción absoluta mínima y operador de la selección [lasso]" para los 19 miARN. Los métodos de penalización L1 contraen las estimaciones de los coeficientes de regresión hacia cero en relación con las estimaciones de máxima verosimilitud. La técnica se ha empleado para generar firmas de genes de datos de micromatrices y evita el sobreajuste derivado tanto de la colinealidad como de la alta dimensionalidad. La cantidad de contracción se determina ajustando el parámetro λ_1 , que se incrementa progresivamente hasta el valor que contrae todos los coeficientes de regresión a cero. Los gráficos de los coeficientes de regresión ajustados (eje y) frente a λ_1 (eje X) se generaron utilizando el paquete 'penalizado' de soporte lógico estadístico R (10). El método lasso permite evaluar la relevancia y la robustez de las variables explicativas individuales, pero produce una estimación sesgada para los coeficientes de regresión. En consecuencia, las estimaciones de riesgo para los tres miARN finalmente seleccionados (ambos enfoques identificaron la misma firma de miARN) se calcularon mediante análisis de regresión de Cox convencional y se ajustaron por edad y sexo, condición de fumador (fumador vs no fumador), presión arterial sistólica, colesterol de LDL, diabetes e historial de enfermedad cardiovascular (modelo multivariable 1), además de otros miARN (modelo multivariable 2), más el índice de masa corporal, relación cintura-cadera, colesterol de HDL, log_e de proteína C reactiva y fibrinógeno (modelo multivariable 3). En el estudio de intervención, los perfiles de expresión de miARN se agruparon utilizando el algoritmo de Temporal Clustering by Affinity Propagation (14). Este es un enfoque eficaz y libre de parámetros para la identificación de las características temporales en los conjuntos de datos de expresión, y se ha demostrado anteriormente que produce agrupaciones biológicamente significativas.

Los valores P bilaterales inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

Estadísticas de las 20 mejores combinaciones de miARN sometidas a ensayo

Todas las combinaciones de miARN elegibles se calcularon y se compararon de acuerdo con el *criterio de información de Akaike (AIC)* de los modelos que se basa en la probabilidad log maximizada e impone una penalización para aumentar el número de parámetros en el modelo. Véase la Tabla 5. Los valores inferiores de AIC indican el modelo preferido, que es el que tiene menor número de parámetros proporcionando todavía un ajuste adecuado (solución de compromiso entre la precisión y la complejidad). Por otra parte, el autor de la presente invención examinó la discriminación de los modelos con y sin miARN utilizando el *índice C de Harrell* (Harrell et al., Evaluating the yield of medical tests. JAMA 1982, 247: 2543-6; Pencina MJ et al., Stat Med . 2004, 23: 2109-23; Liu L et al., Fitting Cox model using PROC PHREG y más allá en SAS. Presentado en SAS Global Forum 2009, Washington, DC, 22-25 de marzo de 2009. Documento núm. 236-2009). Se utilizó la fórmula de *Mejora neta de la reclasificación (NRI)* (Pencina MJ et al., Stat Med 2008, 27: 17-72; Steyerberg EW et al., Ann Intern Med 2010, 152: 195-6,5, 6) para evaluar la medida en que la adición de información sobre los miARN vuelve a asignar a los participantes a categorías de riesgo que reflejan mejor su evolución de la enfermedad cardiovascular (categorías de riesgo a 10 años <10%, 10% y 20%, y >20%). Se calcularon los IC de 95% aproximados para el NRI mediante el uso de los mismos términos de la varianza que en la prueba de significación (Armitage P. Statistical Methods in Medical Research. Oxford: Blackwell Scientific, 1977). A diferencia de NRI, el cálculo de la *mejora de la discriminación integrada (IDI)* no se basa en valores de corte elegidos arbitrariamente para las categorías de riesgo a 10 años.

Las combinaciones de todos los miARN se representaron en función de su mejora de la AIC y el IDI para demostrar que las combinaciones de miR-126, miR-197 y miR-223 o miR-24, son las mejores de entre todas las combinaciones de miARN sometidas a ensayo. Obsérvese que miR-223 y miR-24 están altamente correlacionados y por lo tanto son generalmente intercambiables. Véase la Figura 7.

Estudio de intervención farmacológica en voluntarios sanos.

Se administraron 10 mg de prasugrel (metabolito activo de clopidogrel, semana 1) a varones jóvenes sanos (<30 años), seguido de una terapia combinada con dosis bajas de aspirina (75 mg, semana 2) y dosis alta de aspirina (300 mg, semana 3). Este aumento de la dosis de aspirina combinada con prasugrel (terapia dual antiplaquetaria) da como resultado el aumento de la inhibición plaquetaria. Se obtuvieron muestras de plasma en cada visita del estudio. Se midieron miR-223, miR-197, miR-126, miR-24 y miR-21 por medio de qPCR. Se observó una reducción en estos miARN de plaquetas con un aumento de la inhibición de plaquetas. Véase la Figura 8.

Estos hallazgos en voluntarios sanos fueron corroborados por las mediciones de miARN en pacientes con estenosis sintomática de la carótida que participaban en una prueba aleatorizada para determinar si el tratamiento con dipiridamol o clopidogrel, además de la aspirina, era más eficaz en la reducción de la embolización. La eficiencia del tratamiento se evaluó utilizando la detección Doppler transcaneal de señales embólicas y la agregometría de plaquetas en el momento inicial del estudio y a las 48 horas. Ambos regímenes de tratamiento tuvieron una eficacia similar en la reducción de la embolización. Los niveles de miARN de plaquetas se midieron antes y después de la terapia antiplaquetaria. Véase la Figura 8.

Resultados

miARN circulantes en el Estudio de Bruneck. Las características demográficas, clínicas y de laboratorio en el momento inicial de los 820 participantes en la evaluación de 1995 se muestran en la Tabla 1. Todos los sujetos eran de origen caucásico. Un total de 47 participantes experimentaron un infarto de miocardio durante el período de seguimiento de 10 años, que corresponde a una tasa de incidencia de 6,5 [IC de 95%: 4,9 a 8,6] por 1000 personas-año. Para el escrutinio inicial, se aplicaron matrices de miARN Human Taqman (CardA v2.1 y cardB v2.0, Applied Biosystems) que cubrían 754 ARN no codificantes pequeños a 8 muestras reunidas, que consistían en sujetos con y sin enfermedad vascular aterosclerótica emparejados por diferentes factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, tabaquismo, hipertensión, diabetes) como se ha descrito previamente (32). De los 148 miARN con valores Ct <36, 130 miARN fueron detectados utilizando fluidos CardA y, por tanto, todos los análisis posteriores se centraron en este conjunto de datos. El análisis de redes reveló siete miARN como dianas prometedoras que eran detectables de forma fiable en la circulación (32). Estos fueron seleccionados y medidos en toda la cohorte Bruneck (n = 820). Se cuantificaron otros doce miARN como parte de un proyecto en curso sobre la osteoartritis (n = 820). Los niveles de miRNA estaban fuertemente correlacionados entre sí, alcanzando algunos una correlación casi perfecta, p. ej. miR-24 y miR-223, r = 0,939. La dependencia compleja de los miARN en los participantes que padecieron o no padecieron IM fue escrutada adicionalmente como perfiles de correlación miARN-miARN.

Asociación con incidentes de IM. Los miARN asociados con incidentes de IM fueron seleccionados utilizando dos enfoques diferentes: (1) La regresión de Cox por etapas con comparación de AIC, un criterio que tiene en cuenta tanto la bondad de ajuste como el número de parámetros en el modelo, identificó dos combinaciones preferidas de miARN: miR-126/-197/-223 y miR-126/-197/-24 (AIC ~ 563 cada una con 6 grados de libertad). (2) En el análisis de regresión de Cox penalizado L_1 , miR-126, miR-197 y miR-223 mostraron la asociación más fuerte con incidentes de IM en cualquier nivel de penalización (λ_1) y emergieron como los miARN que requerían λ_1 más alto para que sus

coeficientes de regresión se redujeran a cero (Figura 1B), mientras que miR-24 se comportó peor. En consecuencia, los autores de la presente invención dieron preferencia a la combinación de miR-126/-197/-223 excluyendo el miR-24. MiR-126 mostró una asociación positiva con el IM, mientras que miR-197 y miR-223 se relacionaron inversamente con el riesgo de enfermedad (Figura 2). También se obtuvieron resultados similares después de la normalización al valor medio de Ct de todos los miARN evaluados. No hubo ninguna modificación del efecto por sexo, diabetes o enfermedad cardiovascular preexistente (Tabla 2A y 2B (Tabla 2B es una versión mejorada de la Tabla 2A en donde la normalización de los datos ha sido corregida). Cuando los otros miARN se añadieron individualmente al modelo multivariable que ya incluía miR-126/-197/-223, ninguno alcanzó significación estadística. En un subanálisis, miR-223 mostró una asociación más fuerte con el IM fatal que con el no fatal pero fue igualmente predictivo para los eventos tempranos (1995-2000) y tardíos (2000- 2005) (datos no mostrados). En contraste, miR-126 y miR-197 fueron sólo predictivos de eventos tempranos (datos no mostrados). Estos resultados fueron similares para la normalización a U6 o el valor Ct promedio de todos los miARN.

Estudio de intervención. Para explorar el origen celular de los miARN circulantes, se sometieron voluntarios sanos (n = 11) a I/R de la extremidad generada por el inflación del manguito. Las muestras de plasma se recogieron en el momento inicial y a los 10 min, 1h, 5h, 2 días y 7 días después de la lesión (Figura 3A). Las características clínicas de la población del estudio se muestran en la Tabla 3. Treinta miARN, incluidos los miARN asociados con IM en el estudio de Bruneck, fueron evaluados por medio de QPCR. El análisis computacional utilizando el algoritmo de Agrupación Temporal por Propagación de Afinidad basado en la expresión promedio de miARN en el momento inicial y con el tiempo identificó 6 grupos de miARN distintos (Figura 3B). El Grupo 2 fue de particular interés: todos los miARN asociados con un futuro IM (miR-126, miR-223, miR-197 y miR-24) fueron parte de este grupo caracterizado por un aumento temprano en 1h y una en la elevación sostenida hasta 7 días después de la lesión por I/R (Figura 4). También se incluyó miR-21. Los resultados fueron consistentes con los diferentes métodos de normalización (control de cel-miR-39 añadido exógeno y valores de Ct sin ajustar). La respuesta de otros miARN a la lesión por I/R se muestra en la Figura 5. Las correlaciones significativas de los niveles en plasma de microARN en el momento inicial con el dímero D, un producto de degradación de la fibrina y el marcador de la fibrinólisis endógena, se ponen de relieve en la Tabla 4.

