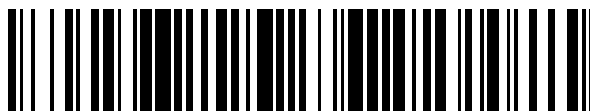


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 415**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016 PCT/EP2016/079335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17093353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016 E 16808590 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3384043**

54 Título: **Método para diagnosticar miocardiopatías**

30 Prioridad:

01.12.2015 EP 15382596

01.12.2015 EP 15197221

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

04.11.2020

73 Titular/es:

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CARDIOVASCULARES CARLOS III (F.S.P.)
(100.0%)**

**C/ Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍN FERNÁNDEZ, MARÍA PILAR;
SÁNCHEZ DÍAZ, RAQUEL;
MATESANZ MARÍN, ADELA;
JIMÉNEZ BORREGUERO, LUIS JESÚS y
SÁNCHEZ MADRID, FRANCISCO**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 791 415 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

Método para diagnosticar miocardiopatías

5 Antecedentes de la invención

La inflamación del miocardio o miocarditis es una enfermedad de etiología heterogénea, provocada a menudo por un patógeno infeccioso (bacterias, virus, hongos o protozoos) (Andreoletti *et al.* 2009) o por un trastorno autoinmunitario (Frustaci *et al.* 2009), que puede provocar una miocardiopatía dilatada (Felker *et al.* 2000). Las células T CD4⁺ son necesarias y suficientes para el desarrollo de miocarditis (Smith y Allen, 1991; Smith y Allen, 1993). Específicamente, los linfocitos T_H17 (Sonderegger *et al.* 2006) y la citocina IL-23 son críticos para el desarrollo de la patología, siendo las células T_H17 más inmunopatogénicas que las células T_H1 cuando se transfieren de manera exógena (Rangachari *et al.* 2006). Además, la supresión de la diferenciación de células T_H17 a través del bloqueo de la ruta de señalización de IL-6 previene el desarrollo de MAE (miocarditis autoinmunitaria experimental) (Sonderegger *et al.* 2008; Yamashita *et al.* 2011). Con respecto a la IL-17, se ha observado que esta citocina no participa en el desarrollo inicial de la miocarditis, pero desempeña un papel crucial en la fibrosis y la remodelación que experimenta el corazón en los estadios más avanzados de la enfermedad (Baldeviano *et al.* 2010). En humanos, la relevancia clínica de las células T_H17 está a punto de verificarse, y de hecho, en pacientes con miocarditis viral, ya se ha detectado la expresión de IL-17A y ROR γ t en el corazón y se ha observado que las células T_H17 ayudan a las células B a producir anticuerpos contra proteínas cardíacas (Yuan *et al.* 2010). Sin embargo, se han realizado escasas investigaciones sobre las células T_H17 que circulan en la sangre de pacientes con miocarditis. Sólo se conoce un estudio en el que se comparó la proporción de linfocitos T_H17 en la sangre de pacientes con miocardiopatía dilatada con la de sujetos sanos, existiendo un mayor porcentaje de células T_H17 y un mayor número de IL-17, IL-6, IL-23 y células ROR γ t en la sangre de sujetos enfermos con respecto a la sangre de individuos sanos (Yi *et al.* 2009).

Las células T reguladoras son otra población de células T CD4⁺ que son cruciales en el desarrollo de miocarditis. Se ha detectado la expresión de FoxP3 en biopsias de endocardio de pacientes con miocardiopatía dilatada (Noutsias *et al.* 2011). Además, la reducción de las células Treg permite el desarrollo espontáneo de miocarditis (Ono *et al.* 2006), mientras que la transferencia exógena de células Treg limita la inflamación cardíaca y atenúa la replicación viral en respuesta a la infección con CVB3 o *Trypanosoma cruzi* (Mariano *et al.* 2008; Shi *et al.* 2010). Las células Treg también son responsables de inducir tolerancia por vía nasal contra autoantígenos, lo que previene que la infección por CVB3 evoluciones a miocarditis crónica (Fousteri *et al.* 2011). Del mismo modo, la citocina IL-10 limita la inflamación autoinmunitaria del corazón mediante la tolerancia inducida por vía nasal (Kaya *et al.* 2002). Sin embargo, existe una discrepancia sustancial con respecto al valor predictivo de la proporción de linfocitos Treg que circulan en la sangre en pacientes con patologías cardíacas agudas y crónicas (Ammirati *et al.* 2010; Carvalheiro *et al.* 2012; Sardella *et al.* 2007).

Estudios recientes estiman la prevalencia de miocarditis en aproximadamente 22 de cada 100,000 pacientes anualmente (Clasificación Internacional de Enfermedades, OMS), y la Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología clasifican la miocarditis como la tercera causa principal de muerte súbita de origen cardíaco en atletas profesionales. Además, entre el 1 y el 5% de los pacientes con infección viral aguda desarrollan miocarditis. El diagnóstico de miocarditis realizado basándose en signos clínicos, datos de laboratorio, ECG y ecográficos no siempre es fácil. Además, una prueba diagnóstica no invasiva segura y sensible para confirmar el diagnóstico de miocarditis aguda, en comparación con otras patologías con lesión miocárdica como la enfermedad coronaria aguda, no está disponible en la actualidad. La biopsia endomiocárdica (BEM) todavía se considera el método de referencia de diagnóstico de la miocarditis. Sin embargo, la BEM no se realiza habitualmente debido a motivos de seguridad; el 6% de complicaciones de amplio rango y la incidencia del 0,4 de muerte por perforación.

La miocarditis aguda se resuelve en aproximadamente el 50% de los casos en las primeras semanas, sin embargo, el 25% desarrolla insuficiencia cardíaca crónica que puede evolucionar a miocardiopatía dilatada en fase terminal y trasplante de corazón. Por tanto, el diagnóstico precoz de la enfermedad es vital para el tratamiento específico del paciente (antivirales, inmunosupresores, terapias para la insuficiencia cardíaca, etc.) para evitar el desarrollo posterior de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con miocarditis aguda tienen síntomas comunes con los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Por tanto, es necesario proporcionar herramientas en la práctica clínica para el diagnóstico diferencial de la miocarditis aguda y el IAM, ya que la miocarditis aguda simula a menudo un infarto de miocardio y el diagnóstico diferencial es muchas veces difícil ya que la biopsia intramiocárdica no es una técnica de diagnóstico de rutina. Esto hace a menudo que estos pacientes se sometan a una angiografía coronaria y una IRM con contraste para descartar isquemia, con el consiguiente daño al paciente, retraso en la elección del tratamiento inmunosupresor de preferencia y altos gastos médicos asociados con la angiografía coronaria y la IRM como los únicos métodos fiables para distinguir esta miocarditis de IAM. Por tanto, la miocarditis es un reto de diagnóstico que no tiene solución en la práctica clínica.

La presente invención resuelve este problema al proporcionar un ensayo capaz de garantizar un grado aceptable de especificidad y sensibilidad para diagnosticar miocarditis, durante un episodio agudo, mediante el uso de muestras de sangre, particularmente muestras de plasma o suero.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método *in vitro* para diagnosticar una miocardiopatía en un sujeto humano, en el que el método comprende usar, como indicador, los niveles de expresión obtenidos a partir de una muestra biológica aislada del sujeto humano, preferiblemente una muestra de sangre, plasma o suero, de uno o más de los siguientes miARN: miR-721 y/o miR155, y obtener un resultado del método comparando los niveles de expresión de uno o más miARN con un valor de referencia o con los niveles de expresión de un control, indicador de la ausencia de miocardiopatía.

Más particularmente, la presente invención proporciona un método *in vitro* para diagnosticar miocarditis durante un episodio agudo. La miocarditis es una enfermedad mediada por Th17 caracterizada por la presencia de infiltrados inmunitarios que desencadena necrosis y fibrosis de miocardiocitos del corazón y, por tanto, disfunción cardíaca progresiva. Comparte síntomas comunes con el infarto agudo de miocardio, por lo que es importante encontrar biomarcadores para el diagnóstico diferencial específico de miocarditis, preferiblemente durante el episodio agudo, frente a infarto agudo de miocardio. El MiR-721, que se encuentra sobreexpresado en el modelo de ratón con miocarditis autoinmunitaria experimental (MAE) agravada y células Th17, se muestra en el presente documento como una diana excelente para tal diagnóstico diferencial. En este sentido, se encontró miR-721 sobreexpresado en el suero, ganglios linfáticos drenantes y células Th17 aisladas de ratones con MAE. Además, pudo detectarse miR-721 en el suero de MAE pero no en condiciones basales. Puesto que se encontró Th17 y miR-721 regulados por incremento en pacientes con miocarditis y ausencia de respuesta de Th17 en pacientes con infarto agudo de miocardio, se estimó que miR-721 es una potente herramienta de diagnóstico para distinguir entre ambas patologías.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la complementariedad de secuencia de la familia de miARN 130/301/721 y la localización cromosómica de los mismos.

La figura 2 muestra la secuencia y la estructura secundaria de miARN-721. Datos obtenidos a partir de miR Base.

La figura 3 muestra un ejemplo de la estrategia de clonación de miR-721. Se diseñaron oligos que contenían las secuencias flanqueantes de miR-721 inmaduro, de tal manera que se clonó un fragmento de aproximadamente 100 pares de bases que flanquea la secuencia de miR-721 maduro.

La figura 4 muestra el diseño de la secuencia de esponja de miR-721 para la clonación en el vector lentiviral pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP. La secuencia complementaria de miR-721 se muestra en color rosa y los espaciadores se muestran en color azul.

La figura 5 muestra el esquema de clonación de miR-721, el miR-721 de esponja y la expresión del mismo en vectores lentivirales. El diseño y la clonación de miR-721 en plásmido, la expresión de miARN-721 maduro y el diseño y la clonación de secuencias de esponja se muestran a la izquierda pSIN-BX/pHRSIN (miR-721 inmaduro) y pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (secuencia de esponja para miR-721). El esquema de los procesos de producción de lentivirus y los ensayos funcionales se muestran a la derecha.

La figura 6 muestra la expresión relativa de miR-721 en células T CD4⁺ indiferenciadas, células Treg y células T_H17 aisladas de ratones CD69WT y CD69KO. Las barras de error representan la media $\pm$ D.E. (* P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, prueba de la t de Student).

La figura 7 muestra la expresión de miR-721 en células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) primarias CD69WT y CD69KO. Las MLEC se aislaron de los pulmones de 7 ratones WT (*wild-type*, de tipo natural) y 7 ratones CD69KO.

La figura 8 muestra la alineación de secuencias complementarias entre la familia miR-130/301/721 y el extremo 3'UTR del gen Meox-2.

La figura 9 muestra la alineación de secuencias complementarias entre la familia miR-130/301/721 y el extremo 3'UTR de los genes CD69 y AHR.

La figura 10 muestra los niveles de expresión de ARNm de Meox-2, CUX1 y AHR en MLEC de ratones CD69WT y CD69KO.

La figura 11 muestra imágenes representativas de MLEC de ratones CD69WT y CD69KO infectados con LV de control, LV de miR-721 de esponja no estimulados (A) o estimulados con PMA/ionomicina (B). Se observa la eficiencia de infección (> 90% de células GFP+) y la adquisición de células del fenotipo proangiogénico después de la estimulación.

La figura 12 muestra el esquema de ensayos funcionales *in vitro* con lentivirus (A). (B) Niveles de expresión de Mmu-miR-721 en Mlec tratadas con PMA/iono. en presencia o no de miR-721 de esponja.

La figura 13 muestra la alineación de secuencias de múltiples especies del miR-721, incluidas las secuencias predictivas de humanos (*Homo sapiens*) y monos (*Rhesus macaca*). El recuadro de color rojo contiene los 21 nucleótidos de las secuencias maduras de miR-721 de cada especie. Los nucleótidos de color verde corresponden a los nucleótidos del bucle predictivo involucrados en la formación de la estructura secundaria del miARN (A). La figura 13B muestra la alineación de secuencias complementarias entre el hsa-miR-721 humano y el extremo 3'UTR de los genes CD69, AHR y Meox2 (B).

La figura 14 muestra el esquema representativo del papel de miARN-721 en procesos de angiogénesis.

La figura 15 muestra el esquema representativo de un experimento convencional de isquemia de la arteria femoral y la monitorización del proceso de revascularización del músculo aductor. Los ratones se analizan los días 1, 7, 14, 21 y 28 después de la cirugía con Doppler con láser y se extraen muestras de sangre de las que se obtienen los linfocitos circulantes para analizar las respuestas de Th17/Treg mediante FACS, y se extraen muestras de suero para analizar el contenido de miARN. En la mayoría de los experimentos, a menos que se indique lo contrario, se sacrifican los ratones el día 28 y se extraen muestras de sangre (linfocitos periféricos y suero), muestras de ganglios linfáticos y muestras de músculo. A: arteria, V: vena, N: nervio.

La figura 16 muestra el análisis de las respuestas de Th17 y Treg durante la primera semana después de la isquemia de la arteria femoral. El porcentaje de células Th17 y Treg se analizó después del marcaje intracelular con IL-17 y Foxp3, respectivamente, mediante citometría de flujo. N = 10. Los datos representan la media +/- desviación estándar. ANOVA (prueba *a posteriori* de Bonferroni).

La figura 17 muestra los niveles de expresión de miR-721 en el suero de ratones con isquemia de la arteria femoral. Los niveles en suero de miR-721 se midieron mediante qPCR. N = 5. Los datos representan la media +/- desviación estándar. Prueba de la T (Mann-Whitney).

La figura 18 muestra los niveles de expresión de Meox-2 medidos mediante qPCR en el músculo aductor en diversos momentos después de la isquemia femoral.

La figura 19 muestra el análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de Meox-2 en células endoteliales de músculo de ratones después de 7 días desde la isquemia de la arteria femoral. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en músculo de Meox-2 y CD31. B) Cuantificación de CD31, expresión de Meox-2 y la co-localización de ambos en las células endoteliales del músculo isquémico.

La figura 20 muestra, a la izquierda, imágenes de Doppler con láser tomadas 1 y 7 días después de la isquemia de la arteria femoral en ratones CD69 WT y CD69 KO de la cepa BALB/c. A la derecha, la figura muestra la cinética del proceso de revascularización que expresa los valores arbitrarios obtenidos a partir del Doppler con láser como la razón de perfusión entre la pata con isquemia y sin isquemia en el mismo ratón.

La figura 21 muestra el análisis de las respuestas de Th17 en los ganglios linfáticos poplíteos durante la primera semana después de la isquemia de la arteria femoral. El porcentaje de células Th17 se analizó después del marcaje intracelular con IL-17 mediante citometría de flujo.

La figura 22 muestra, a la izquierda, imágenes de Doppler con láser tomadas 7 días después de la isquemia de la arteria femoral en quimeras irradiando ratones BL/6 CD69 WT y reconstituidas con médula ósea de Rag2-/- γ c-/- y BL/6 CD69WT o CD69KO, en una razón 3:1, respectivamente. A la derecha, la figura muestra la cinética del proceso de revascularización que expresa los valores arbitrarios obtenidos a partir del Doppler con láser como la razón de perfusión entre la pata con isquemia y sin isquemia en el mismo ratón.

La figura 23 muestra los niveles de expresión de miR-721 en el suero de quimeras BM BL/6 CD69WT y KO con isquemia de la arteria femoral. Los niveles en suero de miR-721 se midieron mediante qPCR los días 1, 3 y 7 después de la isquemia.

La figura 24 muestra los niveles de expresión de Meox-2 y Cux1 medidos mediante qPCR en el músculo aductor 7 días después de la isquemia femoral.

La figura 25 muestra que los ratones CD69KO presentan inflamación exacerbada en el miocardio durante la fase aguda de MAE. (a) Muestra la imagen tomada mediante tomografía molecular de fluorescencia, que muestra la infiltración de neutrófilos en el miocardio de ratones WT y CD69KO inmunizados por vía subcutánea con CFA/MyHC α o CFA/PBS en el caso de los controles. (b) Muestra la intensidad de la sonda ProSense 750 FAST (que detecta elastasa activada) medida por medio de tomografía molecular de fluorescencia en ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de MAE. Es un experimento representativo de un total de 3 experimentos independientes (n = 6 ratones por grupo) (* P < 0,05, análisis de varianza (ANOVA) de un factor).

La figura 26 muestra el modelo de miocarditis autoinmunitaria experimental (MAE). El modelo de ratón con MAE se induce por medio de inmunización de un péptido derivado de la cadena pesada de α -miosina (MyHC α) emulsionada

con CFA (adyuvante completo de Freund) en los días 0 y 7. Después de 21 días, los ratones están en la fase aguda de la enfermedad, momento en el que se sacrificaron los animales y se extrajeron sus corazones para estudiar la expresión de los miARN presentes en los mismos.

- 5 La figura 27 muestra los niveles de expresión de miARN en el corazón durante la fase aguda de MAE. Se midió la expresión relativa de miR-721 y miR-155 en el corazón de ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de MAE mediante qPCR. Las barras de error representan la media $\pm$ D.E. de 3 experimentos independientes (n = 6). (* P <0,05, ** P <0,01, análisis de varianza (ANOVA) de un factor).
- 10 La figura 28 muestra los niveles de expresión de miARN en suero durante la fase aguda de MAE. Se midió la expresión relativa de miR-721 y miR-155 en suero sanguíneo de ratones WT y CD69KO durante la fase aguda de MAE mediante qPCR. Las barras de error representan la media $\pm$ D.E. (n = 6). (* P <0,05, ** P <0,01, análisis de varianza (ANOVA) de un factor).
- 15 La figura 29 muestra el análisis de linfocitos T CD4⁺ totales en la sangre de pacientes con miocardiopatías. Se analizaron los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ totales presentes en la sangre de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica o miocardiopatía de Takotsubo mediante citometría de flujo. (ns = sin diferencias significativas, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, análisis de varianza (ANOVA) de un factor).
- 20 La figura 30 muestra el análisis de linfocitos T_H17 en la sangre de pacientes con miocarditis y miocardiopatías dilatadas. Se analizaron los porcentajes de linfocitos T_H17 con respecto a las células T CD4⁺ totales presentes en la sangre de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica o miocardiopatía de Takotsubo mediante citometría de flujo. (ns = sin diferencias significativas, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, análisis de varianza (ANOVA) de un factor).
- 25 La figura 31 muestra el análisis de linfocitos Treg en la sangre de pacientes con miocarditis y miocardiopatías dilatadas. Se analizaron los porcentajes de linfocitos Treg totales, Treg indiferenciados y Treg de memoria presentes en la sangre de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica o miocardiopatía de Takotsubo mediante citometría de flujo. (ns = sin diferencias significativas, * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, análisis de varianza (ANOVA) de un factor).
- 30 La figura 32 muestra los niveles de expresión de miARN en el plasma sanguíneo de pacientes con miocarditis y miocardiopatías dilatadas. Se midió la expresión relativa de miR-155 y miR-721 en el plasma sanguíneo de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica y síndrome de Takotsubo mediante qPCR. Las barras de error representan la media $\pm$ D.E. (análisis de varianza (ANOVA) de un factor).
- 35 La figura 33 (A) muestra los niveles de expresión de miR-721 de ratón en el suero de ratones en la fase aguda de MAE (parte izquierda) y los niveles de expresión de miR-721 y miR-155 humanos en el plasma sanguíneo de pacientes con miocardiopatías (parte derecha). (B) Esquema del modelo de ratón de ligadura de la arteria coronaria descendente para simular un infarto agudo de miocardio usado en este estudio, se muestran los niveles de Th17 y miR-721 murino en la sangre y el plasma, respectivamente. La barra de color naranja representa la manifestación de los síntomas clínicos (dolor torácico, fatiga, ECG alterado...).
- 40 Figura 34. MiR-721 está presente en exosomas de células inmunitarias con inducción de MAE. A. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de miR-721 en exosomas de los ganglios linfáticos drenantes (dLN) recogidos de ratones CD69^{-/-} y de tipo natural con inducción de MAE *in vivo*. N = 6 animales por grupo (media con E.E.M.). B. Análisis de la expresión de miR-721 en exosomas de células Treg y Th17 clasificadas cultivadas durante 48 h. ND significa no detectado. Media $\pm$ E.E.M.
- 45 La figura 35 muestra los parámetros clínicos de algunos de los pacientes con IAM y miocarditis incluidos en el estudio. ECG; electrocardiograma, IRM; obtención de imágenes por resonancia magnética, ABX; antibióticos, CK; creatinina cinasa.
- 50 La figura 36 muestra el análisis mediante citometría de flujo de los linajes hematopoyéticos en pacientes con miocarditis aguda (Myo) e infarto agudo de miocardio (IAM) en comparación con voluntarios sanos. Se muestran los porcentajes de granulocitos, monocitos, células T CD4⁺ (A). Las células CD4⁺ de regulación posterior al análisis muestran los porcentajes de Th1, Th17, Th22 y células T reguladoras indiferenciadas y de memoria en las muestras anteriores (B).
- 55 La figura 37 muestra los niveles de expresión de miARN en el plasma sanguíneo de pacientes con miocarditis aguda (Myo) y pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) en comparación con voluntarios sanos (A). Niveles de expresión de miARN en la fracción exosómica del plasma sanguíneo obtenido después del aislamiento mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) (B).
- 60 La figura 38 muestra un esquema del enfoque diagnóstico propuesto como biopsia líquida cardiovascular. Durante la progresión de la miocarditis, los síntomas aparecen cuando la población Th17 circula en la sangre, de modo que puede
- 65

detectarse la presencia de hsa-miR-721/155 en el plasma sanguíneo y los exosomas secretados. Además, después de un IAM cuando aparecen los síntomas, la población Th17 está ausente en la sangre y, por tanto, no puede detectarse hsa-miR-721/155 en el plasma sanguíneo o los exosomas secretados. Estas diferencias en las dos miocardiopatías hacen posible usar la presencia de hsa-miR-721/155 en plasma sanguíneo o los exosomas como marcador de diagnóstico diferencial para pacientes con miocarditis simplemente tomando una muestra de sangre o con una "biopsia líquida cardiovascular" sin la necesidad de realizar una biopsia endomiocárdica.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, basándose en la determinación de que los ratones con miocarditis presentan niveles de expresión de miR-721 y miR-155 en suero sanguíneo mucho mayores que los de ratones de control, se analizó la expresión de estos miARN en el plasma de pacientes con diferentes miocardiopatías. El resultado fue un aumento extraordinario de la expresión de miR-721 y miR-155 en el plasma de pacientes con miocarditis aguda en comparación con sujetos sanos. Los pacientes en la fase crónica de la enfermedad también presentaron niveles de expresión de estos miARN que fueron mucho mayores que los de voluntarios sanos, pero no tan altos como durante la fase aguda. Además, con respecto a la miocardiopatía de Takotsubo, el aumento espectacular de la expresión de miR-721 y miR-155 en la sangre de pacientes con este síndrome en comparación con sujetos de control es sorprendente. Estos resultados señalan el posible papel de estos miARN en la fisiopatología de la miocarditis, preferiblemente durante el episodio agudo, y la miocardiopatía dilatada. En este sentido y basándose en estos resultados, la presente invención proporciona una nueva estrategia para el diagnóstico de miocarditis, en particular durante el episodio agudo, basándose en la determinación de miR-721 y/o miR-155 en muestras de sangre, suero o plasma.

Además, se observa que cuando un paciente llega al hospital con un dolor en el tórax, a menudo es difícil distinguir entre infarto agudo de miocardio (IAM) y miocarditis porque estas dos patologías comparten la mayoría de los síntomas, tales como arritmias, elevación del segmento ST, los niveles circulantes de troponina o proteína C reactiva (Fung *et al.*, 2016), etc. Por tanto, los médicos clínicos habitualmente realizan técnicas invasivas para tratar el IAM, puesto que esta enfermedad es más dañina. Sin embargo, el fenotipo autoinmunitario caracterizado por un alto nivel de células T CD4+ y de Treg/Th17 en pacientes con miocarditis no se observa en pacientes con IAM. Además, los resultados recientes del laboratorio de los inventores mostraron que miR-721 no se expresa en el suero de modelos de ratón para infarto de miocardio justo después del episodio, sino sólo alrededor de dos semanas más tarde, igualando el pico de respuesta de Th17 desarrollado tras un infarto para resolver la lesión. Puesto que miR-721 está altamente regulado por incremento en pacientes con miocarditis aguda y crónica cuando llegan al hospital, es un potente biomarcador para la miocarditis. Por tanto, la estrategia no invasiva propuesta en la presente invención es un enfoque rápido y eficiente para dilucidar el diagnóstico entre estos dos eventos cardiovasculares.

Además, el aumento extraordinario de la expresión de miR-721 en el plasma de pacientes con miocarditis aguda en comparación con sujetos sanos se debe al hecho de que miR-721 está presente significativamente en los exosomas de las células Th17. Hasta donde saben los inventores, esta es la primera vez que se describe que miR-721 está regulado por incremento en los exosomas de Th17 en enfermedades caracterizadas por una respuesta de Th17 exacerbada (véanse los ejemplos 5.1 o 5.2) tales como miocarditis, en particular durante el episodio agudo. Tal aumento extraordinario debido a su localización aumentada en los exosomas facilita la detección de dicho biomarcador (miR-721) en muestras no invasivas tales como muestras biológicas de sangre, suero o plasma y, por tanto, el diagnóstico de enfermedades tales como miocarditis aguda en sujetos humanos.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para obtener datos útiles para diagnosticar una miocardiopatía en un sujeto humano, preferiblemente para la detección o el diagnóstico de una miocardiopatía en un sujeto humano, en el que el método comprende usar, como indicador, los niveles de expresión obtenidos a partir de una muestra biológica aislada del sujeto humano, de uno o más de los siguientes miARN: miR-721 y/o miR155, y obtener un resultado del método al comparar los niveles de expresión de dichos uno o más miARN con un valor de referencia o con los niveles de expresión de un control, indicador de la ausencia de tal miocardiopatía.

En la presente invención, SEQ ID NO 1 se entiende como CAGUGCAAUUAAGGGGGAA (secuencia de miR-721 murino). Las variaciones de dicha secuencia asociadas con las diferentes secuencias de miR-721 en diferentes especies están incluidas en esta definición, tales como la secuencia de miR-721 en humanos que es UCUUGCAAUUAAGGGGGAA ilustrada en el presente documento como SEQ ID NO 4. Hsa-miR-721 está ubicado dentro de la región: secuencia de referencia de NCBI: NC_000008.11 (REGIÓN: 95353371...95353588).

En el artículo de Wheeler G. *et al.*, FEBS Letters 2006, en el que se identificó miR-721 de ratón, se establece que no se encontraron secuencias homólogas en el genoma humano. Sin embargo, una región de 21 nucleótidos del precursor de ratón está conservada en el genoma del mono y el humano (véase la figura 13). Los 18 nucleótidos en 5' de la coincidencia humana de 21 nucleótidos fueron idénticos a los últimos 18 nucleótidos del miARN de ratón clonado y los últimos 3 nucleótidos de la coincidencia humana de 21 nucleótidos también fueron idénticos a la secuencia del genoma del ratón tras la secuencia de miARN clonado. El miR-721 humano predictivo se localizó en el cromosoma 8, GRCh38.p7. El hsa-miR-721 humano predictivo se detecta con sondas de ratón para Mmu-miR-721.

En la presente invención, SEQ ID NO 2 se entiende como UAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU (miR-155 murino) y SEQ ID NO 3 se entiende como UAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU (miR-155 humano).

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, ejemplos ilustrativos no limitativos de dichas muestras biológicas incluyen diferentes tipos de muestras de tejido, así como muestras de líquidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y heces. Preferiblemente, dichas muestras son muestras biológicas de sangre, suero o plasma.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la miocardiopatía es miocarditis, síndrome de Takotsubo, cardiopatía dilatada, isquemia periférica o Chagas. Más preferiblemente, la miocardiopatía es miocarditis aguda.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas usa, como indicador, los niveles de expresión de uno o más miARN tales como los definidos en SEQ ID NO: 3 o 4 anteriores, y en los que el resultado es un indicador de la existencia de una miocarditis, preferiblemente una miocarditis aguda, o del síndrome de Takotsubo si:

(i) los niveles de miARN definidos en SEQ ID NO: 3 han aumentado con respecto a un valor de referencia o con respecto a los niveles de expresión de un control, indicador de la ausencia de la enfermedad; y/o

(ii) los niveles de miARN definidos en SEQ ID NO: 4 han aumentado con respecto a un valor de referencia o con respecto a los niveles de expresión de un control, indicador de la ausencia de la enfermedad.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero o plasma y dicha muestra biológica se trata con un agente de lisis tal como una composición de detergente o agentes caotrópicos y/o lisis física (por ejemplo, ultrasonidos, agitación vigorosa), capaces de romper la membrana de los exosomas de modo que tales exosomas, en particular los exosomas de las células Th17, liberen su contenido al exterior y, por tanto, liberen miARN tal como miR-721.

En este sentido, se observa que los procedimientos de extracción y manipulación de sangre, suero o plasma deben mejorarse enormemente para el análisis de miARN con el fin de detectar de manera fiable las diferencias entre pacientes sanos y enfermos. Además, las ribonucleasas presentes en la sangre pueden degradar el ARN libre tras la extracción, lo que hace que el miARN extracelular corra el riesgo de degradarse. Por consiguiente, estos factores han disminuido la sensibilidad y la especificidad de los ensayos de biomarcadores de miARN. Los miARN secretados por las células sanguíneas a los exosomas están protegidos frente a la degradación y tienen un mayor potencial como biomarcadores. Para mejorar el uso de miARN como biomarcadores, los exosomas o bien deben aislarse de la sangre, el suero o el plasma mediante diferentes métodos y luego los miARN deben liberarse desde el interior con un agente de lisis para romper la membrana de los exosomas o bien simplemente romperse sin aislarse previamente de modo que liberen su contenido al exterior y, por tanto, liberen miARN tal como miR-721 en la muestra (en la tabla 1 a continuación se muestran ejemplos de agentes de lisis útiles en la presente invención). En cualquier caso, el hecho de que esta es la primera vez que se describe que miR-721 está regulado por incremento en los exosomas de las células Th17 en las muestras de sangre, suero o plasma de pacientes que padecen miocarditis aguda, revela el uso de miR-721 en estas muestras como la herramienta más valiosa para detectar de manera fiable diferencias entre pacientes sanos y enfermos.

Tabla 1.

Agente caotrópico	Fórmula química	Masa molar	Densidad	Solubilidad	Aplicación
Cloruro de guanidinio	CH ₆ CIN ₃	95,53 g · mol ⁻¹	1,354 g/cm ³ a 20°C	muy soluble en agua y etanol	Agente desnaturalizante
Urea	CH ₄ N ₂ O	60,06 g · mol ⁻¹	1,32 g/cm ³	Solubilidad en agua	Agente desnaturalizante
Tiourea	CH ₄ N ₂ S	76,12 g/mol	1,405 g/ml	Solubilidad en agua	Agente desnaturalizante
Fenol	C ₆ H ₆ O	94,11 g · mol ⁻¹	1,07 g/cm ³	Solubilidad en agua	Agente desnaturalizante

Detergente	CMC	MMW	MMr	Concentración de trabajo	Fácil de retirar	Aplicación
Aniónico						
SDS (docecil-sulfato de sodio)	8,3	288,4	18.000	≥ 10 mg por mg de prot.	NO	Proteínas desnaturizantes
DOC (ácido desoxicólico)	1-4	416,6	4.200	0,1-10 mg		Solubilización de proteínas de membrana.
Zwitteriónico						
CHAPS 1-propanosulfonato de (3-(3-colamido-propildimetilamonio)	4	614,9	6.150	6,5-13 mM	SÍ	Solubilización de proteínas de membrana.
No iónico						
Nonidet p-40 (poli(éter de etilenglicol)n de etilfenol)	0,25	606,6 n = 11	90.000	1-10 mM	NO	Solubilización de proteínas
n-Octilglucósido	14,5	292,4		46 mM	SÍ	Detergente suave no desnaturizante para la solubilización de membranas
Monolaurato de sacarosa	0,2	524,6		0,2%-5% (p/v)	NO	Solubilización suave/estabilización de proteínas de membrana.
Triton X100 (poli(éter de etilenglicol)n de octilfenol)	0,2	647,10 n = 10	90.000	13,5	NO	Solubilización/proteínas desnaturizantes.
Tween 20 (monolaurato de poli(oxietileno)n-sorbitano)	0,06	1228 n = 20		≥ 10 mg/mg de lípidos de membrana	NO	Detergente no desnaturizante.

En el contexto de la presente invención, el término “composición de detergente” se entiende como una composición que comprende moléculas anfipáticas (que contienen cabezas hidrófilas polares y colas hidrófobas apolares) que permiten la rotura y la formación de interacciones hidrófobas-hidrófilas entre las moléculas. En la investigación biológica, los detergentes tales como el oxietileno, el terc-octilfenol o los polímeros de éter de etilenglicol se usan para solubilizar membranas derivadas de células, tales como membranas plasmáticas, membranas de orgánulos o exosomas extracelulares para permitir la liberación de su contenido. Para no interferir con proteínas solubles, puede usarse n-octilglucósido u otro detergente suave no desnaturizante para la solubilización de proteínas.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero o plasma y tal muestra biológica se trata de modo que se obtenga la fracción exosómica de las células Th17 y se realiza la determinación de los niveles de expresión de miR-721 en tal fracción exosómica mediante el uso de un agente de lisis, tal como una composición de detergente o agentes caotrópicos y/o lisis física (por ejemplo, ultrasonidos, agitación vigorosa), capaces de romper la membrana de los exosomas de modo que tales exosomas, en particular los exosomas de las células Th17, de modo que tales exosomas liberen su contenido al exterior y, por tanto, liberen miARN tal como miR-721.

Los exosomas son vesículas extracelulares derivadas de células con un diámetro que oscila desde 30 hasta 300 nm presentes en líquidos biológicos y medios cultivados de cultivos celulares. Contienen proteínas, metabolitos y ácidos nucleicos tales como ARNm y ARN no codificantes recubiertos con una membrana bicapa lipídica. La fracción exosómica corresponde a todos los exosomas de una muestra biológica o un medio de cultivo celular particular.

En el contexto de la presente invención, la fracción exosómica de las células Th17 puede obtenerse a partir de cualquier técnica conocida para el experto. Por ejemplo, se cultivaron suspensiones celulares de los ganglios linfáticos 6 días después de la inducción de MAE (2×10^7 células/ml) durante 48 h en medio TexMACS libre de exosomas (Miltenyl Biotech) con péptido MyHC (10 ug/ml) e IL-23 (10 ng/ml). Posteriormente, se clasifica para IL-17eGFP usando el clasificador de células Aria II FACs de BD/el clasificador de células Synergy 4L de iCyt. Las células clasificadas se

cultivaron de nuevo en medios TexMACS con péptido MyHC e IL-23 para la expansión de células IL-17+ (Th17). Se recogieron los sobrenadantes de Th17 tras la clasificación después de 48 h. En resumen, se sedimentaron el resto de las células (2000 rpm durante 10 min). Para el aislamiento de exosomas, se precipitaron los sobrenadantes de cultivo añadiendo 0,4 volúmenes de polietilenglicol 6000 al 50% (Sigma Aldrich) en NaCl 375 mM a las muestras, almacenando durante 30 minutos a 4°C y con centrifugación a 1500 g a 4°C. En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el resultado puede obtenerse por medio de:

(i) un método de obtención de perfiles génicos, tales como un microalineamiento; y/o

(ii) un método que comprende PCR, tal como PCR en tiempo real; y/o

(iii) transferencia de tipo Northern.

Preferiblemente, el resultado se obtiene por medio de PCR cuantitativa en tiempo real.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, el método se lleva a cabo *in vitro* usando una muestra del sujeto humano, y en el que en el momento de tomar la muestra del sujeto humano, el sujeto humano no está tratándose para miocardiopatía.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, la expresión de miARN se normaliza.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para clasificar un sujeto humano en uno de dos grupos, en el que el grupo 1 comprende los sujetos que pueden identificarse por medio del método según el primer aspecto de la invención, y en el que el grupo 2 representa los sujetos restantes.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico adecuado para tratar a un sujeto humano del grupo 1 que puede identificarse por medio del método de la reivindicación 11.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial de infarto agudo de miocardio frente a miocarditis aguda en un sujeto humano que se sospecha que padece cualquiera de estas patologías, en el que el método comprende usar, como indicador, los niveles de expresión obtenidos a partir de una muestra biológica aislada del sujeto humano, de miR-721, y obtener un resultado del método comparando los niveles de expresión de dicho miARN con un valor de referencia o con los niveles de expresión de un control, en el que una expresión aumentada de miR-721 es indicativa de miocarditis aguda y la ausencia de expresión es indicativo de infarto agudo de miocardio.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, los ejemplos ilustrativos no limitativos de dichas muestras incluyen diferentes tipos de muestras de tejido, así como muestras de líquidos biológicos, tales como sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y heces. Preferiblemente, dichas muestras son muestras biológicas de sangre, suero o plasma.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero o plasma y tal muestra biológica se trata con un agente de lisis tal como una composición de detergente o agentes caotrópicos y/o lisis física (por ejemplo, ultrasonidos, agitación vigorosa), capaces de romper la membrana de los exosomas de modo que tales exosomas, en particular los exosomas de las células Th17, liberen su contenido al exterior y, por tanto, liberen miARN tal como miR-721.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero o plasma y dicha muestra biológica se trata de modo que se obtenga la fracción exosómica de las células Th17 y se realiza la determinación de los niveles de expresión de miR-721 en tal fracción exosómica mediante el uso de un agente de lisis, tales como una composición de detergente o agentes caotrópicos y/o lisis física (por ejemplo, ultrasonidos, agitación vigorosa), capaces de romper la membrana de los exosomas, de modo que tales exosomas liberen su contenido al exterior y, por tanto, liberen miARN tal como miR-721.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas, el resultado puede obtenerse por medio de:

(i) un método de obtención de perfiles génicos, tales como un microalineamiento; y/o

(ii) un método que comprende PCR, tal como PCR en tiempo real; y/o

(iii) transferencia de tipo Northern.

Preferiblemente, el resultado se obtiene por medio de PCR cuantitativa en tiempo real.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención o cualquiera de sus realizaciones preferidas, la expresión de miARN se normaliza.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de un sujeto humano que se sospecha que padece infarto agudo de miocardio o miocarditis aguda, en el que dicho método comprende realizar el diagnóstico diferencial según el cuarto aspecto de la invención o según cualquiera de sus realizaciones preferidas, en el que si hay una expresión aumentada de miR-721 en la muestra biológica, el paciente se trata para miocarditis aguda y en el que si hay una ausencia de expresión de miR-721 en la muestra biológica, el paciente se trata para infarto agudo de miocardio.

En el contexto de la presente invención, los tratamientos adecuados para la miocarditis aguda son limitados, siendo principalmente el trasplante de corazón y los dispositivos de asistencia mecánica. En particular, se han considerado tres enfoques principales para el tratamiento de la miocarditis aguda:

- Inhibición de patógenos (sólo para miocarditis inducida por virus); los IFN son el agente antiviral usado más habitualmente. Sin embargo, la aplicación clínica de agentes antivirales está limitada por el direccionamiento inespecífico, los mecanismos poco claros y los efectos secundarios.
- Modulación inmunitaria; la fase aguda de la miocarditis se caracteriza por necrosis y apoptosis de miocitos y respuestas autoinmunitarias exageradas. Por tanto, la aplicación de fármacos inmunosupresores es el tratamiento de elección: se ha sometido a prueba la prednisona, fármacos antiinflamatorios no esteroideos o inmunoglobulinas intravenosas (IGIV), aunque los resultados obtenidos siguen siendo controvertidos debido a la variabilidad etiológica de la enfermedad.
- Terapia para insuficiencia cardíaca: incluyendo inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueantes de los receptores de angiotensina II, β -bloqueantes, antagonistas de aldosterona y bloqueantes de los canales de calcio. Los soportes circulatorios mecánicos para la función cardíaca también ayudan en la recuperación de la miocarditis. Aunque dichos soportes no pueden curar la miocarditis en sí misma, los dispositivos permiten evitar la muerte y aumentan la longevidad de supervivencia de los pacientes, especialmente en aquellos con choque cardiogénico.

En el contexto de la presente invención, los tratamientos adecuados para la terapia inicial del infarto agudo de miocardio deben dirigirse hacia la restauración de la perfusión lo antes posible para salvar la mayor cantidad posible de miocardio en peligro. Esto puede lograrse a través de medios médicos o mecánicos, tales como la intervención coronaria percutánea (PCI, por sus siglas en inglés) o la cirugía de revascularización coronaria (CABG, por sus siglas en inglés).