Contribución de las plaquetas. La lesión por I/R induce la activación de plaquetas (33, 34) y recientemente se ha demostrado que las plaquetas contienen miARN. (2, 22) Para someter a ensayo una posible contribución de las plaquetas a los cambios de miARN observado después de la I/R, se llevó a cabo el escrutinio de los miARN en preparaciones de plaquetas y micropartículas de plaquetas derivadas de plaquetas activadas por trombina. Los miARN que constituyen grupo de interés de los autores de la presente invención (miR-223, -126, -24, -21 y -197) fueron algunos de los miARN más abundantes en plaquetas (Figura 6A) y micropartículas de plaquetas (Figura 6B). Una comparación con las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células endoteliales (CE) confirmó que miR-223 y miR-24 se encontraban predominantemente en las plaquetas (PLT), mientras que miR-197 también estaba presente en las PBMC. Por el contrario, las células endoteliales estaban fuertemente enriquecidas con miR-126 y miR-21, pero eran detectable en las plaquetas, aunque a concentraciones mucho más bajas (Figura 6c, panel superior). El origen plaquetario de estos miARN circulantes fue apoyado además por una correlación significativa (excepto el miR-21) con el recuento de MPP a los 2 días de la lesión por I/R (Figura 6C, panel inferior). En comparación, no se obtuvo ninguna asociación para micropartículas endoteliales y de eritrocitos (datos no mostrados). Por lo tanto, el ajuste de los miARN derivados de plaquetas puede refinar la contribución endotelial al contenido de miR-126 en la circulación. Esto concuerda con los resultados de los autores de la presente invención a partir del estudio de Bruneck, donde el ajuste de miR-197 y miR-223 expone la direccionalidad opuesta de los cambios en el miR-126 de los participantes con IM posterior (Figura 2).

Los datos de la Tabla 5 de las 3 mejores combinaciones de miARN demuestran que diversas combinaciones de los marcadores son útiles para determinar el nivel de activación de las plaquetas. En particular, los datos de la Figura 7 muestran que las mejores combinaciones son: i) miR-126, miR-197 y miR-223; y ii) el miR-126, miR-197 y miR-24.

Los datos proporcionados también demuestran que los niveles de los miARN disminuyen cuando los voluntarios sanos o los pacientes reciben terapia anti-plaquetas. Por consiguiente, los niveles de los miARN se pueden utilizar para controlar la eficacia de la terapia anti-plaquetas.

50 Discusión

miARN como biomarcadores para el IM. En el análisis, los autores de la presente invención tienen en cuenta siete miARN que surgieron como dianas prometedoras para la enfermedad cardiovascular en el escrutinio previo y mostraron una topología de red única (32). Tres de estos miARN formaron parte de una firma para el IM: miR-126, miR-197 y miR-223. Los resultados fueron independientes de los factores de riesgo vascular clásicos, estables en subgrupos (hombres y mujeres, diabéticos y no diabéticos, participantes con y sin enfermedad cardiovascular previa) y robustos cuando se utilizaron enfoques estadísticos distintos. Otros doce miARN no estaban relacionados con la enfermedad vascular aterosclerótica en el escrutinio previo y no alcanzaron significación en el análisis principal. Se considera que miR-223 es un miARN específico mieloide que actúa como un fino sintonizador de la producción de granulocitos y de la respuesta inflamatoria (13, 24, 27). El miR-197 se ha descrito como diferencialmente expresado en los tumores (17, 26). Por el contrario, las células endoteliales están muy enriquecidas con miR-126 que facilita la señalización de VEGF (8). Sin embargo, poco se sabe sobre el origen celular de estos miARN en la circulación.

Respuesta de miARN después de la lesión por IR. Basándose en los perfiles de expresión después de la lesión por IR, miR-126, miR-197 y miR-223 eran parte de un grupo que también incluía miR-21 y miR-24. Todos estos miARN son altamente expresados en las plaquetas y micropartículas de plaquetas. Esta es, según el conocimiento de los autores de la presente invención, la primera vez que se ha definido la contribución de un tipo celular específico a los miARN circulantes por una intervención controlada. Los presentes hallazgos amplían las observaciones anteriores de los autores de la presente invención a pacientes con diabetes (32) y plantean la posibilidad de que la pérdida observada de varios miARN, incluyendo miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21, pueda reflejar una función plaquetaria anormal en pacientes diabéticos. Una reducción de miARN de plaquetas podría reflejar una disminución en el contenido de miARN de plaquetas, un aumento del aclaramiento de micropartículas de plaquetas por las células inflamatorias o un deterioro de la resolución de trombos. Por el contrario, los cambios de miR-126 en participantes con futuro IM no siguieron la misma direccionalidad que miR-197 y miR-223, argumentando en contra de un origen plaquetario común. Los mayores niveles de miR-126 circulante podrían estar en consonancia con los informes anteriores que implicaban las micropartículas endoteliales como biomarcadores del daño vascular y el aumento del riesgo cardiovascular (25). En cualquier caso, los descubrimientos de los autores de la presente invención recomiendan precaución en la interpretación de los cambios de miARN individuales aislados. Debido a que los miARN circulantes están altamente correlacionados, los patrones globales de expresión deben ser estudiados mediante la representación de los datos de miARN como redes de co-expresión. Las firmas de miARN en lugar de los miARN individuales pueden ser biomarcadores más fiables para los eventos cardiovasculares.

Plaquetas - un miARN-oma poco explorado. Es de destacar que varios de los miARN de plaquetas más abundantes han sido implicados previamente en patologías cardiovasculares: miR-126 como maestro regulador de la homeostasis endotelial y la integridad vascular, miR-21 como mediador de la fibrosis cardíaca (28), aunque esto es discutido por otros (21) - y miR-24 como inductor de la apoptosis endotelial después de un infarto de miocardio (7). La presencia de estos miARN dentro de las plaquetas, sin embargo, no se tuvo en cuenta a la hora de interpretar estos estudios. A pesar de la importancia funcional de que los miARN de plaquetas son actualmente desconocidos, es concebible que la inhibición sistémica de los miARN, que también son abundantes en las plaquetas, pueda alterar la función plaquetaria y contribuir a los fenotipos cardiovasculares observados. Además, se debe tener cuidado en el diseño de los estudios de control de casos para el análisis de biomarcadores. Las comparaciones de los miARN circulantes entre los pacientes con enfermedad cardiovascular manifiesta y controles sanos, por ejemplo, son susceptibles de ser confundidas por la medicación, en particular, por la terapia anti-plaquetas.

miARN de plaquetas como biomarcadores. La terapia combinada (aspirina + inhibidores de P2Y₁₂) se utiliza comúnmente para el tratamiento de síndromes coronarios agudos y la prevención de eventos coronarios después de la colocación de un dispositivo intraluminar, pero todavía no hay una medida ideal generalmente aceptada de la activación de las plaquetas que se utiliza ampliamente como co-diagnóstico. La aspirina inhibe la producción de tromboxanos. Los inhibidores de P2Y₁₂ tales como el clopidogrel, prasugrel, ticagrelor actúan inhibiendo los receptores de adenosina. Por lo tanto, sus mecanismos son complementarios y la inhibición reiterativa de las plaquetas aumenta la probabilidad de sangrado, que se convierte en un peligro para la vida en algunos pacientes. Por el contrario, los sujetos con variantes genéticas de la enzima hepática CYP2C19 no están protegidos porque el clopidogrel no se convierte de manera eficaz en un metabolito activo (Mega JL et al., *N Engl J Med* 2009, 360: 354-362; Mega JL et al., *Jama*. 2012, 307:1482-1483). Después de la activación de las plaquetas, comienza la liberación de las micropartículas de plaquetas (MPP), en el plazo de minutos, a la circulación (Tans G, et al., *Blood*. 1991, 77: 2641-2648; Heijnen HF et al., *Blood* 1999, 94:3791-3799). Debido a su pequeño tamaño e inestabilidad, las MPP son difíciles de medir y no son adecuados para los ensayos clínicos de rutina. Por el contrario, los miARN son estables y fácilmente determinados por medio de qPCR. Por lo tanto, los miARN de plaquetas pueden ser útiles como prueba de punto de atención para la adaptación de las terapias anti-plaquetas. Esto ofrecería una necesidad clínica insatisfecha de biomarcadores más fiables de la activación de las plaquetas para reducir el riesgo de complicaciones hemorrágicas que ponen en riesgo la vida al tiempo que garantizaría la eficacia del tratamiento. Otras aplicaciones clínicas de un análisis de miARN de plaquetas incluyen el diagnóstico de trastornos relacionados con las plaquetas, el control de la resolución o recurrencia de trombos, y la exploración del cumplimiento del paciente con la terapia antiplaquetaria prescrita.

Referencias

1. Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, y Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 73-77, 2010.
2. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233, 2009.
3. Bonauer A, Boon RA, and Dimmeler S. Vascular microRNAs. *Curr Drug Targets* 11: 943-949, 2010.
4. Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW, 2º, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, y Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13: 613-618, 2007.

5. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, Marenzi G, Pompilio G, y Capogrossi MC. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 31: 2765-2773, 2010.
- 5 6. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Roxel T, Muller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, and Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 107:677-684,2010.
- 10 7. Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, Galuppo P, Kneitz S, Pena JT, Sohn-Lee C, Loyer X, Soutschek J, Brand T, Tuschl T, Heineke J, Martin U, Schulte-Merker S, Ertl G, Engelhardt S, Bauersachs J, y Thum T. MicroRNA-24 Regulates Vascularity After Myocardial Infarction. *Circulation* 2011.
- 15 8. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, y Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15: 272-284, 2008.
9. Friedewald WT, Levy RI, y Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972.
- 20 10. Goeman JJ. L1 penalized estimation in the Cox proportional hazards model. *Biom J* 52: 70-84, 2010.
11. IHD Register: Report of the Fifth Working Group. Copenhagen DWHO ROfE. 1971.
12. Inui M, Martello G, y Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 252-263, 2010.
- 25 13. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, y Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 451: 1125-1129, 2008.
- 30 14. Kiddle SJ, Windram OP, McHattie S, Mead A, Beynon J, Buchanan-Wollaston V, Denby KJ, y Mukherjee S. Temporal clustering by affinity propagation reveals transcriptional modules in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 26: 355-362,2010.
- 35 15. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, y Schwartz DA. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347: 185-192, 2002.
16. Latronico MV, Catalucci D, y Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res* 101: 1225-1236, 2007.
- 40 17. Lehmann U, Streichert T, Otto B, Albat C, Hasemeier B, Christgen H, Schipper E, Hille U, Kreipe HH, y Langer F. Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer. *BMC Cancer* 10: 109, 2010.
- 45 18. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, y Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-773, 2005.
19. Liu N, y Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell* 18: 510-525, 2010.
- 50 20. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, y Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10513-10518, 2008.
- 55 21. Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, van Rooij E, y Olson EN. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest* 120: 3912-3916, 2010.
22. Pillai RS, Bhattacharyya SN, y Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 17: 118-126, 2007.
- 60 23. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, Boulanger CM, Westwood N, Urbich C, Willeit J, Steiner M, Breuss J, Xu Q, Kiechl S, y Mayr M. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood* 114: 723-732, 2009.