Aunque el tratamiento inicial de los diferentes tipos de síndrome coronario agudo (SCA) puede parecer similar, es muy importante distinguir si el paciente tiene un IM con elevación del segmento ST (IMCEST) o uno SEST (IMSEST), porque las terapias definitivas difieren entre estos dos tipos de IM. Las consideraciones y diferencias particulares involucran la urgencia de la terapia y el grado de evidencia con respecto a las diferentes opciones farmacológicas. La atención prehospitalaria específica incluye lo siguiente:

- Vía intravenosa, administración de oxígeno, pulsioximetría.
- Administración inmediata de aspirina en vía.
- Nitroglicerina para el dolor torácico activo, administrado por vía sublingual o mediante pulverización.
- Telemetría y electrocardiografía (ECG) prehospitalarias, si están disponibles.

El tratamiento del infarto de miocardio con elevación del segmento ST (IMCEST) se basa en dos componentes esenciales y clave: reconocimiento rápido y reperfusión oportuna. Por tanto, deben colocarse e implementarse sistemas para impedir demoras en el tratamiento de pacientes que desarrollan IMCEST. La minimización de las demoras se ha asociado con desenlaces globales mejorados, así como con una reducción de la morbilidad a largo plazo. La intervención percutánea primaria (PCI) se define como una intervención coronaria percutánea emergente en el contexto de IMCEST, sin tratamiento fibrinolítico previo. Es la estrategia de reperfusión preferida en pacientes con IMCEST. La fibrinólisis es una estrategia de reperfusión importante, particularmente en entornos en los que la PCI primaria no puede ofrecerse a pacientes con IMCEST dentro de los plazos recomendados. El beneficio de la terapia fibrinolítica en pacientes con IMCEST está bien establecido, y el mayor beneficio se observa cuando se administra de manera temprana (en el plazo de las 12 horas posteriores al inicio sintomático) y en pacientes con el mayor riesgo cardiovascular.

Los agentes anticoagulantes son una terapia complementaria importante para la terapia de reperfusión, independientemente de la estrategia elegida (es decir, ya se trate de PCI primaria o terapia de fibrinólisis). Existen diferentes agentes anticoagulantes disponibles; la utilidad de cada agente depende del contexto clínico, teniendo en cuenta el método de reperfusión.

Todos los pacientes con IMCEST deben recibir una dosis de aspirina de carga empírica (de 150,5 a 325 mg) de la manera más temprana posible y antes de la reperfusión, independientemente del método de reperfusión. Debe prescribirse una dosis de mantenimiento de por vida (de 75 a 81 mg) diariamente a todos los pacientes después de un IMCEST.

Un sexto aspecto de la invención, se refiere a un kit o dispositivo que comprende al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridarse con cualquiera de los miARN definidos en los aspectos primero o cuarto de la invención, preferiblemente para la hibridación con miR-721 y/o miR-155, más preferiblemente para la hibridación con SEQ ID NO 4, medios para detectar dicha hibridación y un agente de lisis tal como se definió anteriormente. Preferiblemente, dicho kit o dispositivo comprende adicionalmente un cebador oligonucleotídico de poliT y el/los oligonucleótido(s) se inmoviliza(n) opcionalmente en manchas en una superficie, preferiblemente en la superficie de un microalineamiento.

Tal como se usa en el presente documento, "medios para detectar dicha hibridación" se entiende como ADN complementario marcado, ARN, hebra de ácido nucleico modificado (es decir, sonda) para localizar una secuencia de miARN en muestras biológicas tales como una muestra de sangre, suero o plasma o en una porción o sección de tejido, en todo el tejido o las células.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* del kit tal como se define en el sexto aspecto de la invención o de un kit o dispositivo que comprende al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridarse con uno cualquiera de los miARN definidos en cualquiera de los aspectos primero o cuarto de la invención, para detectar o diagnosticar u obtener datos útiles para diagnosticar una miocardiopatía en un sujeto humano. Preferiblemente, dicho kit o dispositivo comprende adicionalmente un cebador oligonucleotídico de poliT y el/los oligonucleótido(s) se inmoviliza(n) opcionalmente en manchas en una superficie, preferiblemente en la superficie de un microalineamiento. Más preferiblemente, el uso de dichos kits o dispositivos es para detectar o diagnosticar u obtener datos útiles para diagnosticar una miocarditis, preferiblemente una miocarditis aguda, infarto agudo de miocardio o para diagnosticar el síndrome de Takotsubo en un sujeto humano.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO 4.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a una hebra de ADN, ARN o ácido nucleico modificado (es decir, sonda) completamente complementaria (100% complementaria) capaz de hibridarse con la secuencia de miARN SEQ ID NO 4, en particular sin apareamientos erróneos.

Una realización preferida de los aspectos octavo o noveno de la invención se refiere a un constructo genético, tal como una secuencia de ADN, capaz de transcribir la secuencia de miARN SEQ ID NO 4.

Los siguientes ejemplos ayudan a ilustrar pero no limitan la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Clonación de miARN-721 y caracterización de sus genes diana

El miARN-721 se describió por primera vez en un artículo sobre tejido cerebral de embriones de ratón, en el que se estudió la expresión del mismo durante la embriogénesis del sistema nervioso central (Wheeler *et al.*, FEBS Letters 2006). En este artículo, se identificó miARN como miR-721 y posteriormente se introdujo en miR Base como miR-721. Este miARN está ubicado en el cromosoma 5 dentro de la región no codificante del gen CUX1. miR-721 pertenece a la familia de miARN miR-130/301/721 (figura 1).

Para estudiar este microARN en profundidad y su papel en la regulación de la inflamación y, por tanto, en enfermedades cardiovasculares, se clonó el miARN en vectores de expresión para realizar ensayos de pérdida y ganancia de función, así como para la validación funcional de los posibles genes diana de este miARN. Puesto que los ensayos deben realizarse esencialmente en células primarias, se han sometido a prueba vectores de expresión retrovirales y lentivirales, porque son las herramientas más eficientes para la expresión génica en células de mamíferos dada su alta capacidad de integrarse en el genoma de la célula huésped.

1.2. Clonación de miR-721 y secuencias de esponja

Para la clonación, se diseñaron varias secuencias flanqueantes de la secuencia de miR-721 inmaduro, de alrededor de 50, 75 y 100 pares de bases (en ambos sentidos, 5' y 3'), para garantizar el procesamiento correcto de miARN inmaduro en miARN maduro, debido a que se requiere una estructura secundaria plegada debidamente para tener miARN maduro y funcional (figuras 2 y 3). Finalmente, se usa un vector lentiviral murino (vector pSIN-BX/pHRSIN) para infectar células primarias con pre-miARN-721 con un alto rendimiento (figura 5).

Además, se usa el sistema de esponja para silenciar miR-721, que consiste en la sobreexpresión de la secuencia complementaria de miARN maduro en un vector lentiviral murino (vector pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP), que actúa

como amortiguación que bloquea las moléculas funcionales del miARN de interés. Esta construcción contiene 4 secuencias complementarias separadas por espaciadores que tienen entre 4 y 5 pares de bases (figuras 4 y 5). Estas secuencias de silenciamiento, que son específicas para miARN y han permitido estudiar el efecto de la pérdida de función de miARN en ensayos *in vitro* funcionales, también serán muy útiles para estudiar la función *in vivo* de los mismos.

Las partículas lentivirales se producen mediante transfección (método de fosfato de calcio) de la línea celular HEK293 con el plásmido en el que la secuencia de interés de la presente invención se expresa junto con la polimerasa lentiviral y los plásmidos de la envuelta. Recogen los lentivirus del sobrenadante de cultivo y se concentran mediante ultracentrifugación. Se mantiene la reserva viral a -80°C hasta su uso (figura 5). Se evalúa la capacidad infecciosa de cada lote mediante infección con diferentes concentraciones de la preparación lentiviral en células Jurkat. Se determinan los niveles de infección cuantificando las células GFP+ mediante citometría de flujo.

1.3. Expresión de miR-721 en células primarias de ratón

Se llevaron a cabo estos ensayos en células primarias de ratón. Se expresa miARN-721 en linfocitos T, fundamentalmente en células Th17, y la expresión de CD69 limita los niveles de miR-721 en estas células (figura 6).

Sin embargo, puesto que las células Th17 son difíciles de obtener y mantener en cultivo, se usan células endoteliales de pulmón de ratón (MLEC) para realizar estos ensayos. Al igual que en las células CD4 indiferenciadas de los ratones CD69 WT, en estas células se encuentra que la expresión de miR-721 no se detecta en MLEC de animales CD69WT. Además, la estimulación de MLEC con PMA/iono. o $\text{TNF}\alpha$ no mitiga la expresión de miR-721 en ratones CD69WT (figura 7). Sin embargo, las MLEC aislados de ratones CD69KO expresan niveles detectables de miR-721 en la homeostasis y la expresión del mismo es inducible después de la activación con PMA/iono. (figura 7).

1.4. Validación de genes diana de miR-721

Se ha descrito un único gen diana validado como diana para miR-721, el gen Meox-2. La familia de miARN miR-130/301/721 es un regulador positivo de la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) por medio de la represión del gen Meox-2 (Pfaff *et al.*, EMBO reports 2011). El extremo de 3'UTR del gen Meox-2 tiene una secuencia complementaria con respecto a la familia miR-130/301/721, mediante lo cual estos miARN regulan la expresión de los mismos (figura 8).

Además de Meox-2, se han encontrado secuencias complementarias en el extremo de 3'UTR de los genes CD69, CUX1 y receptor de aril-hidrocarburos (AHR) (figura 9), siendo dichos genes de interés en este estudio basándose en los siguientes motivos: CD69 es la molécula inmunorreguladora estudiada en el laboratorio que desempeña un papel clave en el control de las respuestas de Th proinflamatorias que provocan miocarditis y cuya acción inhibe la expresión de miR-721; CUX-1, en cuya secuencia genómica está codificado el transcrito de miR-721, está directamente relacionado con la generación de vasos, o la angiogénesis, la capacidad de las células endoteliales, procesos esenciales en la recuperación tisular después de inflamación o isquemia; y AHR es un receptor nuclear que desempeña un papel clave en la diferenciación y función de las células Th17 y de las células T reguladoras (Treg), que son vitales para los estudios funcionales en el modelo de miocarditis.

Para validar la expresión de estos genes, se realizó qPCR en MLEC de ratones CD69WT y KO. Con esta técnica, se encontró que en presencia de miR-721 en MLEC de CD69KO, se inhibe por completo la transcripción génica de Meox-2, CUX1 y AHR y sólo se expresan después de la activación con estímulos inespecíficos fuertes (PMA/iono.) estímulos específicos de angiogénesis ($\text{TNF}\alpha$), mientras que las MLEC de CD69WT, que no expresan miR-721, expresan niveles detectables de estos 3 genes en condiciones de nivel inicial y niveles mucho mayores después de la activación con los estímulos (figura 10).

1.5. Ensayos funcionales *in vitro*

Para realizar estos ensayos, tuvieron que ajustarse con precisión las condiciones de infección de MLEC, propósito para el cual es fundamental conocer la titulación del virus e infectar con una multiplicidad de infección (MOI) que sea suficiente para infectar todas las células de la placa, pero que no ponga en peligro a su vez la viabilidad celular. Se sometieron a prueba varias concentraciones de partículas lentivirales y se demostró que una MOI = 5 (figura 11) era óptima.

Una vez que se ajustaron con precisión estas condiciones, se realizaron ensayos *in vitro* para validar los genes Meox-2, AHR y CUX1 como dianas de miR-721, tanto sobreexpresando miR-721 como silenciándolo con secuencias de esponja (figura 12).

Como miR-721 es un nuevo micro-ARN y nunca se ha definido en el genoma humano, se realizó una alineación de secuencias de múltiples especies del miR-721 murino y se definieron los sitios predictivos para secuencias de miR-721 de mono y humano (figura 13A). Además, se mostraron sitios de unión en 3'UTR para los supuestos genes diana de hsa-miR-721: CD69, AHR y Meox2 (figura 13 B)

Según estos resultados, CD69 actuará como represor de miR-721. A su vez, se expresará miR-721 tanto en Th17 como en células endoteliales y reprime la expresión de los genes Meox-2, AHR y CUX1 y, por tanto, procesos de formación de nuevos vasos (figura 14).

Ejemplo 2

2.1. Experimentos *in vivo* para validar el papel de miR-721 en la función efectora de células Th17

Puesto que el estudio de la función miR-721 en el modelo miocarditis autoinmunitaria experimental (MAE) requiere experimentos muy extensos y trabajar con tejido altamente inaccesible, el miocardio, un modelo de isquemia en ratón del músculo de la extremidad inferior del ratón que se usa ampliamente en investigación para estudiar la arteriopatía periférica (APP) se ha desarrollado en el laboratorio. Para ello, se someten los animales a una cirugía que se explica a continuación: se realiza una incisión de 5 mm en el área inguinal de la pata izquierda que permite la exposición del nervio, la vena y la arteria femorales. Se separa cuidadosamente el tejido conjuntivo, y se disecan la vena, la arteria y el nervio mediante la separación de la túnica adventicia arterial cerca del área distal a la bifurcación de la arteria femoral. Una vez que se separan los tres componentes, se liga la arteria femoral haciendo pasar cuidadosamente bajo a misma un hilo de sutura y realizando dos nudos quirúrgicos uno cerca del otro. Se corta la arteria femoral entre los dos nudos que se realizan. Se coserá la incisión que se realice después del lavado con solución salina fisiológica a una temperatura moderada de 37°C. La oclusión de la arteria femoral permitirá que la sangre fluya hacia la arteria colateral, lo que permitirá la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) con la nueva irrigación posterior de la pata. El proceso de monitorización de la reperusión del músculo aductor se lleva a cabo mediante análisis por Doppler con láser (figura 15).

La inflamación y las anomalías autoinmunitarias desempeñan un papel crucial en la progresión de la insuficiencia cardíaca y vascular. Entre otras moléculas, se han propuesto los microARN como una de las herramientas más innovadoras para el desarrollo de terapias contra enfermedades inflamatorias y cardiovasculares. Varios artículos relacionan las células T cooperadoras 17 (Th17) y las células T reguladoras (Treg) con enfermedades cardiovasculares tales como síndrome coronario agudo o la insuficiencia cardíaca congestiva. Además, los estudios realizados en ratones después de isquemia de la arteria femoral muestran que Th17 y Treg modulan la neovascularización posisquémica de manera antagónica, revelando un papel crucial de esas células en enfermedades cardiovasculares tales como arteriopatía periférica (APP). Sin embargo, el papel de los miARN derivados de estas células está completamente inexplorado en este campo, dejando una ventana abierta al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas y de diagnóstico. Este tema se aborda en el laboratorio por medio del análisis del antígeno leucocitario CD69 como regulador del equilibrio Th17/Treg porque esta molécula puede usarse como enlace de conexión entre la inflamación cardíaca mediada por las células Th17 y la insuficiencia cardíaca. Los resultados han demostrado que hay al menos 80 miARN que se expresan de manera diferencial en células Th17 deficientes en CD69 en comparación con WT. De todos estos miARN, este estudio se centra en miR-721 porque sus posibles genes diana son extremadamente relevantes tanto en la biología de las células Th17/Treg como en enfermedades cardiovasculares, incluyendo entre ellos SOCS-1, AHR, STAT-3, ROR γ t o Meox-2. Con la excepción de Meox-2, estos pares de genes miARN/diana nunca se han validado ni descrito en células Th17/Treg ni en enfermedades cardiovasculares. Además, se ha encontrado una alta expresión de estos miARN en células linfoides, células cardíacas y suero de ratones con miocarditis autoinmunitaria o después de isquemia de la arteria femoral, así como en pacientes con miocardiopatías.

Por tanto, los experimentos de isquemia femoral o APP se basan en la hipótesis de que los ratones CD69KO tendrán respuestas de Th17 exacerbadas y una alta expresión de miR-721. En este modelo, se describe que las células Th17 regulan positivamente los procesos de arteriogénesis (Hata *et al.*, Cardiovascular Research 2011), y que las células Treg lo hacen de manera negativa, es decir, inhibiendo el proceso de angiogénesis (Zouggari *et al.*, Circulation 2009).

Teniendo en cuenta lo anterior, si la hipótesis de la presente invención es cierta, el proceso de revascularización después de isquemia debería potenciarse en los animales CD69KO frente a los animales WT, porque miR-721 actuará sobre los genes Meox-2 y CUX1, inhibidores de la angiogénesis.

2.2. Estudio del papel de miR-721 y su gen diana Meox-2 en la neovascularización después de isquemia de la arteria femoral

Se realizó un estudio de la cinética de las células Th17 y Treg en sangre después de inducir isquemia de la arteria femoral. Una vez que se compara con los ratones de control, puede observarse un aumento progresivo y significativo de las células Th17 en la sangre durante los 7 días tras la cirugía. Sin embargo, a pesar de que se observa un pico en Treg después de 24 horas, los niveles de Treg disminuyen hasta niveles casi iniciales durante el día 7 del experimento (figura 16). Estos datos indican que existe una fuerte respuesta proinflamatoria de las células Th17 que se mantiene durante una semana después del proceso de isquemia.

El aumento de la respuesta de Th17 7 días después de la isquemia coincide con un aumento de hasta 40 veces de la expresión de miR-721 en el suero de estos animales (figura 17), lo que indica que aumentan tanto las respuestas de Th17 como la expresión de miARN. La detección de miR-721 en suero sugiere que podría secretarse por células Th17,

que están presentes en un alto porcentaje 7 días después de la isquemia.

2.3. La expresión del gen diana de miR-721, Meox-2, se inhibe después de inducir isquemia

En células endoteliales del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que el silenciamiento de Meox-2 estimula la angiogénesis (Wu *et al.*, Nature Medicine 2005), lo que demuestra que este gen ejerce una función inhibitoria sobre la angiogénesis en las células endoteliales. En los experimentos con Meox-2 para la presente invención, se induce en tejido del músculo aductor 7 días después de la isquemia de la arteria femoral, lo que indica que se activa este gen en este tejido después de la isquemia (figura 18).

Para verificar la inhibición de Meox-2 en el compartimento endotelial en estos animales, se realiza un análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de Meox-2 en células endoteliales CD31+ en el músculo aductor después de 7 días desde que se realiza la isquemia femoral (figura 19).

En este análisis se observa que se inhibe la expresión de Meox-2 en las células endoteliales CD31+ después de la isquemia (figura 19), lo que indica que en los procesos de angiogénesis se reprime este gen en las células endoteliales y no en las células musculares.

En un estudio preliminar, se estudió la revascularización después de la isquemia de la arteria femoral en la pata derecha de ratones CD69WT y CD69KO de la cepa BALB/c, dejando la pata izquierda como control. Se llevó a cabo monitorización de la perfusión del músculo aductor mediante Doppler con láser durante un mes después de la isquemia. Según la hipótesis inicial, en la que los ratones CD69KO son más eficientes en las respuestas de Th17, se descubrió que la cinética de recuperación (razón de perfusión) de los animales CD69KO es mucho más rápida en comparación con los animales CD69WT (figura 20).

Los ratones CD69KO se han recuperado prácticamente de la isquemia 7 días después de la cirugía, lo que coincide en estos animales con un aumento muy significativo de los ganglios linfáticos drenantes (poplíteos) de las células Th17 (figura 21). Esto confirma que un aumento de las respuestas de Th17 de los ratones CD69KO favorece el proceso de revascularización.

2.4. El miR-721 generado por las células Th17 ejerce su función efectora sobre los genes diana en las células endoteliales en procesos de revascularización después de la isquemia

Anteriormente se describió que las células endoteliales MLEC de animales CD69 WT no expresan miR-721 en condiciones de homeostasis o después de la activación con diferentes estímulos, de modo que debe estudiarse el papel de este miARN en el compartimento linfocitario del ratón. Para ello, se han formado quimeras irradiando ratones BL/6 CD69 WT reconstituidos con una mezcla de médula ósea (BM, *bone marrow*) de animales Rag2-/- γ c-/- que carecían de precursores para células T, B y NK, y de animales BL/6 CD69WT o CD69KO, en una razón de 3:1, respectivamente. En estas quimeras mixtas, todo el compartimento mieloide pertenece a los animales Rag2-/- γ c-/- y, por tanto, es WT, mientras que se genera el compartimento linfóide a partir de BM de BL/6, que es CD69KO o WT en cada caso. Además, estas quimeras no expresan miR-721 en el endotelio porque todo el tejido no linfóide de los animales reconstituidos es de fenotipo WT. Por tanto, puede esperarse que el miARN-721 detectado se producirá por las células Th17, y no por las células endoteliales. Después de inducir la isquemia, se observa que las quimeras reconstituidas con BM BL/6 CD69KO tienen un proceso de revascularización más eficiente que las quimeras BM BL/6 CD69WT (figura 22), tal como sucedió en el experimento con animales BALB/c CD69WT y KO, confirmando por tanto datos previos.

Los niveles de miR-721, así como los niveles de los genes diana Meox-2 y CUX1 también se han estudiado en estos ratones. Al igual que en los ratones BALB/c, se induce miR-721 7 días después de la isquemia en las quimeras BM BL/6 CD69KO pero no en las quimeras BM BL/6 CD69WT (figura 23).

Mientras que se inhibe por completo la expresión génica de Meox-2 y CUX1 en el tejido muscular de las quimeras BM BL/6 CD69KO, las quimeras BM BL/6 CD69WT expresan altos niveles de estos genes después de 7 días desde la isquemia. Estos datos indican que la alta expresión de miR-721 en el suero de las quimeras CD69KO está correlacionada con la inhibición completa de sus dianas génicas Meox-2 y CUX1 en el tejido muscular (figura 24). Además, la expresión de Meox y CUX1 en las quimeras CD69WT es muy alta en el músculo isquémico, mientras que prácticamente no se detecta miR-721 en el suero de estos animales (figura 23). Teniendo en cuenta que las células endoteliales de las quimeras no sintetizan miARN-721, puede esperarse que los cambios observados en los genes diana estén inducidos por la expresión de miR-721 por las células Th17.

Ejemplo 3. Estudio de la expresión de MIR721 y MIR155 en el modelo animal de miocarditis autoinmunitaria experimental

Según los resultados obtenidos, los linfocitos TH17, T reguladores y T CD4+ indiferenciados deficientes en CD69 han cambiado el patrón de expresión de diversos microARN. La molécula CD69 limita la gravedad de la disfunción cardíaca en el modelo de miocarditis autoinmunitaria experimental (MAE) por medio del control de las respuestas de Th17. Para

ello, se usa este modelo para investigar el papel de los miARN mencionados anteriormente en esta enfermedad. El modelo murino de MAE se induce por medio de inmunización con un péptido derivado de la cadena pesada de α -miosina (MyHC α) específica de tejido cardíaco emulsionado con CFA (adyuvante completo de Freund), lo que provoca la activación y diferenciación de células TH17 efectoras. 21 días después de la inmunización, los ratones se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, presentando inflamación en el miocardio y anticuerpos anti-miosina cardíaca en suero. La fase crónica aparece después de 56 días, caracterizada por fibrosis y degeneración del miocardio y, por consiguiente, el desarrollo de miocardiopatías.

Para validar el modelo de MAE con un método no invasivo, la respuesta inmunitaria generada en la fase aguda de MAE se caracterizó 21 días después de la inmunización con el péptido MyHC α . Para ello, se inyectó una sonda fluorescente intravenosa que detectaba elastasa activada y, por tanto, neutrófilos y focos de inflamación, y se examinaron los ratones mediante tomografía molecular de fluorescencia (TMF). Con esta técnica, se confirmó que los ratones CD69KO presentaban una mayor inflamación en el corazón que los ratones WT (figura 25).

3.1. Niveles de expresión de miARN en el corazón

Para investigar las expresiones de miARN durante la fase aguda del modelo de MAE, después de examinar la inflamación del miocardio por medio de tomografía molecular de fluorescencia el día 21, se sacrificaron los ratones y se extrajo el corazón (figura 26).

El análisis de los niveles de expresión de miARN presentes en el corazón de los ratones durante la fase aguda de MAE mostró un aumento significativo de la expresión de miR-721 en el corazón de los ratones WT y CD69KO enfermos con respecto a los ratones de control. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de miR-155 en los corazones de los animales (figura 27).

3.2. Niveles de expresión de miARN en suero

Con el propósito de encontrar un microARN detectable en sangre que pueda usarse como biomarcador de diagnóstico, como marcador de la gravedad de la miocarditis y/o como diana terapéutica de la enfermedad, se estudió el patrón de expresión de miARN en el suero de ratones con miocarditis autoinmunitaria experimental. Para ello, se extrajo sangre de los ratones durante la fase aguda de MAE y se analizaron los niveles de miARN presentes en el suero por medio de PCR cuantitativa. El resultado obtenido fue un aumento significativo de miR-721 y miR-155 en el suero de ratones enfermos con respecto a los animales de control. Además, se encontró que los ratones CD69KO con miocarditis mostraron una mayor expresión de miR-721 en suero que los ratones WT tratados con los animales con péptidos MyHC y mayores que los controles, lo que sugiere que este miARN podría estar relacionado con un aumento de T_H17 y, por tanto, relacionado con la gravedad de la enfermedad (figura 28).

Ejemplo 4. Análisis de linfocitos T_H17, células T reguladoras y expresión de miARN en plasma de pacientes con miocardiopatías

La miocarditis se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias en el miocardio. Después del proceso agudo, tienen lugar la pérdida de miocardiocitos y el desarrollo de fibrosis y necrosis en el miocardio, pudiendo surgir la remodelación ventricular, disfunción permanente de la pared ventricular, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca y arritmias. Con el propósito de estudiar el papel de los linfocitos T CD4⁺ en el desarrollo de la enfermedad en humanos y el potencial de los mismos como dianas terapéuticas, se analizaron estas poblaciones en la sangre de pacientes con miocarditis y miocardiopatías dilatadas en comparación con donantes sanos. Además, se midieron los niveles de expresión de microARN detectados en el modelo animal de miocarditis autoinmunitaria experimental en el plasma sanguíneo de pacientes y sujetos de control para encontrar un miARN detectable en sangre que pudiera usarse como biomarcador de diagnóstico y/o como diana terapéutica de la enfermedad.

4.1. Análisis de los total linfocitos T CD4⁺ en la sangre de pacientes

Para cuantificar el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ totales que circulan en la sangre de pacientes y controles, los se aislaron linfocitos de sangre periférica anticoagulada con EDTA por medio de un gradiente de densidad, y se analizaron sus marcadores de membrana mediante citometría de flujo. El análisis mostró un aumento estadísticamente significativo de la proporción de células T CD4⁺ totales en la sangre de pacientes con miocarditis aguda o Takotsubo con respecto a la de sujetos sanos (figura 29).

4.2. Análisis de linfocitos T_H17 en la sangre de pacientes

Para analizar los porcentajes de las células T_H17, se aislaron los linfocitos de sangre periférica por medio de un gradiente de densidad, se activaron con anti-OKT3, se volvieron a estimular con PMA, ionomicina y brefeldina y se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-IL-17. El análisis mediante citometría de flujo mostró que en células T CD4⁺ totales, los porcentajes de linfocitos T_H17 en la sangre de pacientes con miocarditis crónica o miocardiopatía de Takotsubo son similares a los de controles sanos, mientras que los pacientes con miocarditis aguda tienen una proporción de linfocitos T_H17 en sangre que es significativamente mayor que la de voluntarios sanos (figura 30), lo que

indica que las respuestas de T_H17 podrían ser específicas de la fase aguda de esta enfermedad.

4.3. Análisis de linfocitos Treg indiferenciados y de memoria en sangre

El análisis de los porcentajes de células T reguladoras presentes en la sangre de pacientes con miocarditis y miocardiopatías dilatadas comprendió el estudio de células Treg totales, células Treg indiferenciadas y células Treg de memoria. Para ello, se activaron con OKT3 los linfocitos extraídos de la sangre y se analizaron las poblaciones CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (células Treg totales), CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ (Treg indiferenciadas) y CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ (Treg de memoria). El resultado obtenido fue que los pacientes con Takotsubo no presentan diferencias estadísticamente significativas en relación con los porcentajes de células T reguladoras en sangre periférica con respecto a los voluntarios sanos. Sin embargo, los pacientes con miocarditis tanto aguda como crónica presentan porcentajes de células Treg totales que son significativamente menores que los de sujetos de control, probablemente debido a una reducción significativa de la población de células Treg de memoria en estos pacientes, porque la población de células Treg indiferenciadas no se ve afectada en estos pacientes (figura 31).

4.4. Niveles de expresión de miARN en plasma sanguíneo

Finalmente, con el propósito de validar este estudio en pacientes con cardiopatías, se analizaron los niveles de expresión de miARN detectados en el modelo murino de MAE, en el plasma sanguíneo de sujetos sanos y pacientes con miocarditis aguda, miocarditis crónica y síndrome de Takotsubo mediante la extracción de ARN total y la cuantificación de la expresión del mismo por medio de qPCR. La tendencia que se observó fue un aumento de los niveles de expresión de miR-155, y especialmente de los niveles de expresión de miR-721, en pacientes con miocardiopatías con respecto a sujetos sanos, siendo esto mayor en pacientes con miocarditis aguda que en aquellos en la fase crónica de la enfermedad, y particularmente en pacientes con Takotsubo (figura 32).

Las tablas al final de la presente memoria descriptiva ilustran las cantidades de muestra usadas en los presentes experimentos para detectar miARN en el suero de ratones con isquemia, miocarditis o en pacientes con miocarditis, y la comparación de la inducción en veces entre estas muestras.

Ejemplo 5. Diagnóstico diferencial entre pacientes con IAM y miocarditis

5.1. Expresión de miARN en ratones después de miocarditis e IAM inducido por ligadura de la arteria coronaria descendente (LAD).

Según los resultados previos de los inventores en el modelo de MAE y una pequeña cohorte de 14 pacientes con diferentes miocardiopatías (miocarditis aguda y crónica y Takotsubo) y sujetos sanos, se encontró que están presentes microARN miR-721 y miR-155 derivados de células Th17 y células Treg respectivamente, en el desarrollo de la miocarditis. Se ha identificado y clonado el miR-721 humano que se detectó con la sonda murina para miR-721, además se han identificado células Th17 como principales productores de miR-721 en ratones. Como Th17 y Treg son fundamentales en el desarrollo de la miocarditis, se encontraron altos niveles de estos miARN, cuando los síntomas aparecen en pacientes con miocarditis en comparación con voluntarios sanos (figura 33A).

Se han analizado las células Th17 en ratones después de la ligadura de la arteria coronaria descendente o LAD que simula un infarto agudo de miocardio. Se ha encontrado que las células Th17 aparecen en la sangre de los ratones después de dos semanas desde el evento isquémico (cuando aparecen los síntomas) y esto concuerda con los niveles elevados de miR-721 15 días después del infarto (figura 33B). Sin embargo, la manifestación de los síntomas (en las primeras horas después de LAD) y la expresión de miR-721 se producen en diferentes puntos de tiempo (figura 33B).

Todos estos datos sugieren que los ratones con miocarditis podrían diagnosticarse mediante la presencia de miR-721 en plasma o suero, mientras que los ratones con IAM no.

Algunas miocarditis agudas pueden imitar los síntomas de IAM en las primeras horas y, por tanto, se propuso la detección de miR-721 en sangre como herramienta de diagnóstico genuina para los pacientes con miocarditis.

5.2. Obtención de perfiles de miARN en la fracción exosómica de las células Th17.

Debido al hecho de que miR-721 se encuentra en el suero de ratones y pacientes con miocarditis, se estimó que podría recubrirse en exosomas.

Hasta ahora, se analizó el contenido de miARN seleccionados mediante qPCR en exosomas aislados del plasma después de la precipitación con PEG (polietilenglicol). En primer lugar, se analizó el contenido de miR-721 dentro de los exosomas secretados por las células de los ganglios linfáticos con MAE en ratones con miocarditis moderada (WT) y miocarditis grave (CD69^{-/-}) tal como se describe en Cruz-Adalia *et al*, Circulation 2010. En primer lugar, se recogieron dLN de ratones de tipo natural y CD69^{-/-} 6 días después de la inducción de MAE y se cultivaron durante 48 h en un medio libre de exosomas (figura 34A).

En este contexto, se demostró que se expresa miR-721 en la fracción exosómica de los ganglios linfáticos drenantes con MAE (figura 34A). Puesto que está regulado por incremento en suero y dLN de ratones que presentan una respuesta de Th17 aumentada (ratones CD69-/-), se planteó la hipótesis de que las células Th17 podrían secretar miR-721 en los exosomas. Los dLN con inducción de MAE se clasificaron para obtener un cultivo > 90% puro *in vivo* de células Th17 y Treg diferenciadas. Después de la recogida de exosomas de cultivos de 48 h, el análisis de miR-721 aboga por una regulación por incremento en los exosomas derivados de Th17 en comparación con los exosomas derivados de Treg. Se expresa miR-721 en la fracción exosómica de las células Th17 en ratones con miocarditis moderada (WT) y miocarditis grave (CD69-/-) (figura 34B).

5.3. Criterios de selección de pacientes para el estudio.

Se han reclutado pacientes con edades comprendidas entre 20 y 80 años.

Pacientes con miocarditis: se reclutarán pacientes con miocarditis aguda con al menos uno de los siguientes parámetros: dolor torácico, elevación del segmento ST, troponina T o I elevada, baja fracción de eyección. Aunque también se han incluido en la miocardiopatía viral, el estudio de Chagas y Takotsubo y enfermedades cardíacas dilatadas (miocarditis crónica).

Pacientes con IAM: Los pacientes se dividirán en tres grupos: 1) grupo sin síndrome coronario agudo sin elevación de ST (SCASEST), confirmado por la falta de elevación del segmento ST y un aumento significativo de los niveles de creatina cinasa MB y troponina I, angina inestable confirmada por dolor torácico en reposo con prueba isquémica definitiva que incluye cambios en el segmento ST y/o inversión de la onda T, y evidencia angiográfica de estenosis de la arteria coronaria (> 70%), 2) grupo de angina crónica estable (ACE); criterios de inclusión, angina de esfuerzo (sin antecedentes de angina inestable o infarto de miocardio) y evidencia angiográfica de estenosis de la arteria coronaria (> 70%), y 3) grupo de síndrome de dolor torácico (SDT), criterio de inclusión, dolor torácico sin cambios electrocardiográficos acompañantes, estenosis de la arteria coronaria o espasmo coronario. Ninguno de los pacientes se tratará actualmente con fármacos antiinflamatorios tales como antiinflamatorios no esteroideos, esteroideos, etc.

5. 4. Base de datos de parámetros clínicos de los pacientes.

Las muestras anónimas recibidas de los diferentes hospitales se enumeraron en una base de datos, se especificaron los datos clínicos (función cardíaca: ECG y ecocardiografía, daño cardíaco: TPI, CK-MB..., obtención de imágenes de resonancia magnética con realce de gadolinio, dislipidemia y otros) de pacientes. Un ejemplo de los parámetros clínicos y un resumen de los datos se representa en la figura 35.

5.5. Se analizaron los siguientes parámetros de muestras de sangre:

- Análisis de Th17 y Treg en pacientes.

Se realizó el análisis a partir de al menos 2 ml de sangre. 1 ml para análisis de plasma y 1 ml para análisis de leucocitos de sangre periférica (PBL) después del tratamiento con Ficoll.

Se recogieron los PBL de donantes sanos o pacientes con miocarditis o IAM y se analizaron mediante citometría de flujo para analizar las proporciones en las células Treg y Th17, Th1 y Th22 circulantes. Se compararon las células Treg indiferenciadas (nTreg, *naïve* Treg) CD4+CD25+FOXP3+CD45RO-CD45RA+ y las células Treg de memoria (mTreg) CD4+CD25+FOXP3+CD45RO+CD45RA- de sangre periférica en pacientes con ECV con voluntarios sanos.

La respuesta del sistema inmunitario innato parece funcionar de la misma manera en ambas miocardiopatías. Los pacientes con miocarditis e IAM tienen menores niveles de monocitos y mayores niveles de granulocitos en comparación con los voluntarios sanos (figura 36A). Los datos más interesantes que diferencian a los pacientes con miocarditis frente a los pacientes con IAM y los voluntarios sanos es que tanto las células Treg como Th17 de memoria e indiferenciadas estaban reguladas por incremento significativamente en la sangre de los pacientes con miocarditis en comparación con los pacientes con IAM, mientras que las proporciones de células T CD4 totales no cambian en la sangre de pacientes con miocarditis en comparación con IAM o voluntarios sanos. Todos estos datos sugieren que los cambios en las células Treg y Th17 son distintivos de los pacientes con miocarditis (figura 36B). Aunque existe una tendencia de más Th1 en los pacientes con miocarditis, los datos no son estadísticamente significativos frente a los de pacientes con IAM.

- Obtención de perfiles de miARN en muestras de plasma de pacientes.

Se analizaron los niveles de expresión de miARN en plasma de pacientes mediante qPCR con sondas Exiqon para los miARN indicados. Se evaluó el contenido de microARN mediante PCR cuantitativa en tiempo real. En primer lugar, se normalizaron los datos frente a un microARN artificial (UniSp5, Ambion) añadido equitativamente a cada muestra antes del aislamiento de ARN para minimizar el efecto de las diferencias en el rendimiento de purificación de ARN entre muestras, siguiendo el método convencional de $2^{-\Delta Ct}$. Se propuso Hsa-miR-423-3p como el miARN más estable

entre las presentes muestras mediante dos softwares en línea de libre acceso: NormFinder y GeNorm. Las muestras normalizadas con UniSp5 se normalizaron entonces frente a hsa-miR-423-3p. Tomando a los voluntarios sanos como el grupo de control, se calculó el aumento en veces en los niveles normalizados de miARN en los pacientes con IAM y miocarditis para evaluar las diferencias entre los grupos (figura 37).

Las muestras de plasma de pacientes con miocarditis tienen niveles significativamente aumentados de miR-721 en comparación con los voluntarios sanos, mientras que las muestras de plasma de pacientes con IAM no, lo que indica que miR-721 es un buen biomarcador para los pacientes con miocarditis (figura 37A). También se analizaron los niveles de otros microARN que se han descrito previamente como abundantes en IAM, tales como miR-21 (Zhang Y. Eur Rev Pharmacol Sci. 2016), o microARN involucrados en la diferenciación de Th17 dependiente de aril-hidrocarburos como miR-132/212 (Nakahama T. PNAS 2013) (figura 37A). Sorprendentemente, ninguno de estos microARN se expresó de manera diferencial en ninguno de los tres grupos de muestras, lo que refuerza la hipótesis de que se expresa miR-721 exclusivamente en el plasma de pacientes con miocarditis.-

- Obtención de perfiles de miARN en la fracción exosómica de muestras de plasma de pacientes.

Se analizó la expresión de miR-721 en exosomas de muestras de plasma de voluntarios sanos y pacientes con IAM y miocarditis. Con el número de muestras analizadas hasta hoy, los presentes datos sugieren que hay una expresión aumentada de miR-721 en la fracción exosómica de pacientes con miocarditis en comparación con los otros grupos (figura 37B). Además, se analizaron los niveles del miARN que se expresa en IAM, miR-21, y los miARN relacionados con Th17 miR212/132 en la fracción exosómica de las muestras. Sin embargo, ninguna de las diferencias en la expresión de miARN fue estadísticamente significativa entre los grupos (figura 37B).

5.6. Enfoque diagnóstico para la primera biopsia líquida cardiovascular para detectar miocarditis.

Con los datos obtenidos a partir de ratones y pacientes con IAM y miocarditis, se propuso miR-721 como biomarcador genuino para el diagnóstico de miocarditis exclusivo de otras miocardiopatías isquémicas como infarto agudo de miocardio. A lo largo de la progresión de la miocarditis, el daño miocárdico liberó antígenos cardíacos y surgen células T reguladoras y Th17 de memoria específicas en el plazo de las primeras semanas de la progresión de la enfermedad. En el momento de los síntomas agudos de la miocarditis, ha tenido lugar la respuesta de Th17 y los niveles de esta población están potenciados en la sangre. Por el contrario, los síntomas agudos de los pacientes con IAM tienen lugar en las primeras horas después de la isquemia de la arteria coronaria, en ese momento no se desarrollan Th17 contra los antígenos cardíacos. La naturaleza diferente de estas dos miocardiopatías nos permitirá diagnosticarlas de manera diferencial analizando los niveles de miR-721 en las muestras de plasma. Se ha identificado miR-721 como expresado exclusivamente en células Th17 que se liberan al plasma en exosomas de pacientes con miocarditis, en comparación con pacientes con IAM y voluntarios sanos. El enfoque diagnóstico se describe en la figura 38.