24. Pulikkan JA. Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 115: 1768-1778, 2010.
- 5 25. Rautou PE, Vion AC, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, y Boulanger CM. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 109: 593-606, 2011.
26. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, Farinella F, Mazzotta M, y Carinci F. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 1229-1234,2010.
- 10 27. Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, y Zhu TH. miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta. *Cell Res* 20: 1158-1169, 2010.
- 15 28. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, y Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456: 980-984, 2008.
- 20 29. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, y Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 106: 1035-1039, 2010.
30. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, y Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31: 659-666, 2010.
- 25 31. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, y Galas DJ. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4402-4407, 2009.
- 30 32. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, y Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 107: 810-817, 2010.
33. Kloosterman WP, Plasterk RH. *Dev Cell*. 2006 Oct;11(4):441-50.
- 35 34. Stefani G, Slack FJ. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):219-30.
35. Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. *Circ Res*. 2007 Dic 7;101(12):1225-36.
36. van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. *Circ Res*. 2008 Oct 24;103(9):919-28.
- 40 37. Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. *Circ Res*. 2007 Jul 6;101(1):59-68.
38. Tanaka M et al. *PLoS One*. 2009;4(5):e5532.
- 45 39. Laterza OF et al. *Clin Chem*. 2009 Nov;55(11):1977-83.
40. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. *Clin Chem*. 2009 Nov;55(11):1944-9.
41. Hoak JC. Platelet and atherosclerosis. *Semin. Thromb. Hemost*. 1988; 14: 202-5.
- 50 42. Rabbani LE, Loscalzo J. *Atherosclerosis* 1994; 105: 1-7.
43. White JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Invest*. 1994; 24 (Supl 1): 25-9.
- 55 44. Falk E, Fernandez-Ortiz A. Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am. J. Cardiol*. 1995; 75:3B-11B.
45. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK: Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 2002, 3(7):425-430.

46. Sierko E, Wojtukiewicz MZ: Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin. Thromb. Hemost.* 2004, 30(1):95-108

5 47. Jurasz P, North S, Venner P, Radomski MW: Matrix metalloproteinase-2 contributes to increased platelet reactivity in patients with metastatic prostate cancer: a preliminary study. *Thromb. Res.* 2003;112(1-2):59-64.

Tabla 1. Características en el momento inicial de la población del Estudio de Bruneck.

Variables	Todos los participantes (n=820)	Incidente de infarto de miocardio		Valor P
		Si (n=47)	No (n=773)	
Demografía y estilo de vida				
Edad, años	62,9(11,1)	70,0 (9,6)	62,4(11,1)	<0,001
Sexo femenino, n (%)	409 (49,9)	17(36,2)	392 (50,7)	0,070
Fumador/ex-fumador, n (%)	372 (45,4)	23 (48,9)	349 (45,2)	0,652
Consumo alcohol, g/d	23,8 (31,2)	25,0(34,1)	23,7 (31,0)	0,781
Examen físico				
Índice Masa Corporal, kg/m ²	25,7(3,9)	26,4 (4,9)	25,6 (3,8)	0,165
Razón cintura-cadera, cm/cm	0,9(0,1)	1,0 (0,1)	0,9 (0,1)	0,012
Presión arterial sistólica, mmHg	148,2 (20,6)	155,9 (22,9)	147,7 (20,4)	0,008
Presión arterial diastólica, mmHg	87,1 (9,1)	87,7 (8,9)	87,0 (9,2)	0,646
Marcadores lipídicos				
Colesterol total, mmoles/L	6,0 (1,1)	6,4 (1,4)	5,9 (1,1)	0,003
Colesterol HDL, mmoles/L	1,5 (0,4)	1,5 (0,5)	1,5 (0,4)	0,762
Colesterol LDL, mmoles/L	3,8(1,0)	4,1 (1,3)	3,7 (1,0)	0,033
Triglicéridos, mmoles/L*	1,3 (1,7)	1,4 (1,7)	1,3 (1,7)	0,223
Apolipoproteína A-I, g/L	1,7 (0,3)	1,7 (0,3)	1,7 (0,3)	0,926
Apolipoproteína B, g/L	1,2 (0,3)	1,3 (0,4)	1,2 (0,3)	0,004
Marcadores Inflamatorios				
Leucocitos, x 10 ⁹ /L	6,5 (1,7)	6,9 (1,5)	6,5 (1,7)	0,111
Proteína C reactiva, nmoles/L*	17,1 (2,8)	22,2 (2,5)	16,8 (2,8)	0,070
Fibrinógeno, g/L	2,9 (0,8)	3,1 (0,6)	2,9 (0,8)	0,023
Diabetes				
Diabetes tipo 2, n (%)	82 (10,0)	6(12,8)	76 (9,8)	0,457
HbA1c, %	5,8(3,7)	6,7 (7,5)	5,7(3,4)	0,074
Enfermedades previas				
Enfermedades cardiovasculares, n (%)	57 (7,0)	12 (25,5)	45 (5,8)	<0,001

Los valores son las medias (DT) o los números (porcentajes) a menos que se indique de otro modo.
* Las variables fueron transformadas en log_e para su análisis y se presentan como la media geométrica (DT geométrica).

Tabla 2A. Análisis de interacción de la asociación entre miARN selectivos e infarto de miocardio (IM).

Subgrupos	Razón de riesgo (IC 95%) para infarto de miocardio por 1 incremento DT de log _e miRNA*		
	MiR-126	MiR-197	MiR-223
Diagnóstico de diabetes			
Si	0,23 (0,09-0,61)	1,06 (0,36-3,14)	1,46 (0,61-3,51)
No	0,43 (0,23-0,79)	1,86 (1,04-3,34)	2,31 (1,31-4,07)
	P _{interacción} =0,131	P _{interacción} =0,268	P _{interacción} =0,286
Sexo			
Varón	0,39 (0,21-0,73)	1,57 (0,86-2,89)	1,95 (1,05-3,63)
Mujer	0,42 (0,20-0,90)	2,50 (1,14-5,51)	2,68 (1,30-5,53)
	P _{interacción} =0,814	P _{interacción} =0,209	P _{interacción} =0,392
Historial de enfermedad cardiovascular			
Si	0,41 (0,22-0,76)	2,02 (1,10-3,70)	2,29 (1,28-4,08)
No	0,30 (0,12-0,79)	1,19 (0,53-2,70)	1,83 (0,74-4,54)
	P _{interacción} =0,486	P _{interacción} =0,189	P _{interacción} =0,624
* Todos los modelos de Cox incluían un término de interacción de diabetes, sexo o historial de enfermedad cardiovascular con el miRNA de interés, más las variables de edad, sexo, condición de fumador (fumador vs. no fumador), presión arterial sistólica, colesterol LDL, diabetes, historial de enfermedad cardiovascular, miR-126, miR-197 y miR-223.			

5 Tabla 2B. Análisis de interacción de la asociación entre los miARN seleccionados e incidentes de infarto de miocardio (IM).

Subgrupos			Razón de riesgo (IC 95%) para infarto de miocardio por 1 incremento DT de log _e miRNA*		
	Núm. de eventos de IM	Tasa de incidencia (por 1000 personas año)	MiR-126	MiR-197	MiR-223
Diagnóstico de diabetes					
Si	6	7,9 (3,6-17,6)	4,07(1,63-10,13)	0,85 (0,32-2,25)	0,70(0,26-1,85)
No	41	5,2 (3,8-7,0)	2,35 (1,28-4,30)	0,55 (0,32-0,94)	0,47(0,29-0,75)
			P _{interacción} =0,174	P _{interacción} =0,337	P _{interacción} =0,405
Sexo					
Varón	30	7,2 (5,0-10,3)	2,61 (1,40-4,88)	0,64 (0,36-1,12)	0,52(0,31-0,88)
Mujer	17	3,7 (2,3-6,0)	2,36 (1,12-4,96)	0,42(0,21-0,85)	0,42(0,23-0,77)
			P _{interacción} =0,755	P _{interacción} =0,206	P _{interacción} =0,491
Historial de enfermedad cardiovascular					
Si	12	25,0 (14,2-44,0)	2,45 (1,34-4,47)	0,81(0,37-1,80)	0,47(0,29-0,76)
No	35	4,3 (3,1-5,9)	3,25 (1,28-8,25)	0,52 (0,30-0,90)	0,55(0,24-1,23)
			P _{interacción} =0,490	P _{interacción} =0,252	P _{interacción} =0,711
* Todos los modelos de Cox incluían un término de interacción de diabetes, sexo o historial de enfermedad cardiovascular con el miRNA de interés, más las variables de edad, sexo, condición de fumador (fumador vs. no fumador), presión arterial sistólica, colesterol LDL, diabetes, historial de enfermedad cardiovascular, miR-126, miR-197 y miR-223. (modelo multivariable 2).					

Tabla 3. Características clínicas de los voluntarios sanos (n=11).

Varón, n (%)	9 (82%)
Edad, años	30 ± 12,2
Sodio, mmoles/L	141,36 ± 2,06
Potasio, mmoles/L	4,65 ± 0,35
Urea, mmoles/L	5,58 ± 0,73
Creatinina, μmoles/L	76,28 ± 29,43
Calcio, mmoles/L	2,23 ± 0,08
Albúmina, g/dL	42,83 ± 13,66
Fosfatasa alcalina UI/L	56 ± 21,82
Bilirrubina, mg/dL	10,81 ± 9,67
Alanina transaminasa, UI/L	25,72 ± 17,77
Gamma-glutamil transpeptidasa, UI/L	24,27 ± 13,61
Glucosa, mg/dL	5,12 ± 0,81
INR	1,02 ± 0,06
Colesterol total, mg/L	4,43 ± 1,27
HDL, mmoles/L	1,56 ± 0,6
LDL, mmoles/L	2,5 ± 0,98
Triglicéridos, mmoles/L	0,83 ± 0,53
Proteína C reactiva, mg/dL	<0,5
INR indica la Razón Normalizada Internacional	

Tabla 4. Correlación entre concentración de dímero D y niveles de expresión de miRNA seleccionados*

	D-Dímero / miR126	D-Dímero / miR197	D-Dímero / miR223	D-Dímero / miR24	D-Dímero / miR130a	D-Dímero / miR433	D-Dímero / let7d
Momento inicial	0,8096 (0,015)	0,7024 (0,052)	0,9078 (0,002)	0,8482 (0,008)	0,8436 (0,009)	0,7612 (0,028)	0,7870 (0,021)
10 min	0,7733 (0,024)	0,2085 (0,620)	0,7552 (0,030)	0,6824 (0,062)	0,7265 (0,041)	0,7047 (0,051)	0,6959 (0,055)
1 h	0,2399 (0,604)	0,5388 (0,212)	-0,433 (0,333)	-0,491 (0,263)	0,2685 (0,560)	0,1468 (0,754)	0,3104 (0,498)
5 h	0,0876 (0,852)	0,1272 (0,786)	0,0668 (0,887)	0,0999 (0,831)	0,1120 (0,811)	0,0381 (0,935)	0,0932 (0,842)
2 d	0,1816 (0,667)	0,0298 (0,944)	0,0491 (0,908)	0,1393 (0,742)	0,4683 (0,242)	0,4249 (0,294)	0,4663 (0,244)
7 d	0,2535 (0,511)	0,0237 (0,952)	0,1219 (0,755)	0,2483 (0,519)	0,1791 (0,645)	0,2990 (0,434)	0,2952 (0,441)

* Los números son los coeficientes de correlación parcial ajustados a la edad y el sexo (valores P).