Ejemplo 6

6.1. Materiales y métodos

Animales y líneas celulares

Se usaron ratones doble indicador WT y CD69-/- (FoxP3-RFP, IL-17-eGFP) en el contexto C57BL/6 para ensayos de polarización *ex vivo* y análisis de progresión de Th17/Treg/Th22 durante MAE. Se usaron ratones BALB/c como contexto para las quimeras mixtas de médula ósea. Todos los animales se mantuvieron en las instalaciones de animales de CNIC. Todos los procedimientos con animales se aprobaron por el comité de ética de la Comunidad Autónoma de Madrid y se realizaron según directrices institucionales que cumplen con la Guía de los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Inducción de MAE

Se inmunizaron los ratones por vía subcutánea en los días 0 y 7 con 100 µg/0,2 ml de péptido MyHC-α (MyHC-α614-629) Ac-RSLKLMATLFSTYASADR-OH emulsionado 1:1 en adyuvante completo de Freund (1 mg/ml; H37Ra; Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Se sacrificaron los animales el día 6 para extraer nódulos linfáticos drenantes para el cultivo *ex vivo* o en los días 0 bien 20-21 o bien 50-52 para analizar la fase aguda y crónica de la enfermedad, respectivamente.

Tinción intracelular y análisis mediante FACS

Se preparó una suspensión de células individuales a partir de ganglios linfáticos axilares e inguinales de ratón en tampón para FACS (PBS, BSA al 0,5%, EDTA 1 µM, NaN₃ al 0,1%). Se aislaron células multinucleares de sangre periférica de muestras de sangre humana o de ratón usando centrifugación en gradiente Ficoll-Isopaque (densidad = 1,121 g/ml). Se tiñeron las suspensiones celulares con anticuerpos específicos o bien humanos o bien de ratón conjugados con fluorocromo contra CD4, CD3, CD25, CD45RO, CD45RA, IL-17a, IL-22, IFNγ y FoxP3 obtenidos de eBiosciences. Para la tinción intracelular, se estimularon las células con 50 ng/ml de acetato-miristato de forbol (PMA)

y 750 ng/ml de ionomicina (P+I) más brefeldina A (1 µg/ml) en medio de cultivo completo durante 3 horas. Se analizaron las células mediante los citómetros de flujo de BD FACSCanto/FACSFortessa. Cultivo *ex vivo* y aislamiento de células Treg/Th17. Se cultivaron suspensiones celulares de ganglios linfáticos (2×10^7 células/ml) durante 48 h en medio TexMACS libre de exosomas (Miltenyl Biotech) con péptido MyHC (10 µg/ml) e IL-23 (10 ng/ml). Después de eso, se clasificaron para FoxP3RFP e IL-17eGFP usando el clasificador de células Aria II FACs de BD/clasificador de células Synergy 4L de iCyt. Las células clasificadas se cultivaron de nuevo en medios TexMACS durante 48 h con péptido MyHC y, o bien IL-2 para células Foxp3+(Treg), o bien IL-23 para células IL-17+ (Th17).

Extracción de microARN y PCR cuantitativa en tiempo real

Se extrajeron miARN usando el minikit miRNeasy (Qiagen) y se examinó su pureza y concentración en un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). Se realizó el análisis de miARN-721, sno-135, sno-202, let-7a, let-7b y let-7d usando el kit de transcripción inversa de microARN TaqMan y sondas de microARN TaqMan individuales para la retrotranscripción. Se usó TaqMan Universal PCR Master Mix para PCR cuantitativa en tiempo real (Applied Biosystem). Se realizó el análisis de la expresión de miARN usando el software SDS (Applied Biosystems) y se verificó la expresión relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se usaron sno-135 y sno-202 como control endógeno para muestras de suero, células y tejidos; y let-7a, let-7b y let-7d para fracciones exosómicas aisladas. Se realizó reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) en ABI Prism 7900HT 384 (Applied Biosystems).

Purificación de exosomas

Se recogieron después de 48 h los sobrenadantes de las células de ganglios linfáticos antes de la clasificación o Tregs/Th17 después de la clasificación. En resumen, se sedimentaron el resto de las células (2000 rpm durante 10 min). Para el aislamiento de miARN, se precipitaron los exosomas añadiendo 0,4 volúmenes de polietilenglicol 6000 al 50% (Sigma Aldrich) en NaCl 375 mM a las muestras, almacenando durante 30 minutos a 4°C y con centrifugación a 1500 g a 4°C.

Ecocardiografía y obtención de imágenes mediante resonancia magnética

Se anestesiaron los ratones mediante inhalación de isoflurano/oxígeno (1,25%/98,75%). Para la ecocardiografía, se examinaron los ratones con una sonda de ecocardiografía transtorácica de 30 MHz y se obtuvieron imágenes con Vevo 770 (VisualSonics, Toronto, Canadá) antes de la inducción de MAE y durante las fases aguda y crónica. A partir de estas imágenes, se estimó la función del ventrículo izquierdo (VI) mediante la fracción de eyección obtenida a partir del modo M. Para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética con mapeo de T1 y T2, se usó el realce tardío de gadolinio mediante inyección intravenosa. Se tomaron imágenes de hasta 13 cortes de cada corazón y se evaluó el contenido de agua del miocardio promediando 3-5 valores de ROI (brillo) a lo largo de cada corte del miocardio y normalizándolos con el brillo del gadolinio en la luz de ambos ventrículos izquierdo y derecho.

Histología

Se fijaron los corazones en formalina tamponada con fosfato al 10% y se incrustaron en parafina. Se cortaron las secciones y se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el nivel de inflamación y con la tinción tricrómica de Masson para detectar la deposición de colágeno. Se realizó el análisis histológico en un microscopio Nikon Eclipse 90i. Se puntuaron las secciones teñidas con H&E para la inflamación de la siguiente manera: 0, sin infiltrados inflamatorios; 1, pequeños focos de células inflamatorias; 2, focos más grandes de > 100 células inflamatorias; 3, el 10-30% de la sección transversal ocupada por células inflamatorias; 4, > el 30% de la sección transversal ocupada (Cruz-Adalia *et al*, 2010).

Análisis estadístico

Todas las variables se expresan como la media $\pm$ desviación estándar de la media (E.E.M.). Se realizó el análisis estadístico evaluando en primer lugar la normalidad de las distribuciones usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Si es normal, la prueba t de Student de datos independientes para dos grupos y análisis ANOVA de un factor para comparaciones múltiples. Si no son distribuciones normales, la prueba de U-Mann-Whitney para el análisis de dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples. Todos los análisis se realizaron con el software GraphPad Prism 6.0.

Tabla 2

RATÓN			Inducción en veces	
Sueros con isquemia				
	50 ul de suero	ng/reacción	WT (3)	KO (3)
Antes de la isquemia	450 ng	30	niveles iniciales	niveles iniciales
DÍA 1	225 ng	30	niveles iniciales	niveles iniciales

RATÓN			Inducción en veces				
Sueros con isquemia							
DÍA 3	225 ng	30	niveles iniciales	3,4			
	100 ul de suero						
DIA 7	1500 ng	30	niveles iniciales	10			
MLEC			Inducción en veces				
	0,5e6 células	WT (7)	KO (7)				
Control	1500 ng	no detectado	niveles iniciales				
TNFalfa	1500 ng	no detectado	1,2				
PMA/IO	1500 ng	no detectado	1,5				
RATÓN							
Sueros de miocarditis		MAE	Inducción en veces				
	100 ul de suero	ng/reacción	WT (11)	KO (12)			
Control	1000 ng	40	niveles iniciales	0,7			
Miocarditis	1000 ng	40	8,7	20			
HUMANO							
Sueros de pacientes con miocarditis			Inducción en veces				
	200 ul de suero	ng/reacción	Control (9)	M. aguda	M. crónica	Chagas	Takotsubo
Control	350 ng	25	0,27				
Miocarditis	350 ng	25	37	3,7	44	17	

5 Lista de secuencias

<110> CNIC

<120> Método para diagnosticar miocardiopatías

<130> 901 911

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de miR-721 murino

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(21)

<400> 1

cagugcaauu aaaaggggga a

21

<210> 2

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> miR-155 murino

<220>

	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(23)	
	<400> 2	
5	uuaaugcuaa uugugauagg ggu	23
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> miR-155 humano	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(23)	
20	<400> 3	
	uuaaugcuaa ucgugauagg ggu	23
	<210> 4	
	<211> 21	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Hsa-miR-721	
	<400> 4	
	ucuugcaauu aaaaggggga a	21

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar miocarditis aguda en un sujeto humano, en el que el método comprende usar, como indicador, los niveles de expresión obtenidos a partir de una muestra biológica aislada del sujeto humano seleccionada de la lista que consiste en sangre, suero o plasma, de al menos miR-721, y obtener un resultado del método comparando los niveles de expresión de al menos dicho miARN con un valor de referencia o con los niveles de expresión de un control, en el que una expresión aumentada de miR-721 es indicativa de miocarditis aguda.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se trata con un agente de lisis capaz de romper la membrana de los exosomas antes de determinar el nivel de expresión de miR-721.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se trata de modo que se obtiene la fracción exosómica de las células Th17 y la determinación de los niveles de expresión de miR-721 se realiza en dicha fracción exosómica, en el que dicha fracción exosómica se trata con un agente de lisis capaz de romper la membrana de los exosomas antes de determinar el nivel de expresión de miR-721.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que miR-721 consiste en SEQ ID NO 4.
5. Método para el diagnóstico diferencial de infarto agudo de miocardio frente a miocarditis aguda en un sujeto humano que se sospecha que padece alguna de estas patologías, en el que el método comprende usar, como indicador, los niveles de expresión obtenidos a partir de una muestra biológica aislada del sujeto humano seleccionada de la lista que consiste en sangre, suero o plasma, de miR-721, y obtener un resultado del método comparando los niveles de expresión de dicho miARN con un valor de referencia o con los niveles de expresión de un control, en el que una expresión aumentada de miR-721 es indicativa de miocarditis aguda y la ausencia de expresión es indicativa de infarto agudo de miocardio.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra biológica se trata con un agente de lisis capaz de romper la membrana de los exosomas antes de determinar el nivel de expresión de miR-721.
7. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra biológica se trata de modo que se obtiene la fracción exosómica de las células Th17 y la determinación de los niveles de expresión de miR-721 se realiza en tal fracción exosómica, en el que dicha fracción exosómica se trata con un agente de lisis capaz de romper la membrana de los exosomas, antes de determinar el nivel de expresión de miR-721.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que miR-721 consiste en SEQ ID NO 4.
9. Kit o dispositivo que comprende al menos uno o más oligonucleótidos capaces de hibridarse con SEQ ID NO 4, medios para detectar dicha hibridación y un agente de lisis capaz de romper la membrana de los exosomas.
10. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 9, para diagnosticar una miocarditis aguda en un sujeto humano usando una muestra de plasma, suero o sangre obtenida a partir de dicho sujeto.
11. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 9, para el diagnóstico diferencial de infarto agudo de miocardio frente a miocarditis aguda en un sujeto humano que se sospecha que padece alguna de estas patologías usando una muestra de plasma, suero o sangre obtenida a partir de dicho sujeto.
12. Secuencia de nucleótidos que consiste en SEQ ID NO 4.
13. Hebra de ADN, ARN o ácido nucleico modificado (es decir, sonda) completamente complementaria (100% complementaria) capaz de hibridarse con la secuencia de miARN SEQ ID NO 4 sin apareamientos erróneos.
14. Constructo genético, tal como una secuencia de ADN, capaz de transcribir la secuencia de miARN SEQ ID NO 4.

Familia de miARN 130, 301 y 721

mmu130b	GGCUUGUUGGACACUCUUUCCCUUGUUGCACUACUGUGGGCCUCUGGGGAAGCAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAUCUGUCGGGCC
mmu301b	UUUCCUUGCUGGCGGUGCUCUGACUAGGUUGCACUACUGUGCUGAGAGAGCAGUGCAAUGGUUUUGUCAAAAGCAUCUGGGACC AGCCUCGAAG
mmu721	GGAAGACAGUGCAAUUUAAAAGGGGAAAAAGUACCGGAUGUUCUGAGAAUUUCAUUUUUCUUGUUUUGCCACUCCUGCUUGGAA

Cromosoma 5: 136,373,716-136,377,803



Fig. 1

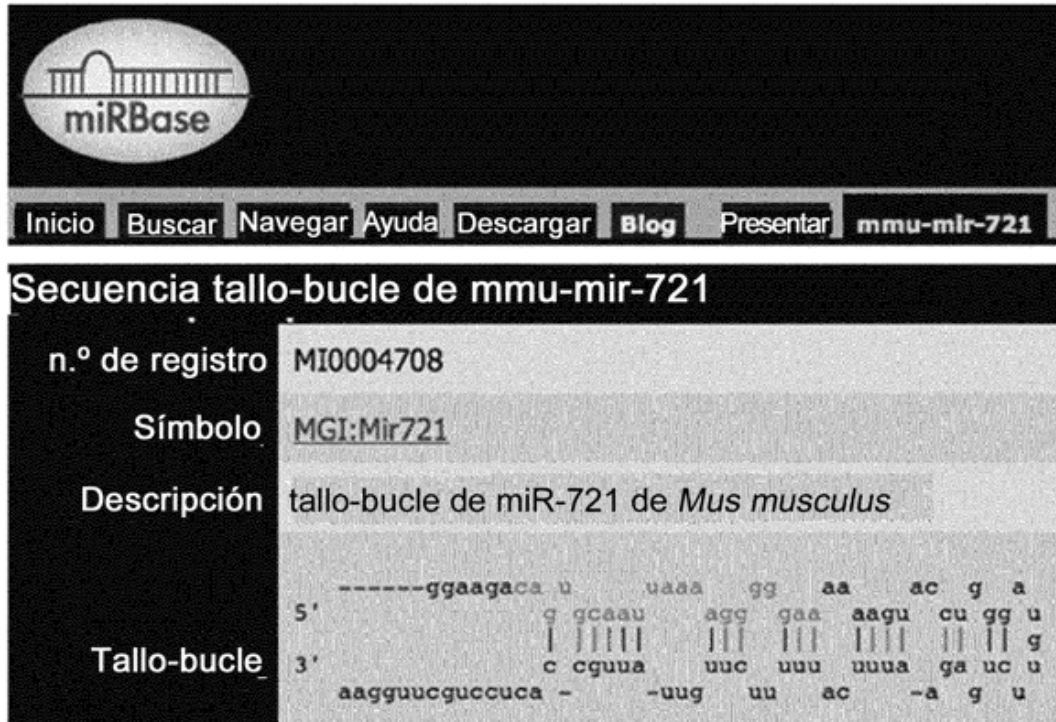


Fig. 2

inserto de 100 pb

clon 100 de Mir 721

```

GCAGCTCCTAGACTGTTCTGCGAGCATAGCTCCTTCTCCTCCTTATCCCTGA
CCTGGATCAAGCTCAGATTGTCCTTCTGTATAAAGGATGTTGTGGGCATAGT
GCTCATTCTCTCAATCCACTAGCCTGAAGACATGGAGGGCAGAGAGAGATT
CAGGTTTCCTGGGAAGACAGTGCAATTAAGGGGGGAAAAAGTACCTGGGA
TGTTCGAGAATTTTCTTTTCTTGTATTGCGCACTCCTGCTTGGAAGAACT
ATGTTCCCAAATAGCTCTAGCAATCTAGCATAACATAAATATTTTAATGCT
GATTAAAATAATAATGAAAAGTCATGAATGAGAAAAGGACTGTGTATAGAGG
CCGCATAAGTGCCACCAAGCCTGAGAGTCACATGATGGACAGTGTTGGTGT
TAAGC
  
```

XhoI
 Mi721 dir. 5' ATAT-CTCGAG-ATTGTCCTTCTGTATA
 3' TM:36+30=66

EcoRI
 Mi721 inv. 3' ATAT-CTTAAG-TTTCTCATTGACT
 5' TM:28+38=66

secuencia inmadura de miR-721
 miR-721 de 100 pb arriba y abajo

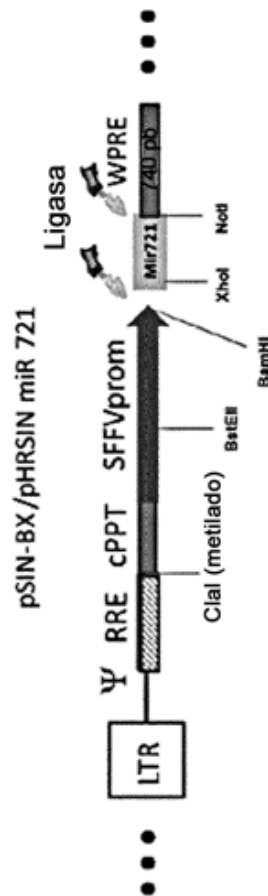
Fig. 3

CLONACIÓN EN VECTORES LENTIVIRALES

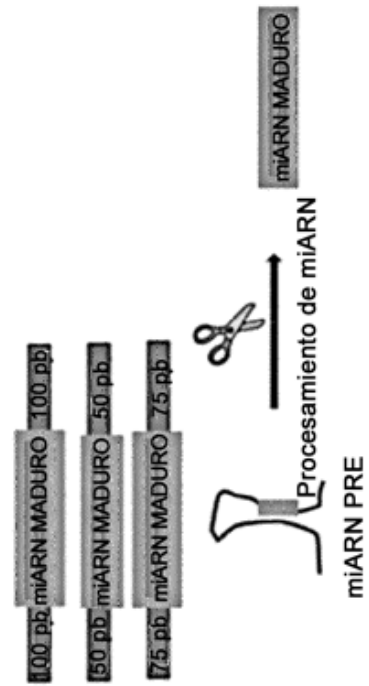
CLONACIÓN DE miR-721 EN

pSIN-BX/pHRSIN

(enzimas de restricción XhoI - NotI)



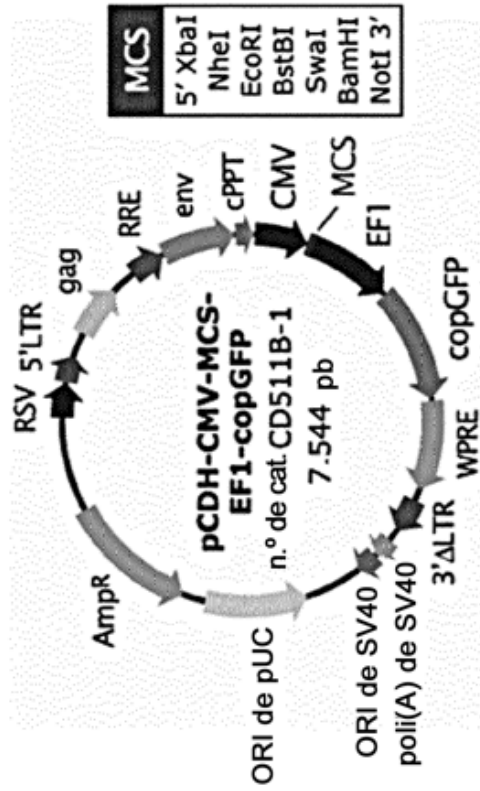
Construto de miR-721



CLONACIÓN DE ESPONJA EN

pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP

(enzimas de restricción NotI - XhoI)



Construto de esponja

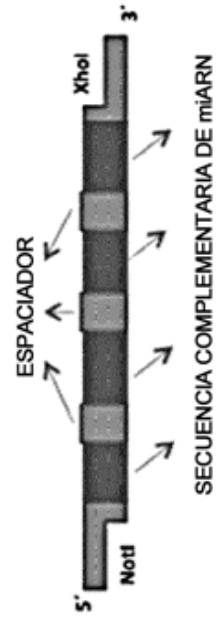


Fig. 5

PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS

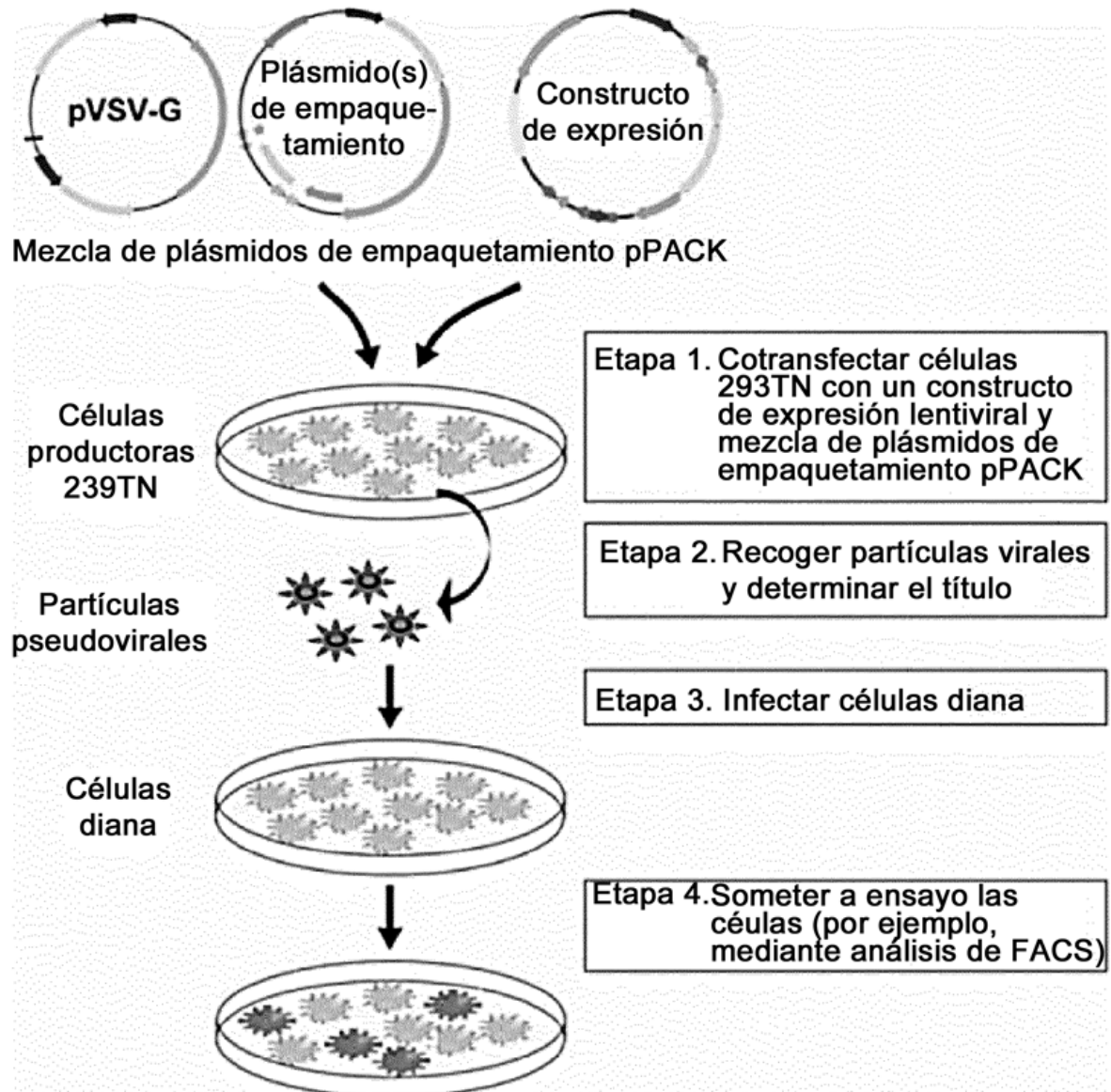


Fig. 5 (cont.)