ES 2 586 034 T3

Tabla 5

Combinaciones MiR	AIC	Cambio índice C	NRI	IDI
MiR-24, -126, -197	564,9772949	0,0308 (-0,0290, 0,0907)	16,54 (-2,32, 35,40)	0,0555 (0,0076, 0,1034)
MiR-24, -126, -150	566,5112915	0,0217 (-0,0424, 0,0857)	17,24 (-2,05, 36,53)	0,0515 (0,0089, 0,0941)
MiR-126, -197, -223	565,0547485	0,0366 (-0,0158, 0,0889)	16,86 (-1,99, 35,71)	0,0473 (0,0050, 0,0896)
MiR-3423p, -24, -126	567,0376587	0,0238 (-0,0326, 0,0802)	19,37 (0,54, 38,19)	0,0470 (0,0094, 0,0845)
MiR-24, -126, -146b	566,605957	0,0188 (-0,0381, 0,0757)	16,70 (-1,18, 34,58)	0,0447 (0,0073, 0,0822)
MiR-320, -24, -126	565,9118652	0,0226 (-0,0325, 0,0777)	17,08 (-1,29, 35,45)	0,0434 (0,0095, 0,0773)
MiR-191, -24, -126	567,0245972	0,0195 (-0,0357, 0,0747)	14,26 (-3,13, 31,64)	0,0430 (0,0075, 0,0785)
MiR-283p, -24, -126	566,0445557	0,0213 (-0,0333, 0,0760)	13,78 (-3,59, 31,15)	0,0427 (0,0077, 0,0778)
MiR-25, -24, -126	567,6636963	0,0182 (-0,0381, 0,0746)	13,14 (-4,25, 30,54)	0,0419 (0,0050, 0,0788)
let7e, miR-24, -126	566,3652344	0,0212 (-0,0327, 0,0752)	11,81 (-5,07, 28,69)	0,0415 (0,0075, 0,0756)
MiR-486, -24, -126	566,9111938	0,0209 (-0,0324, 0,0741)	11,33 (-5,54, 28,21)	0,0410 (0,0055, 0,0766)
MiR-24, -126, -454	567,1853027	0,0197 (-0,0354, 0,0749)	13,62 (-3,77, 31,01)	0,0407 (0,0058, 0,0755)
MiR-140, -24, -126	567,2825928	0,0202 (-0,0346, 0,0750)	13,78 (-3,60, 31,16)	0,0406 (0,0060, 0,0752)
MiR-24, -126, -223	567,4731445	0,0188 (-0,0355, 0,0732)	16,07 (-1,81, 33,94)	0,0404 (0,0059, 0,0749)
MiR-122, -24, -126	567,4348755	0,0199 (-0,0350, 0,0748)	13,46 (-3,92, 30,84)	0,0402 (0,0055, 0,0749)
MiR-93, -24, -126	567,1271362	0,0198 (-0,0348, 0,0744)	13,62 (-3,77, 31,01)	0,0401 (0,0058, 0,0745)
let7b, miR-24, -126	567,6226196	0,0215 (-0,0332, 0,0763)	13,94 (-3,44, 31,32)	0,0398 (0,0062, 0,0734)
MiR-21, -126, -197	565,9361572	0,0373 (-0,0160, 0,0905)	15,37 (-2,03, 32,77)	0,0394 (-0,0003, 0,0791)
MiR-93, -126, -197	564,0219116	0,0448 (-0,0055, 0,0951)	16,54 (-1,34, 34,43)	0,0392 (0,0020, 0,0764)
MiR-320, -126, -223	567,2560425	0,0211 (-0,0220, 0,0642)	20,32 (2,44, 38,21)	0,0310 (0,0069, 0,0551)

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la actividad de las plaquetas en un individuo que comprende determinar en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR -21.
- 5 2. Un método de control de la eficacia de una terapia anti-plaquetas, comprendiendo el método las etapas de determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo antes de la terapia, determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, 10 miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo durante o después de la terapia, y comparar los niveles determinados en el individuo antes y durante o después de la terapia.
3. Un método de predicción y/o diagnóstico de un trastorno relacionado con plaquetas que comprende determinar en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo el nivel de al menos un microARN 15 seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, MIR-24 y miR-21, y comparar el nivel determinado en el individuo con un nivel de control.
4. Un método de control de la progresión de un trastorno relacionado con plaquetas que comprende las etapas de determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, 20 miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo en un primer punto temporal, determinar el nivel de al menos un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR-24 y miR-21 en una muestra de plasma o suero obtenida de un individuo en un segundo punto temporal, y comparar los niveles determinados del individuo en los puntos temporales primero y segundo.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde se determinan los niveles de una pluralidad de microARN seleccionados del grupo que consiste en miR-126, miR-197, miR-223, miR- 25 24 y miR-21.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se determina el nivel de al menos dos microARN seleccionados del grupo que comprende miR-126, miR-197 y miR-223 o miR-24.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde se determinan los niveles de:
- 30 i) miR-126, miR-197 y miR-223;
ii) miR-126, miR-197 y miR-24;
iii) miR-126, miR-24 y miR-150;
iv) miR-223, miR-126 y miR-93; o
v) miR-126, miR-197, miR-223 y miR-24
- 35 .
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde se determinan los niveles de i) miR-126, miR-197 y miR-223; o ii) miR-126, miR-197 y miR-24.

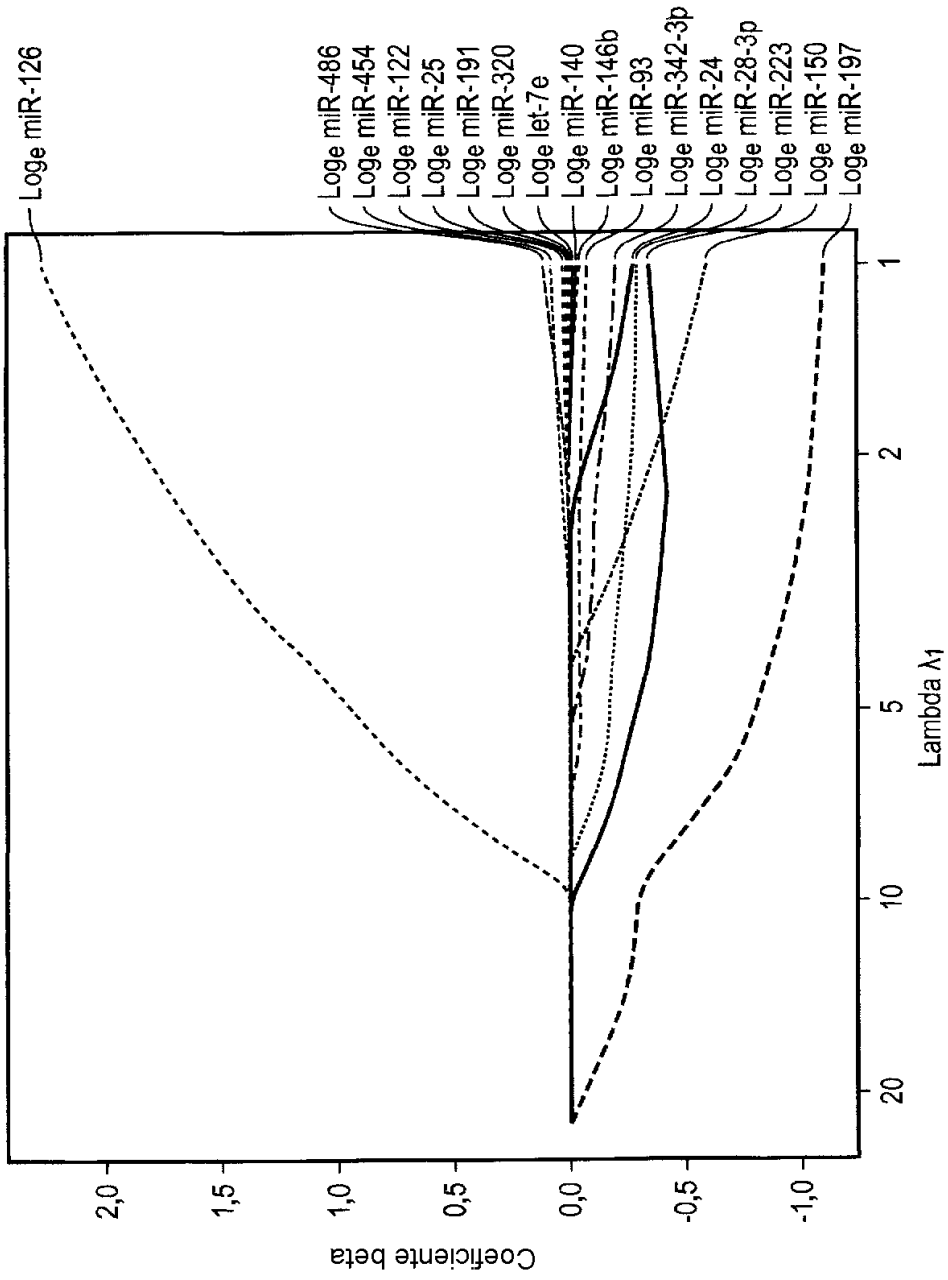


FIG. 1B

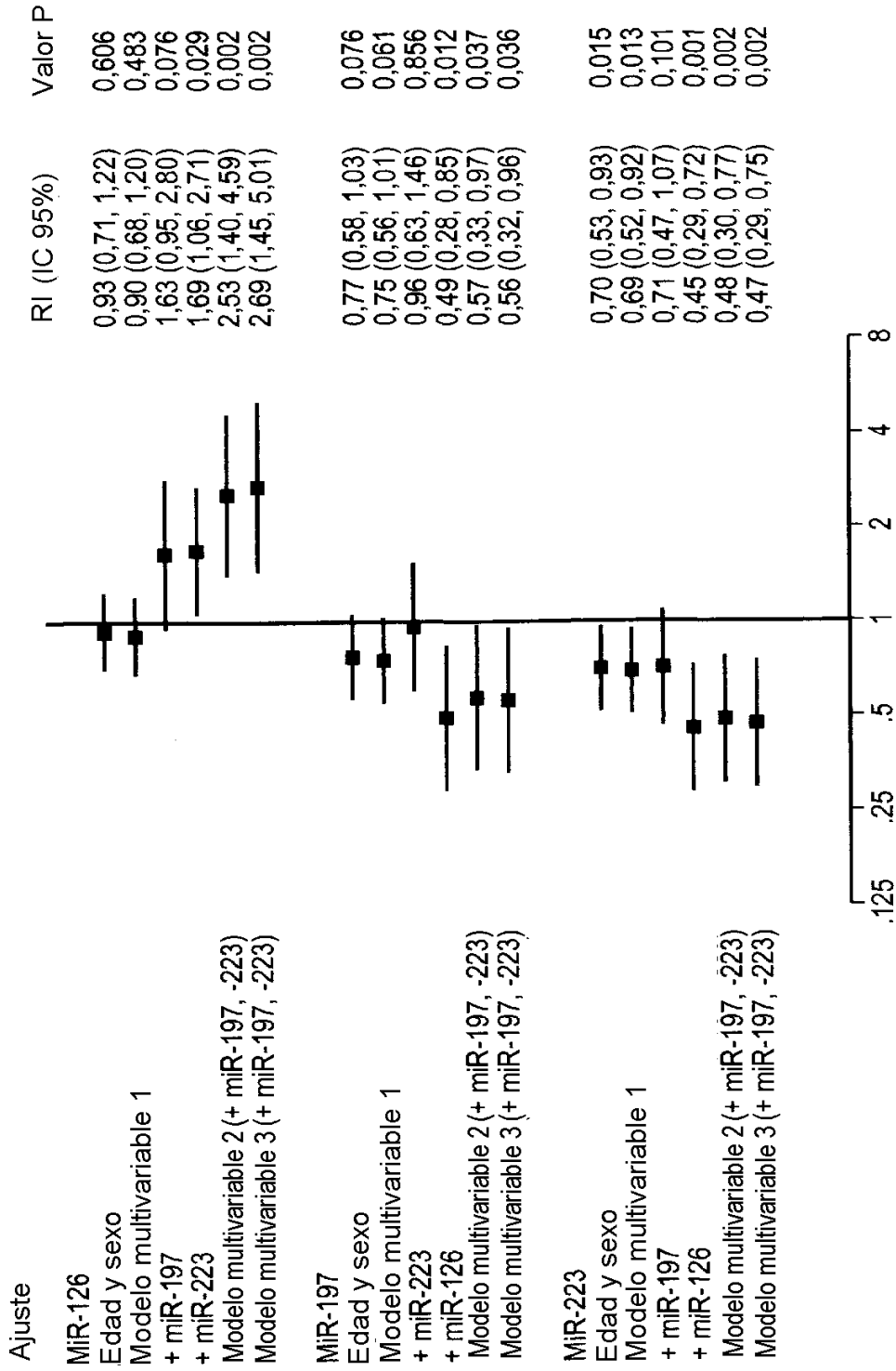


FIG. 2

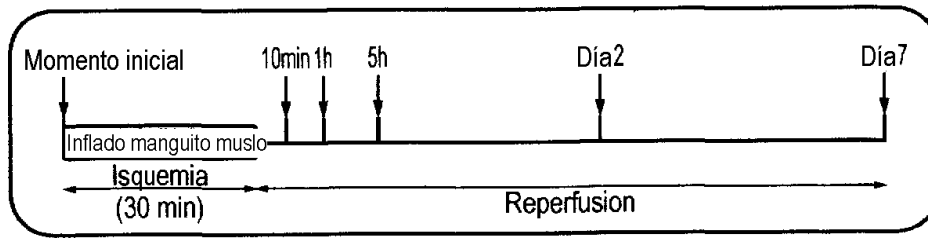


FIG. 3A

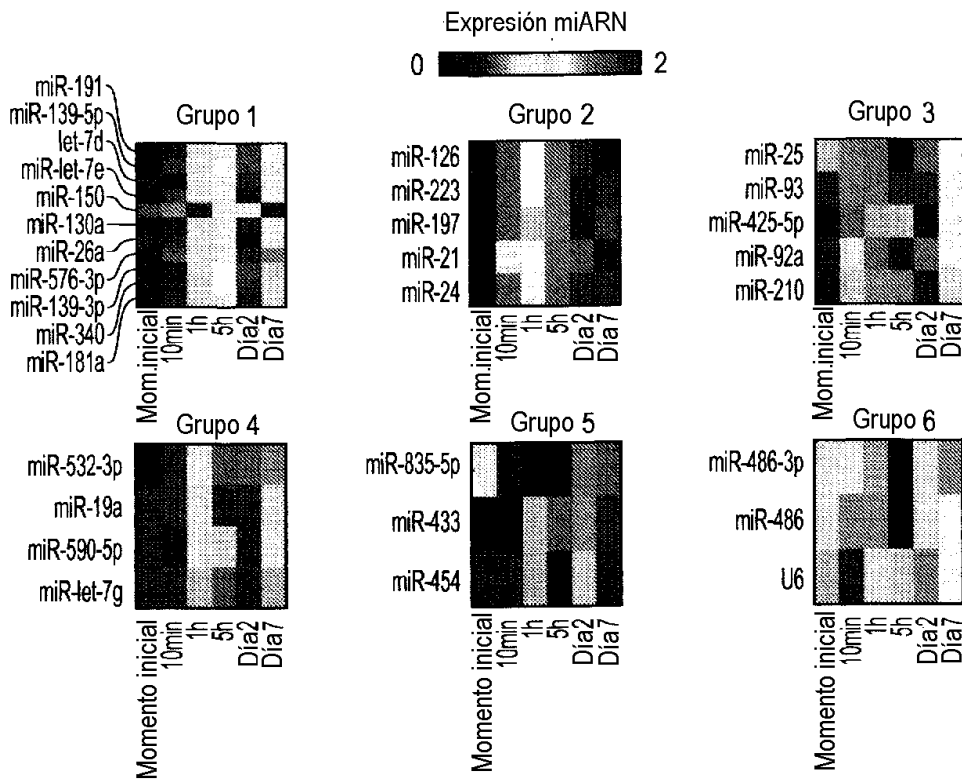


FIG. 3B