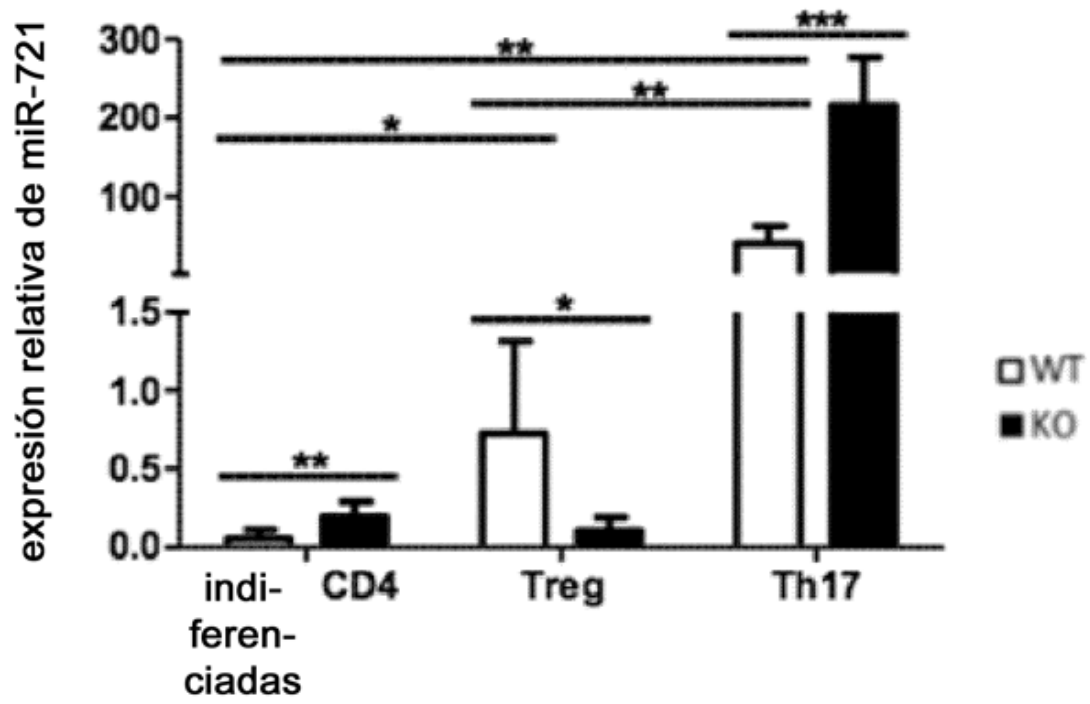


Fig. 6

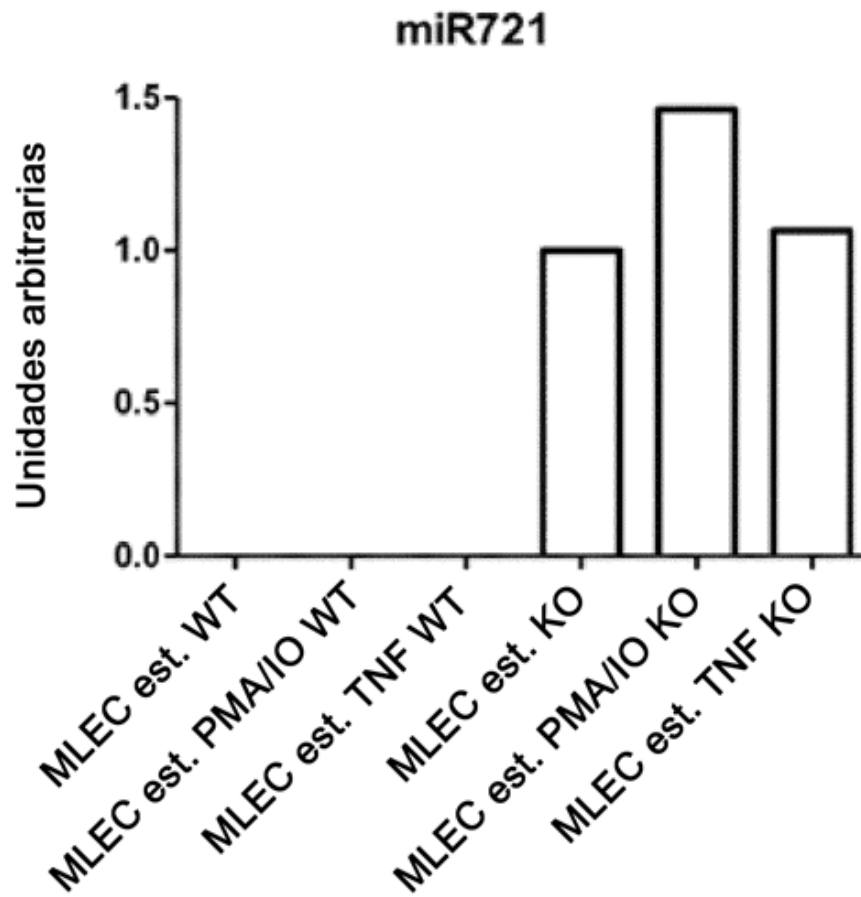


Fig. 7

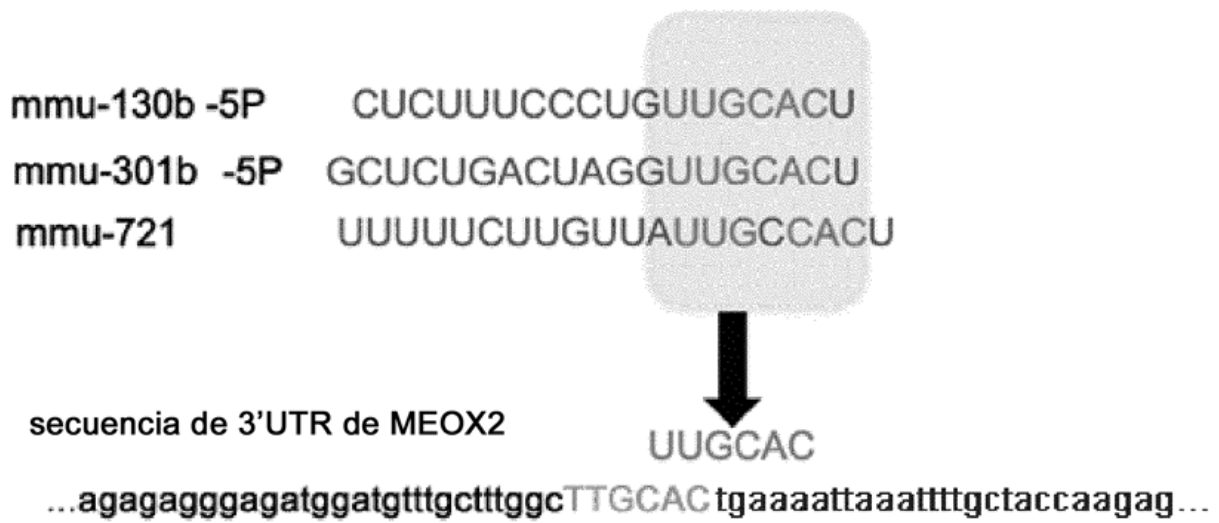


Fig. 8

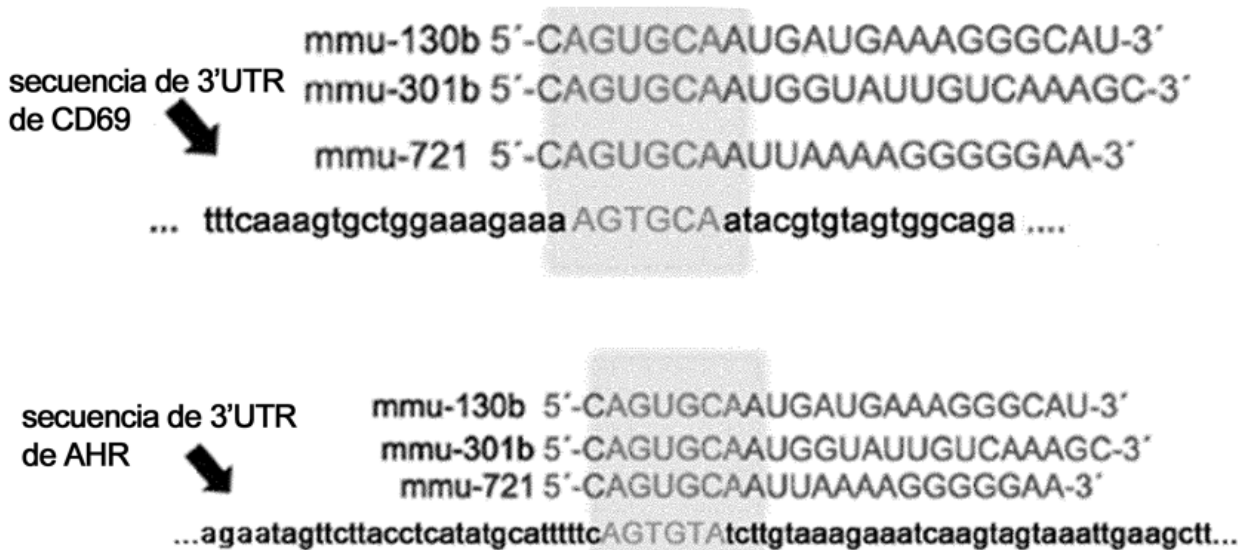


Fig. 9

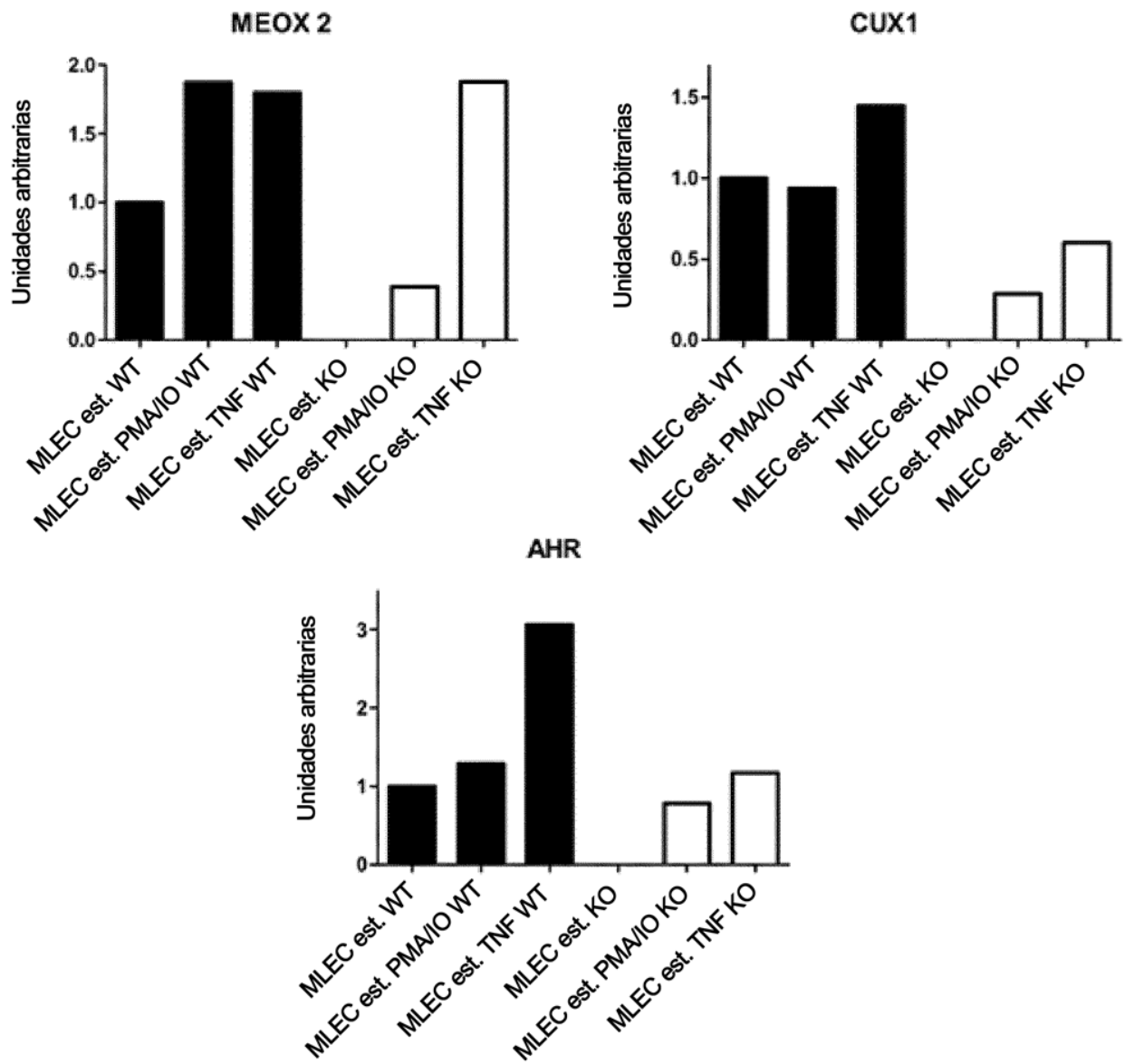
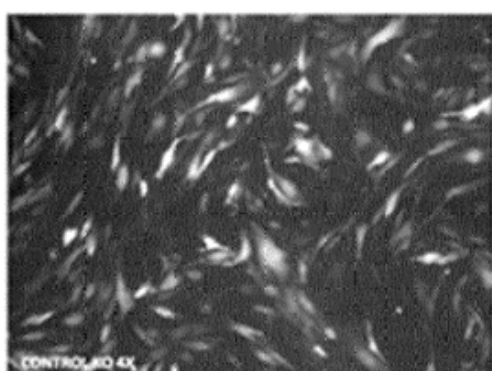
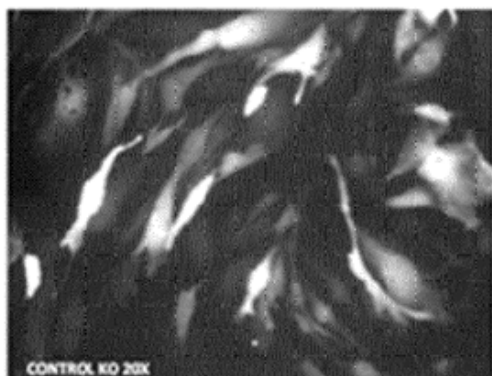
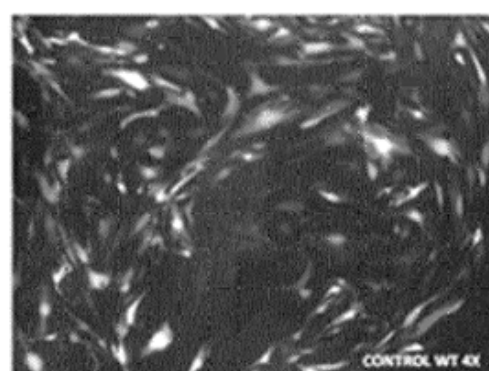
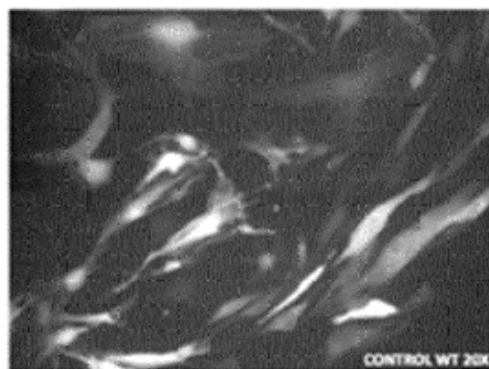


Fig. 10

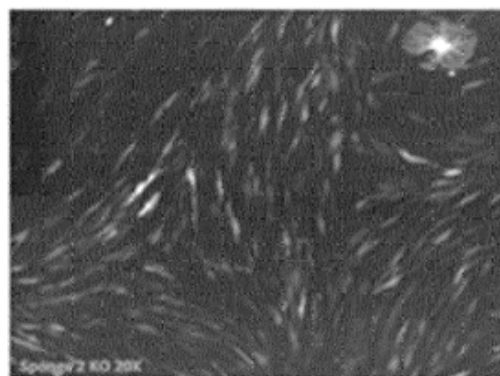
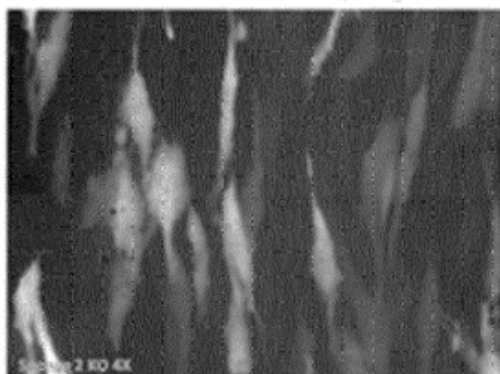
MLEC est. COP-GFP de control KO



MLEC est. COP-GFP de control WT



MLEC est. COP-GFP KO, esponja 2



MLEC est. COP-GFP WT, esponja 2

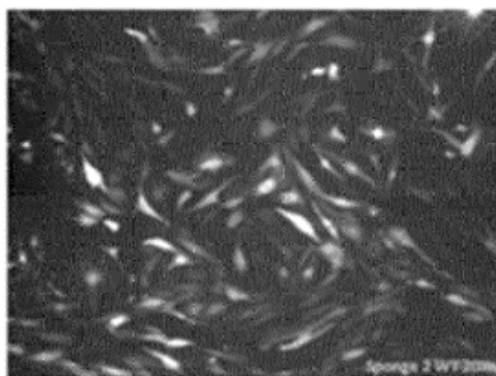
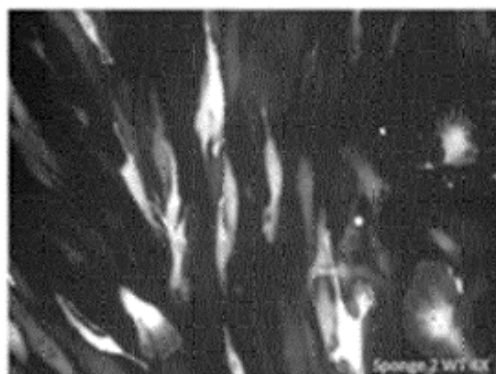