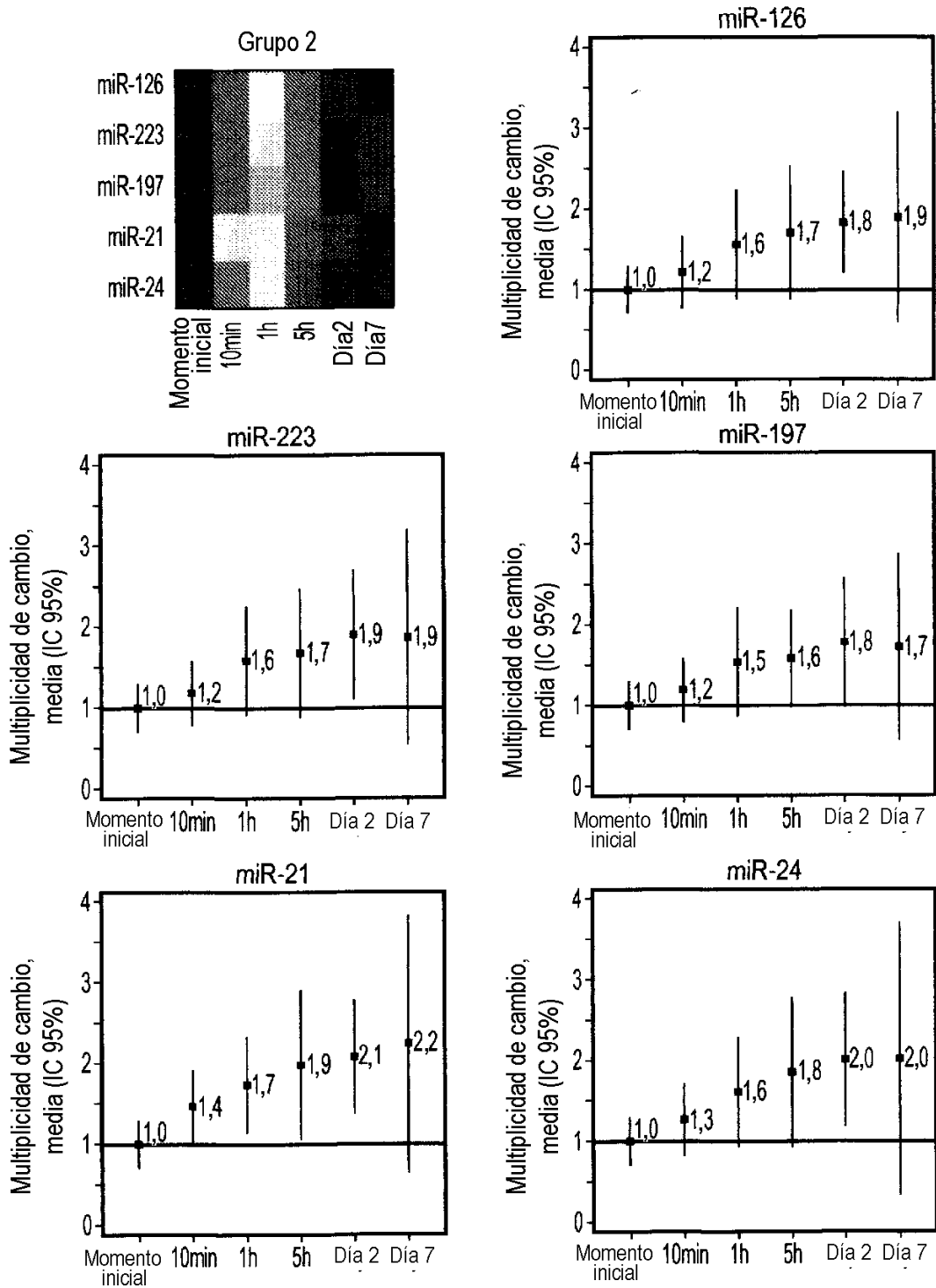


FIG. 4

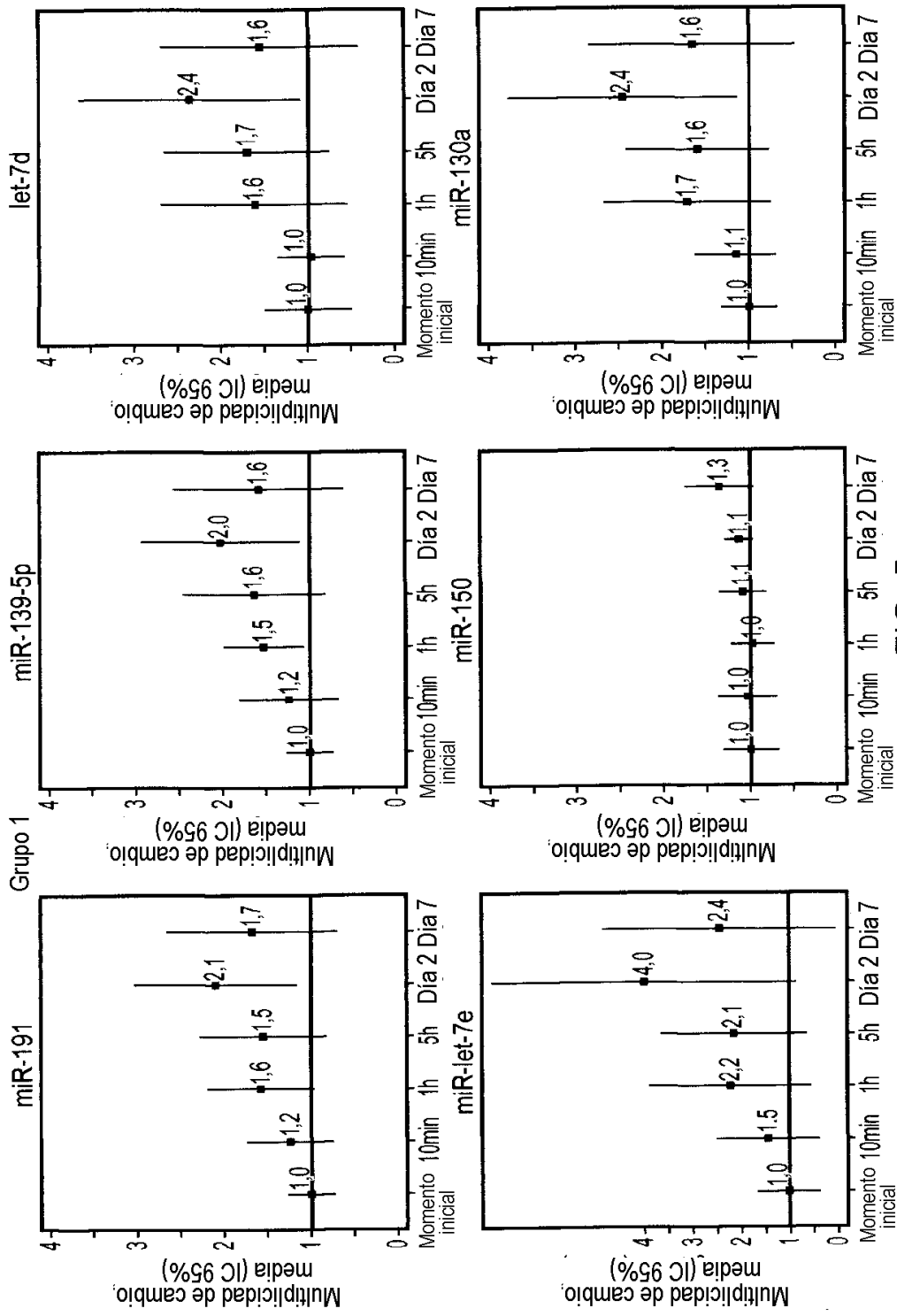


FIG. 5

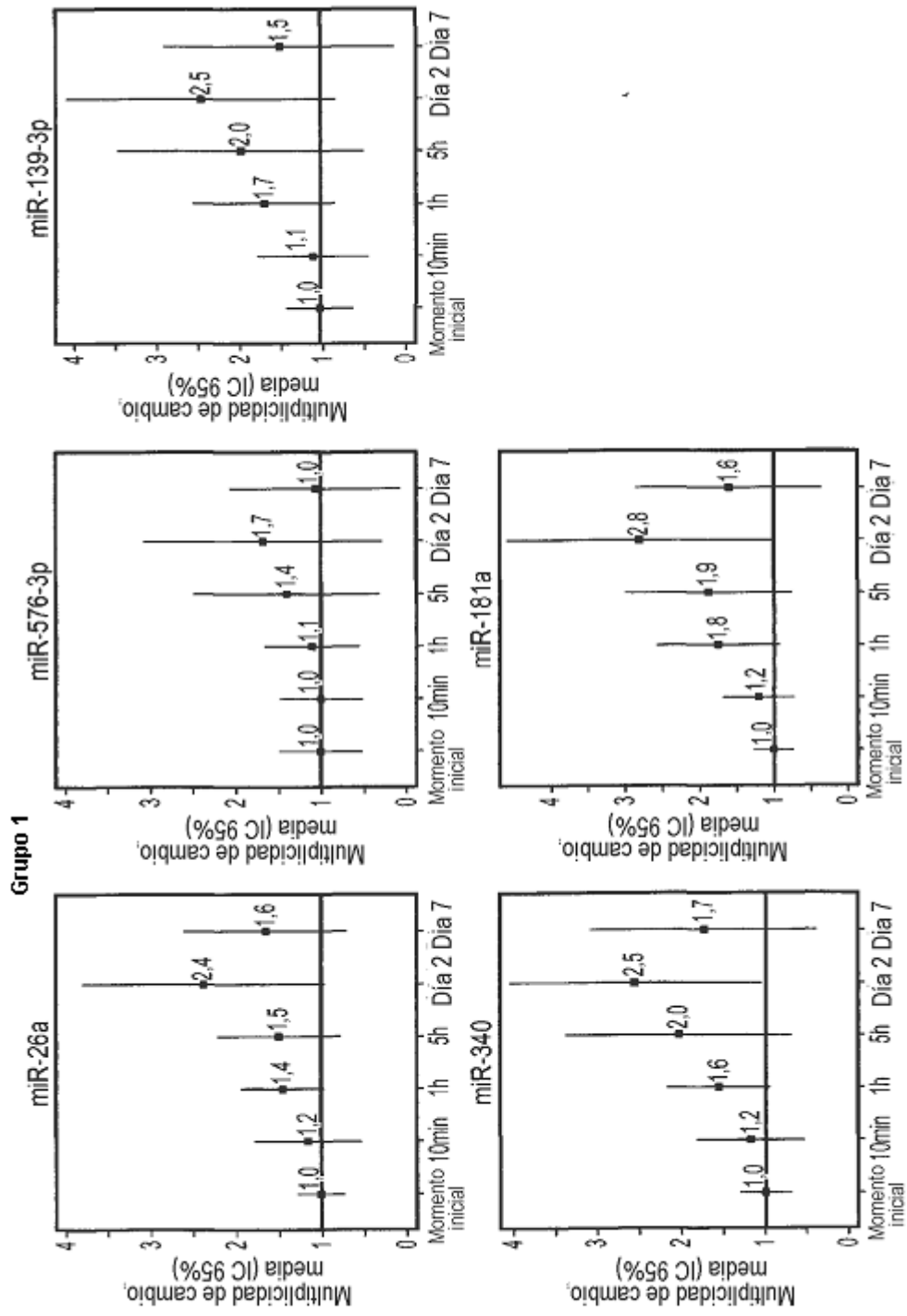


FIG. 5 (continuación)

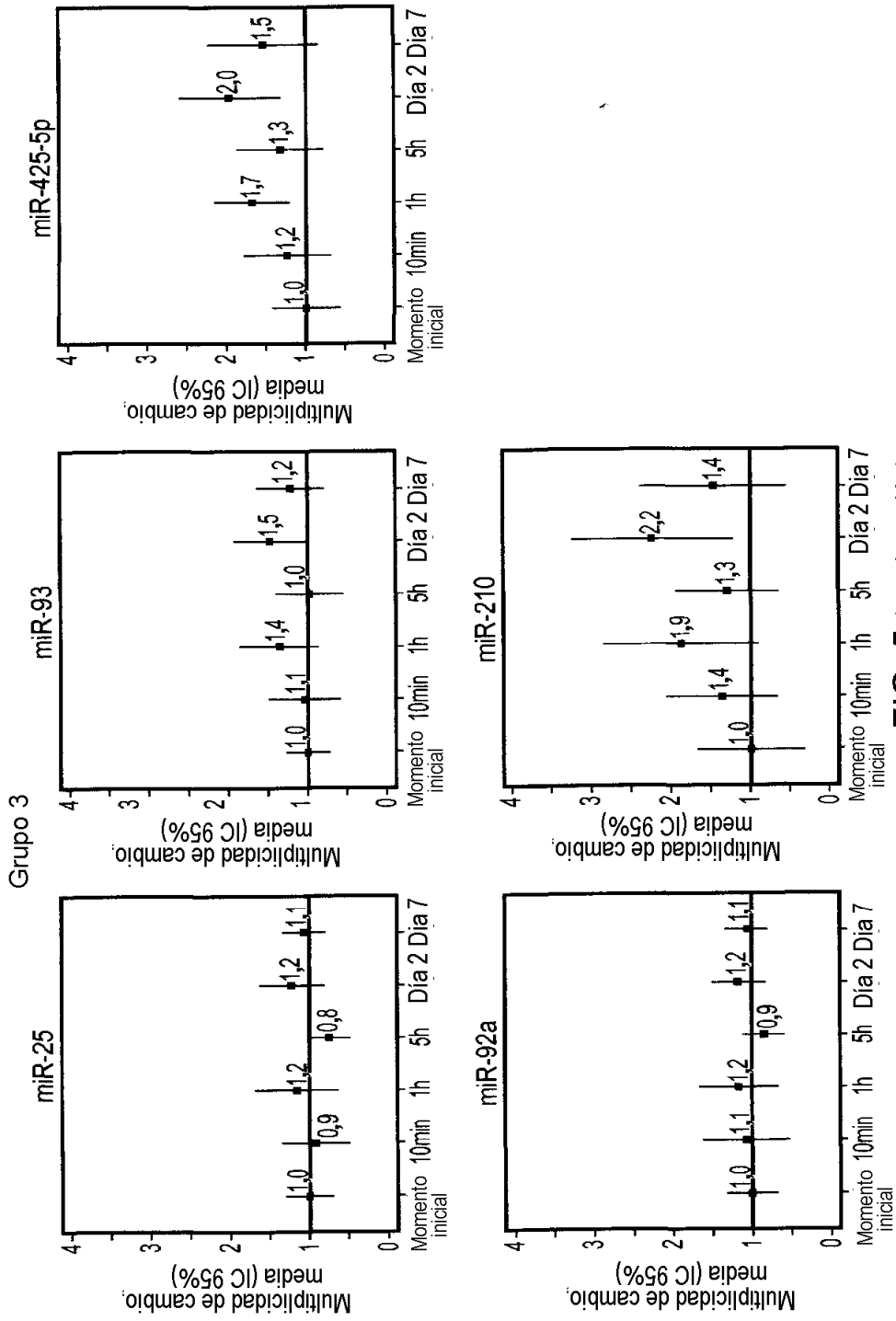


FIG. 5 (continuación)

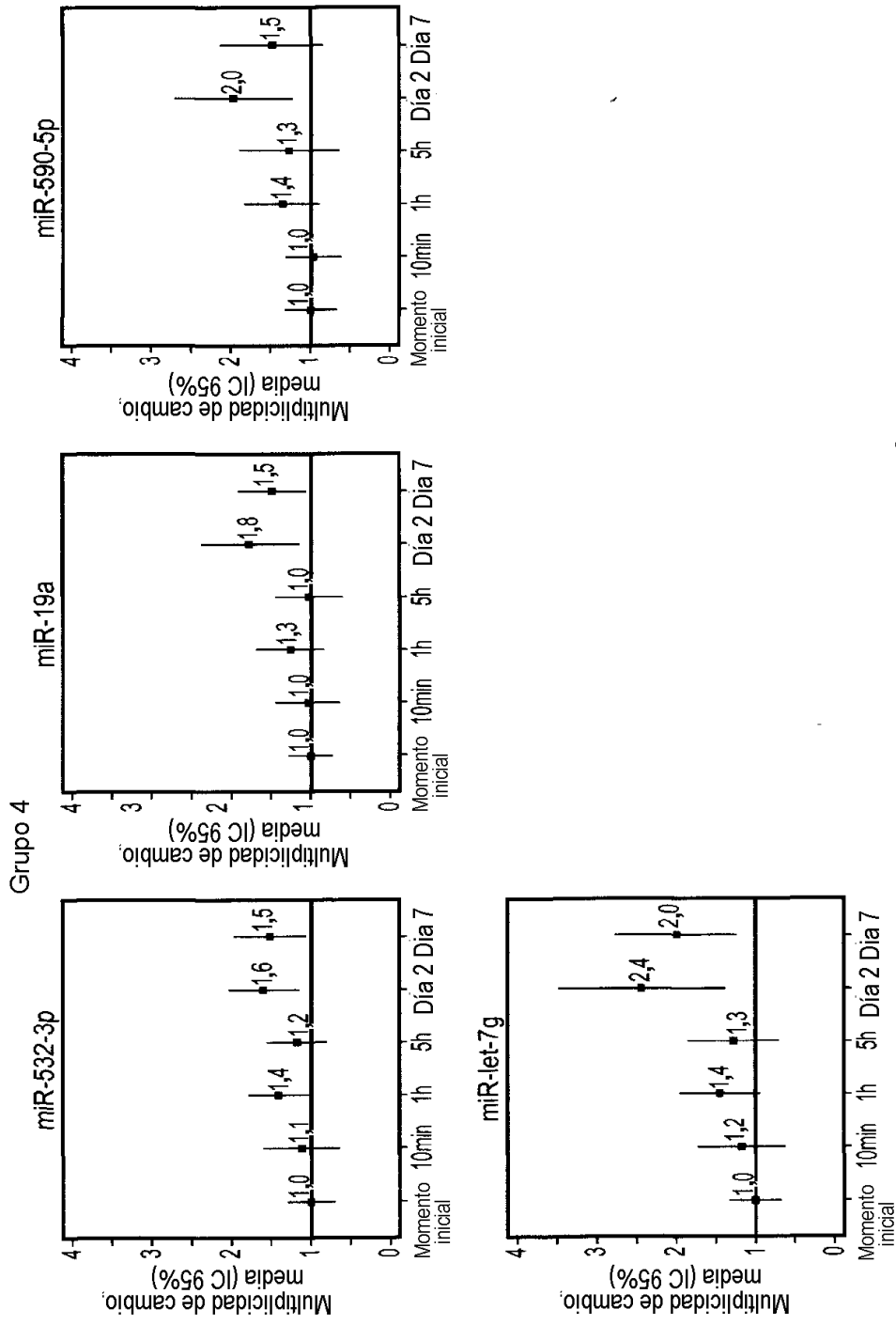


FIG. 5.(continuación)

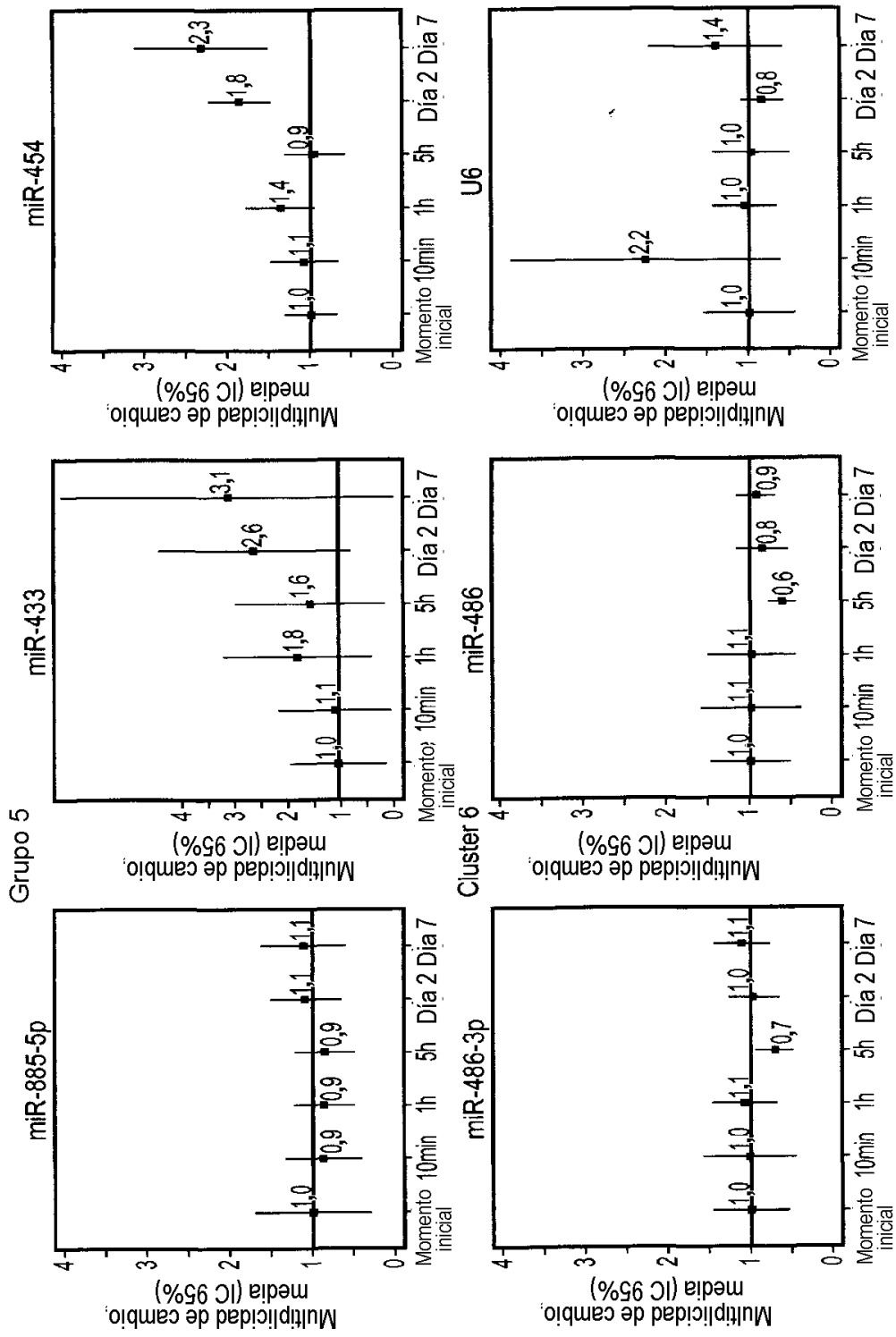


FIG. 5 (continuación)

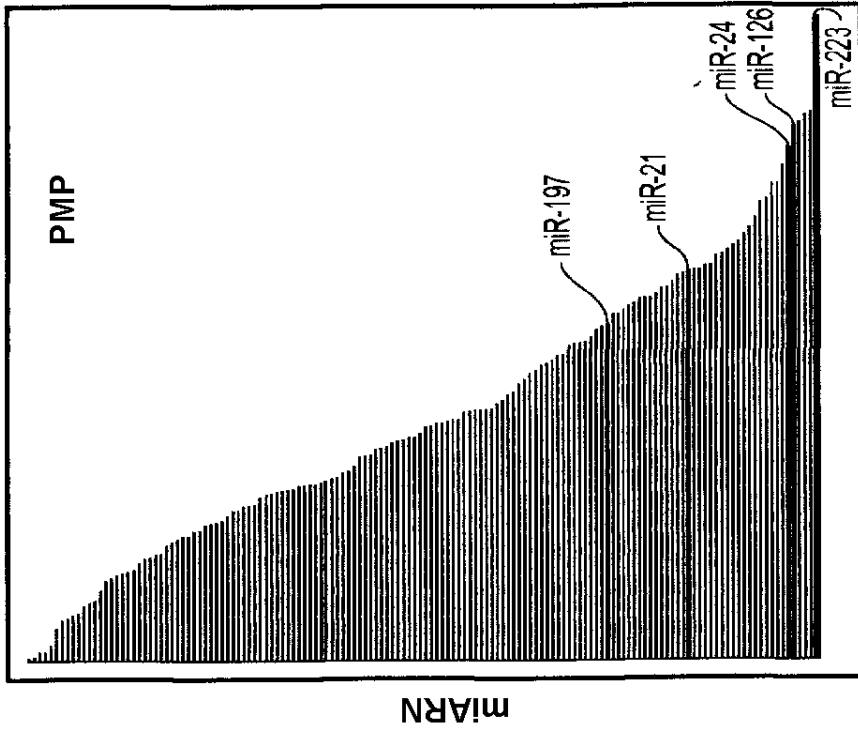


FIG. 6B

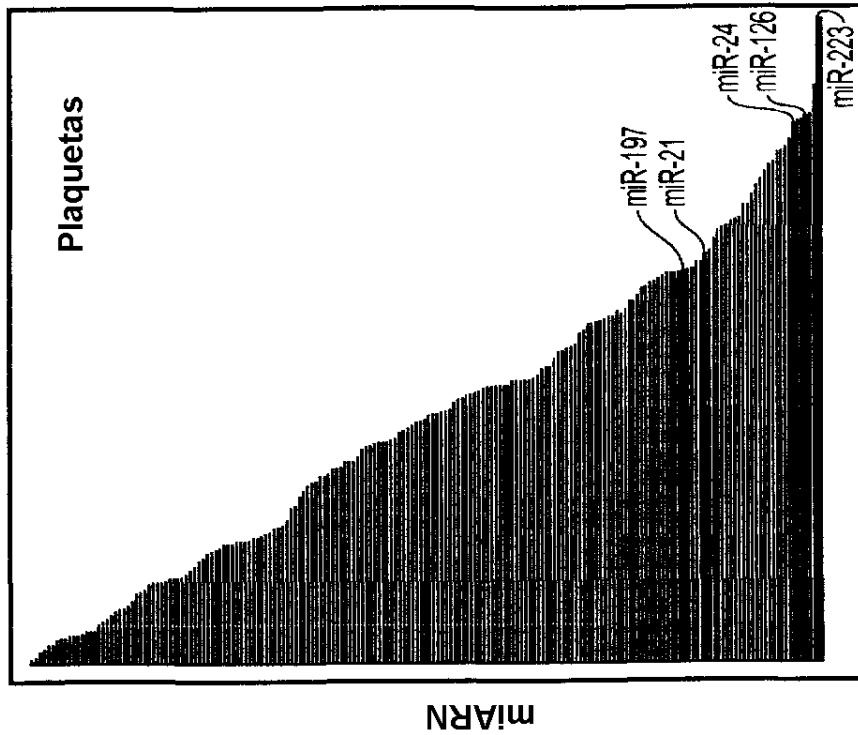


FIG. 6A

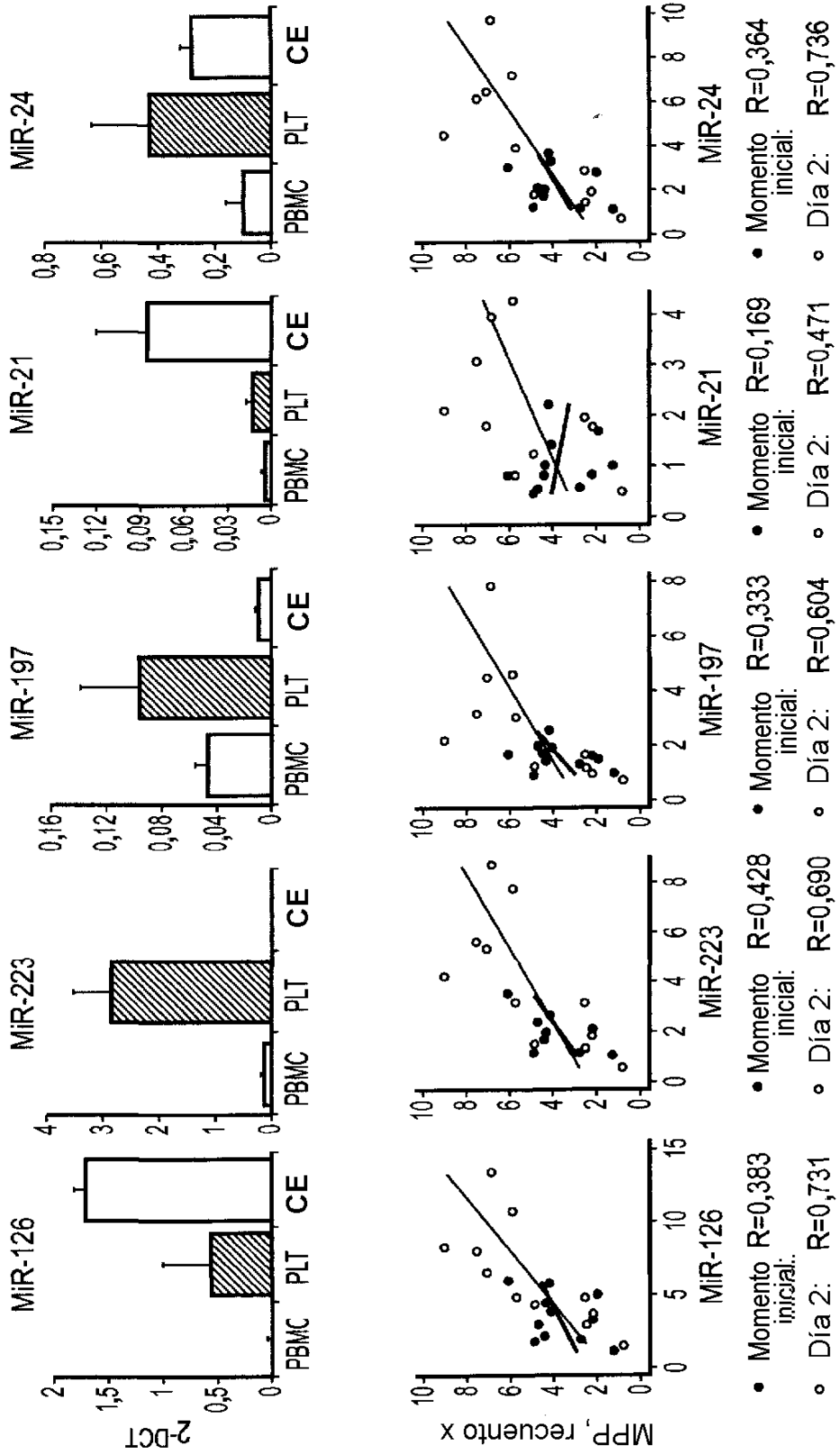


FIG. 6C

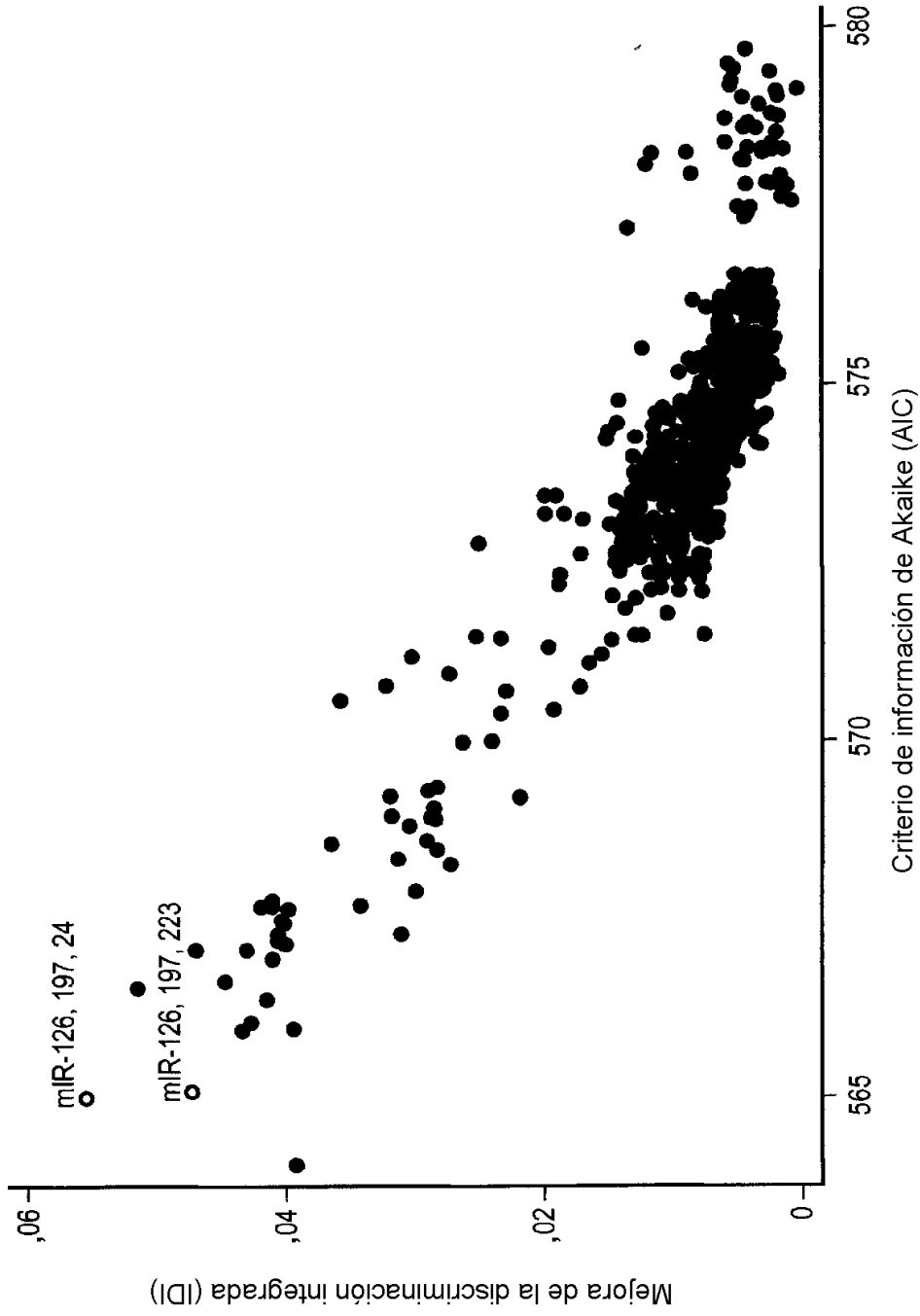


FIG. 7

Pacientes con estenosis sintomática de la carótida (n=6)

Base = momento inicial, sin terapia
 48h = después de 48 h en terapia anti-plaquetas dual

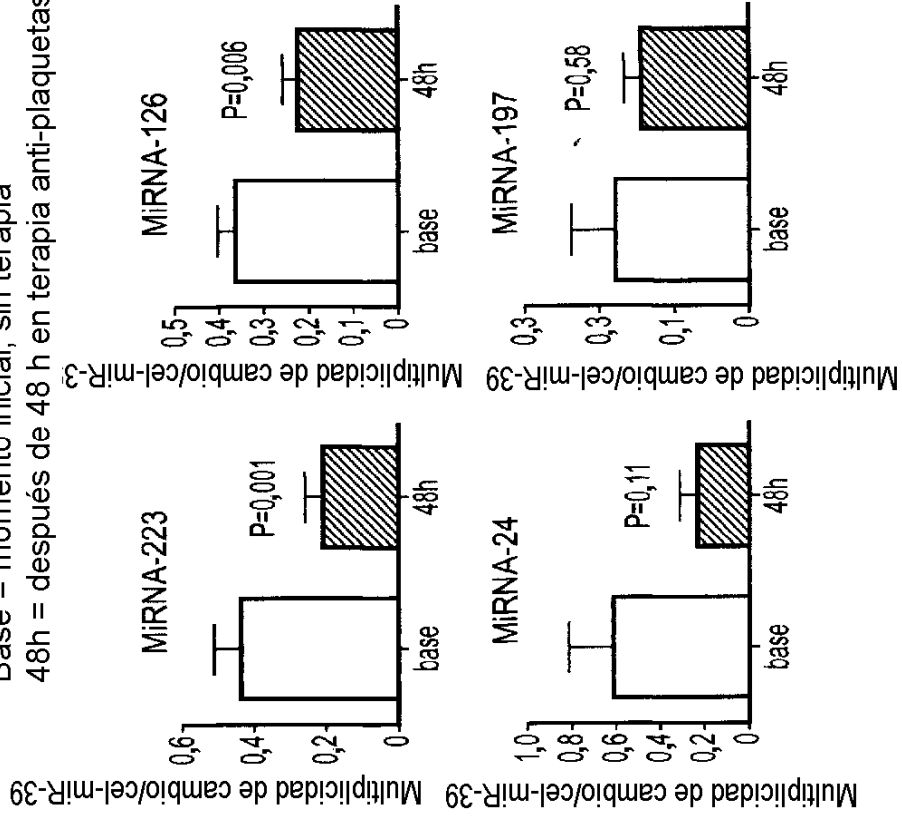


FIG. 8B

* Voluntarios sanos (n=9)
 1 = momento inicial, sin terapia
 2 = +1 semana, 10 mg prasugrel
 3 = +1 semana, 10 mg prasugrel + 75 mg ASS
 4 = +1 semana, 10 mg prasugrel + 300 mg ASS

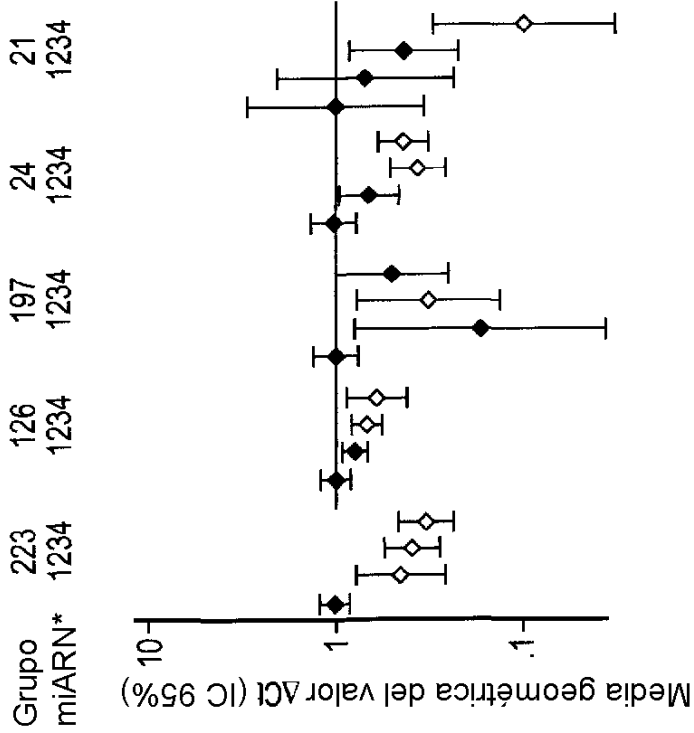


FIG. 8A