Fig. 11 A

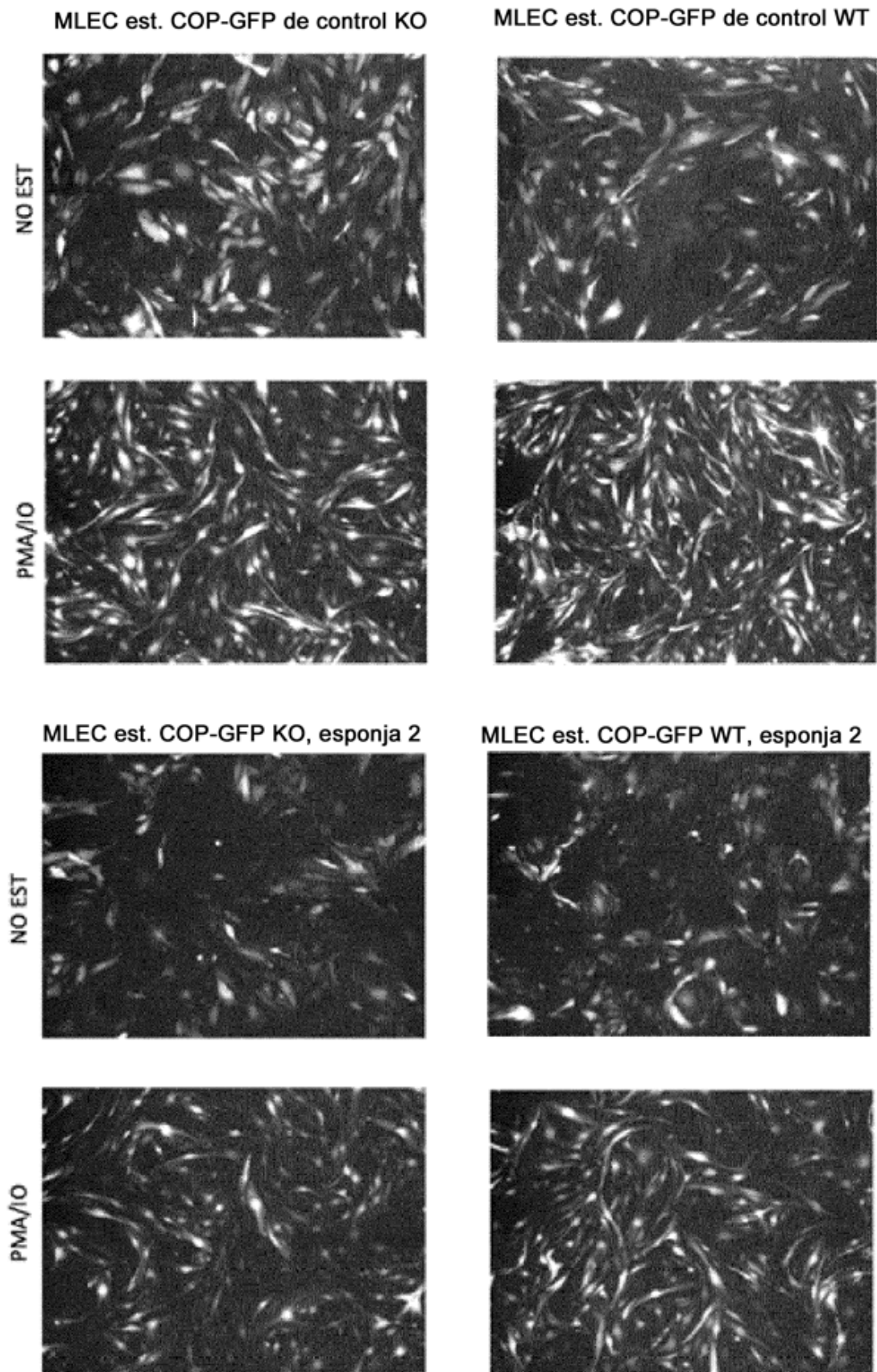


Fig. 11 B

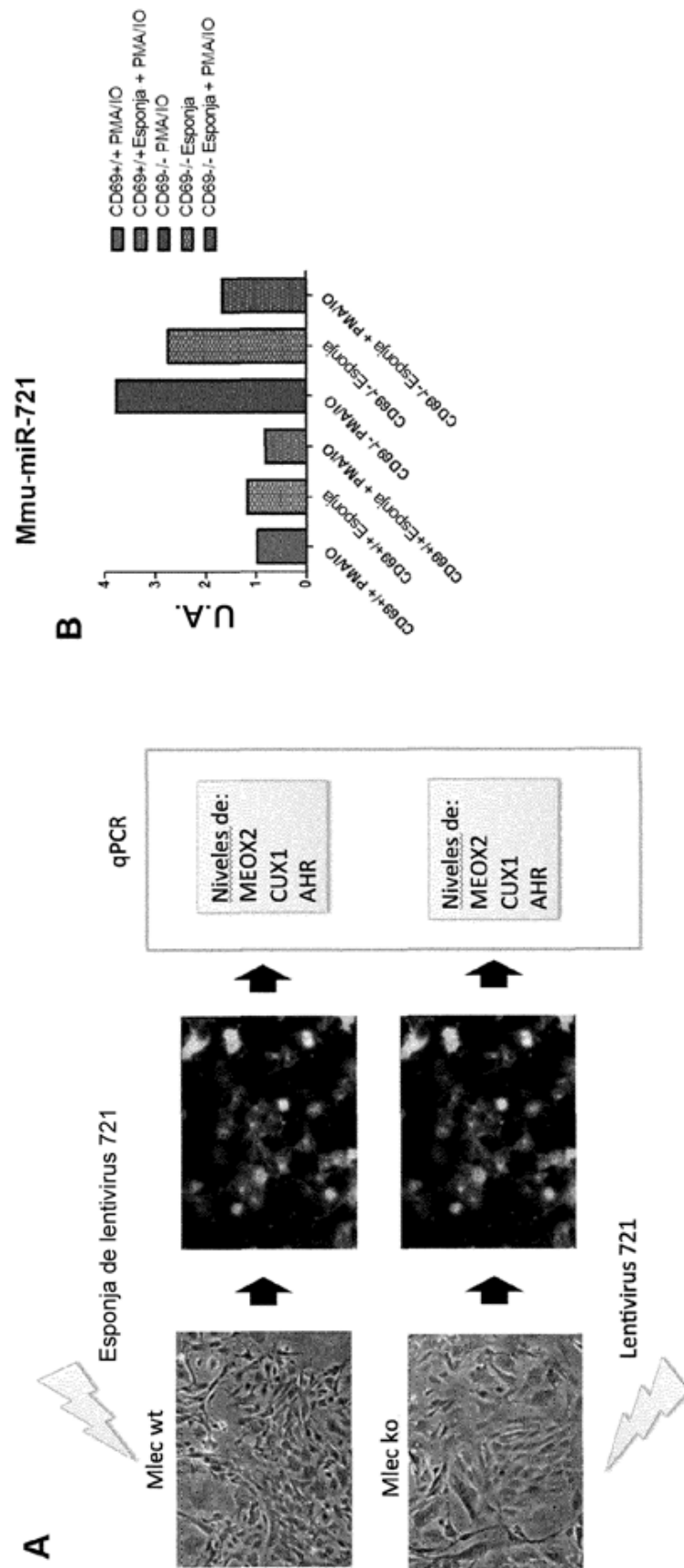


Fig. 12

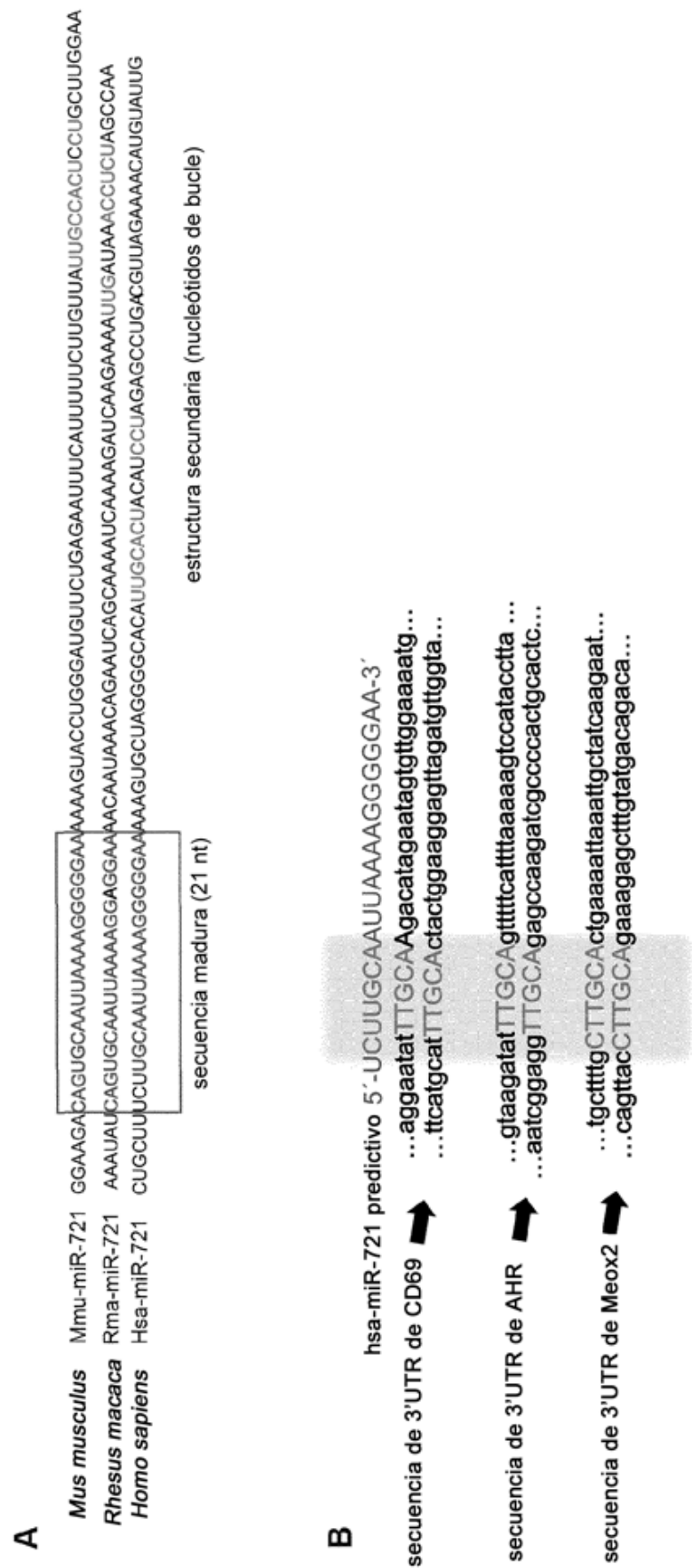


Fig. 13

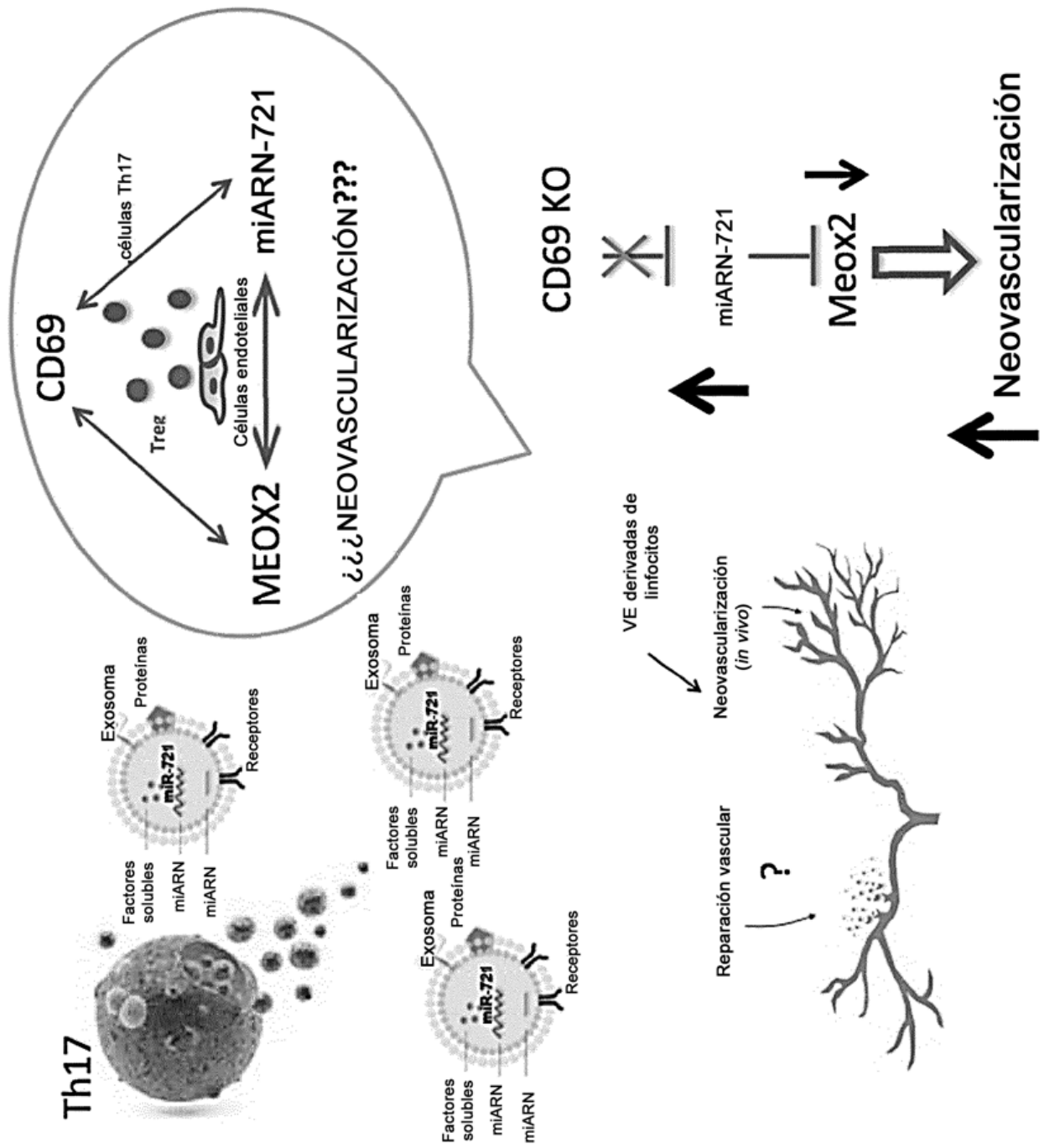


Fig. 14

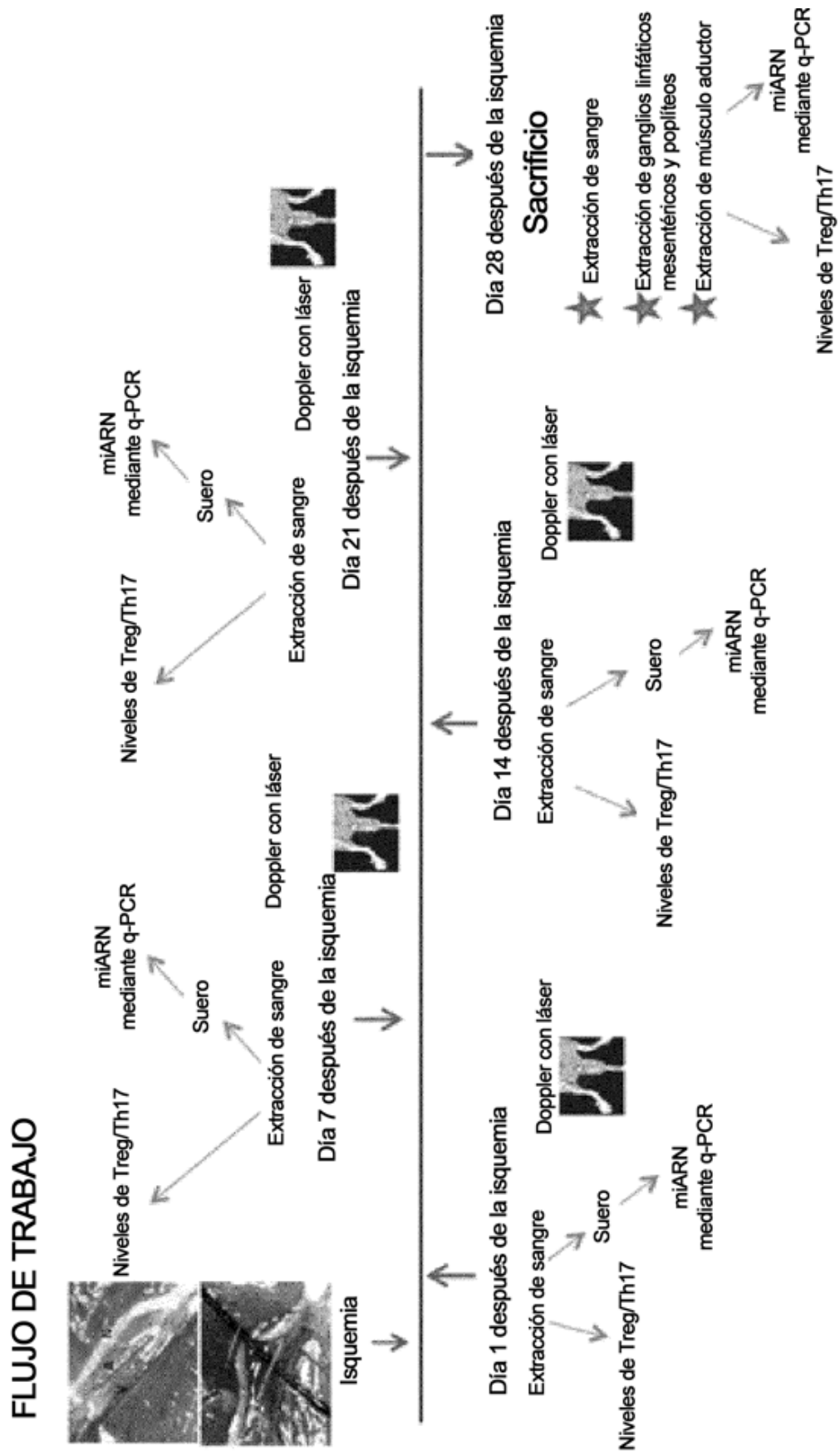


Fig. 15

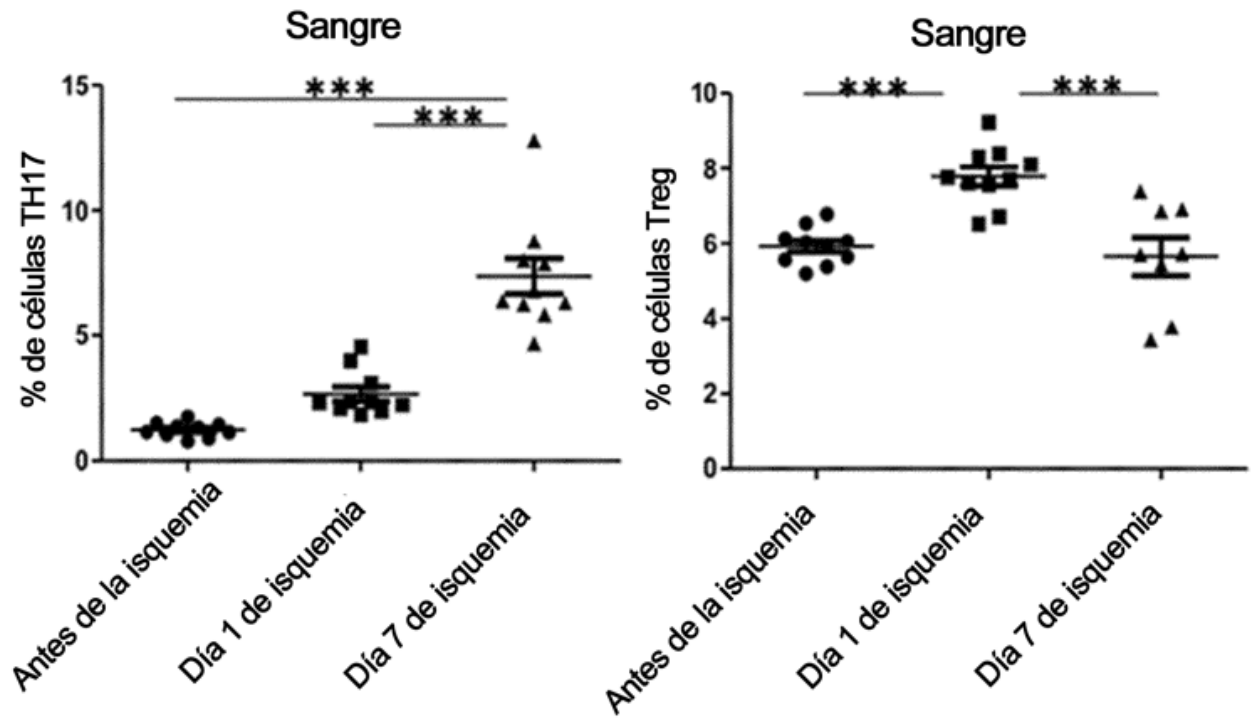


Fig. 16

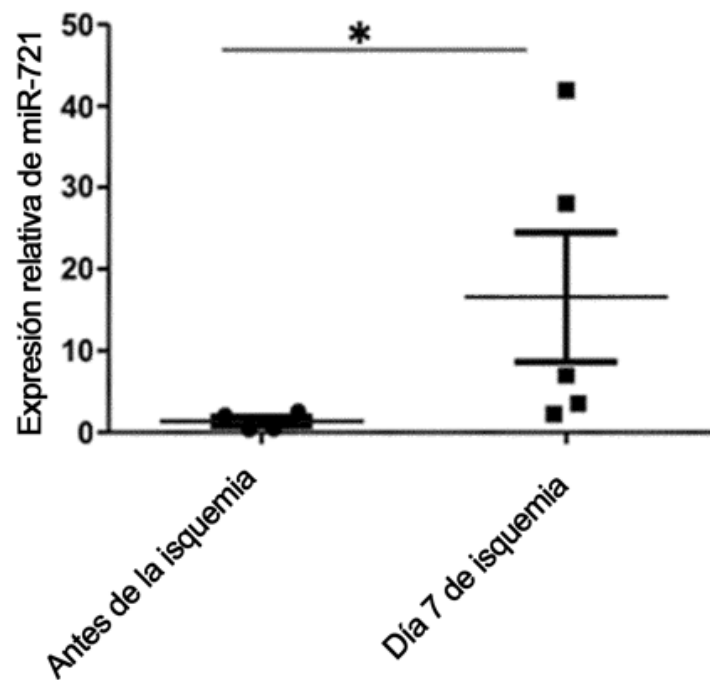


Fig. 17

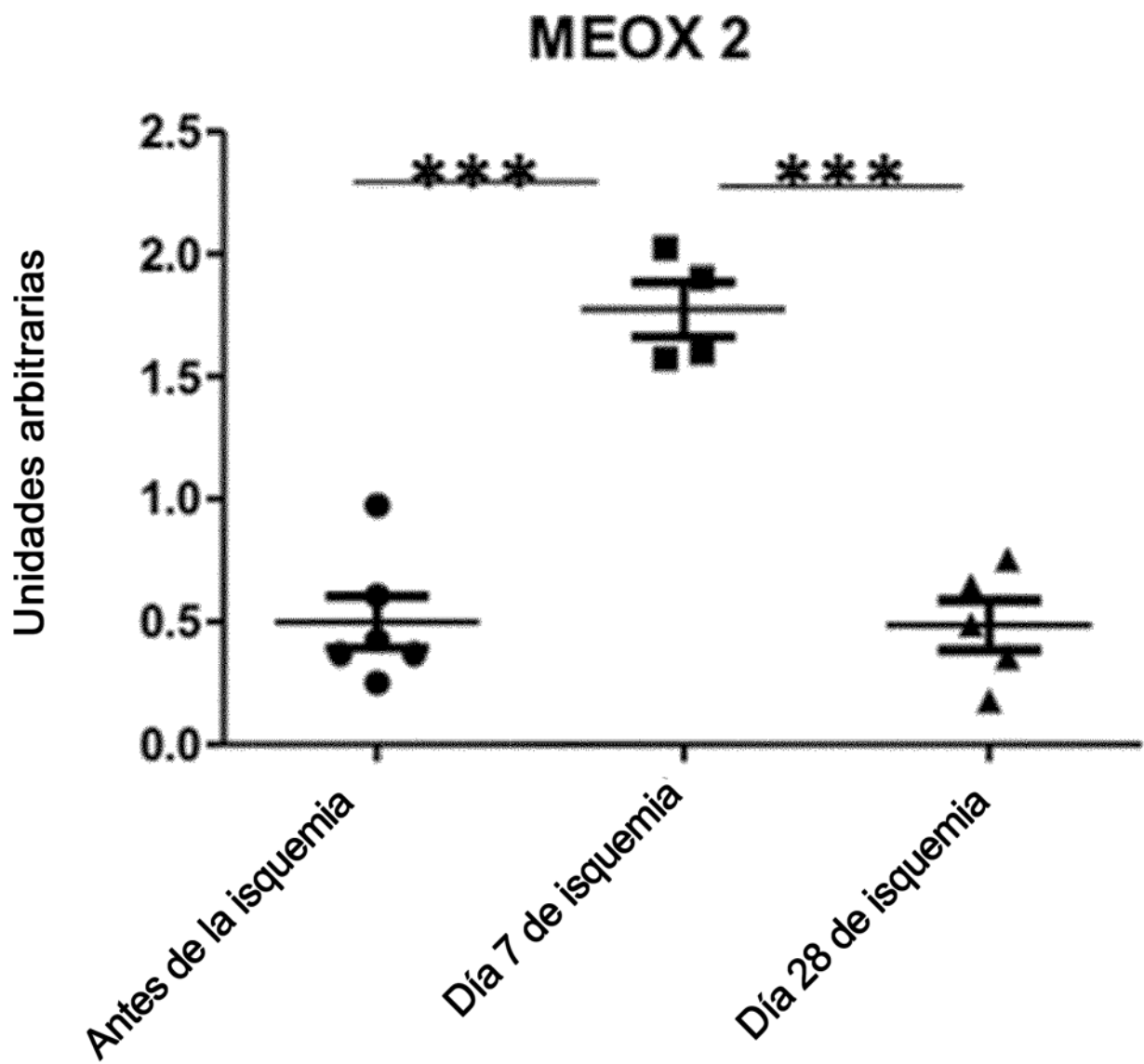
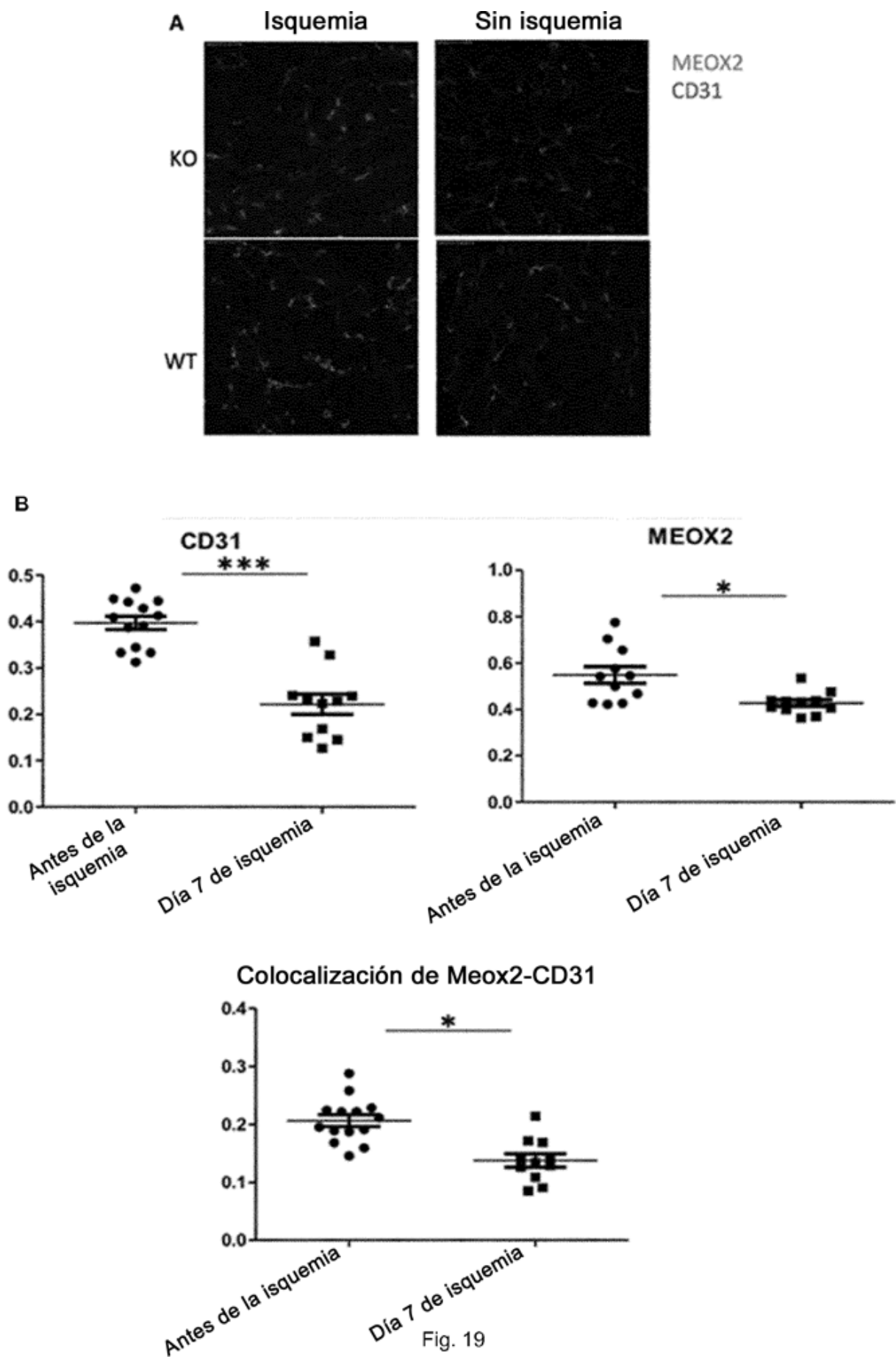


Fig. 18



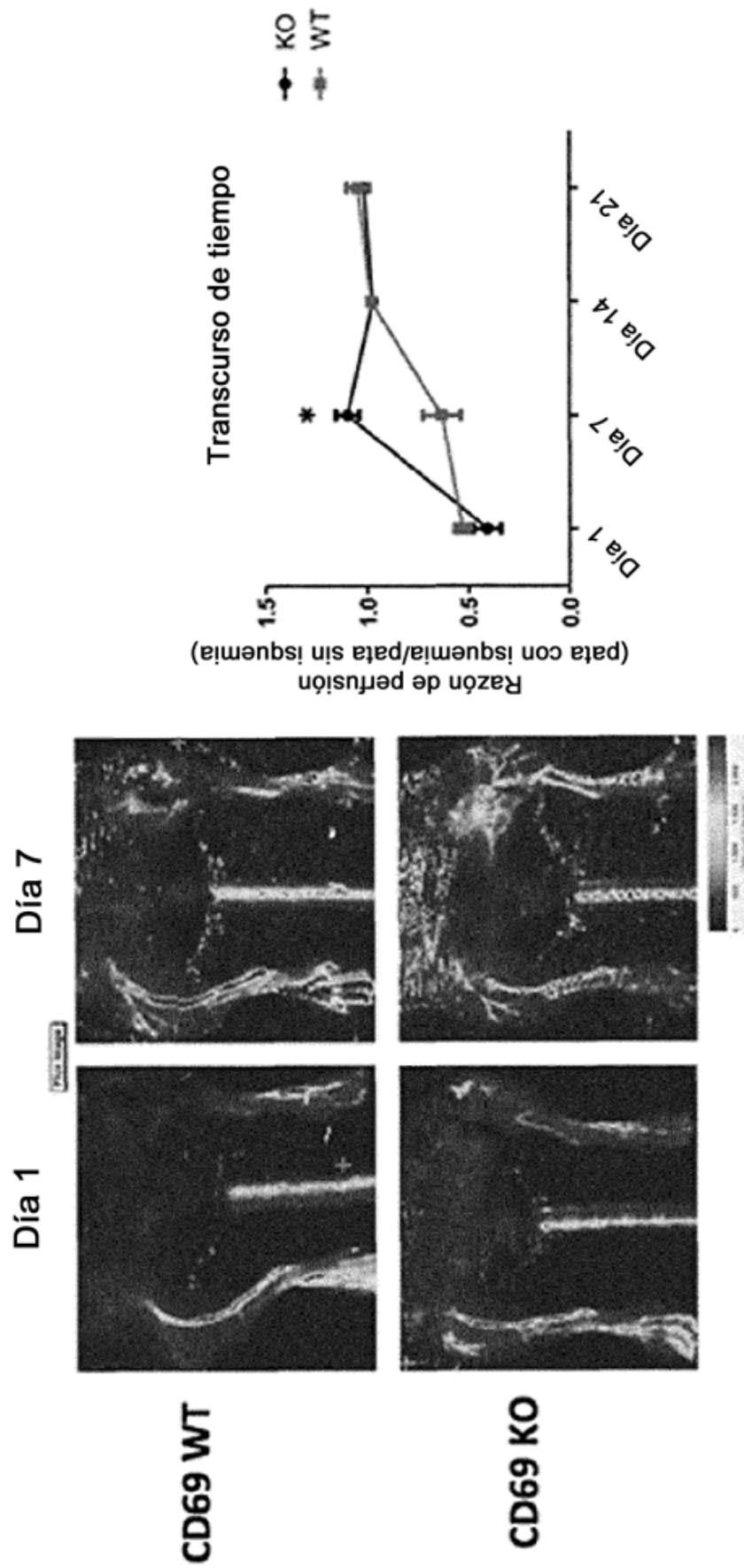


Fig. 20

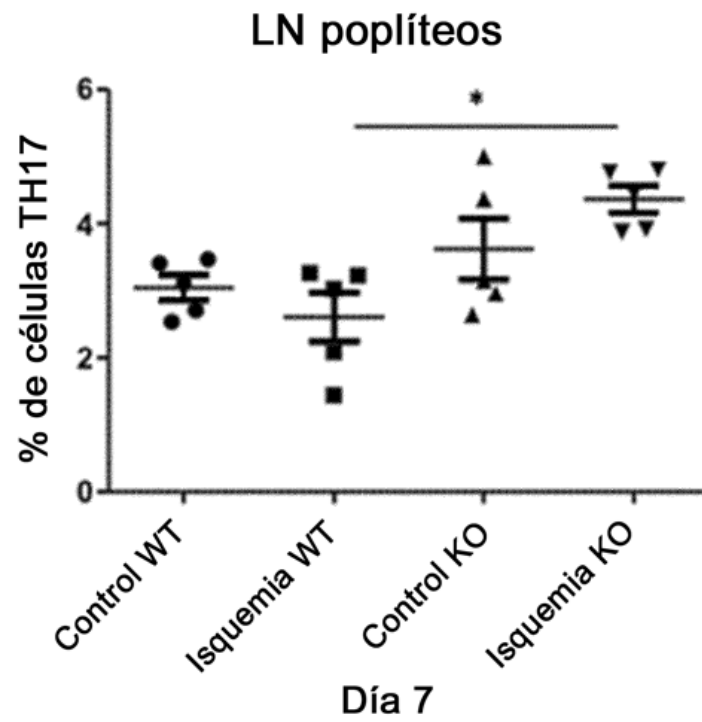


Fig. 21

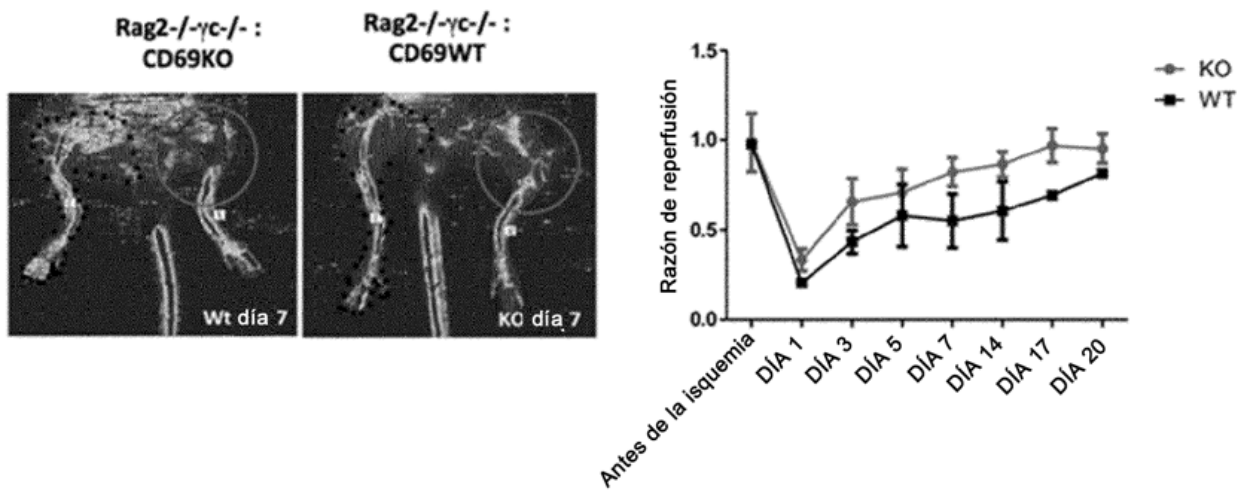
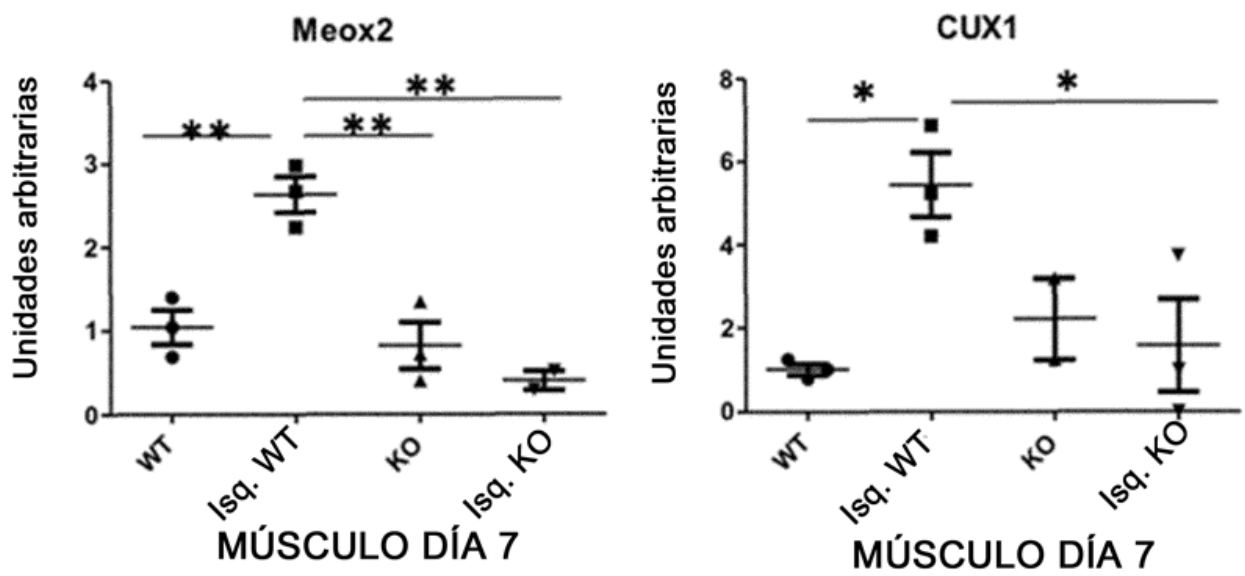
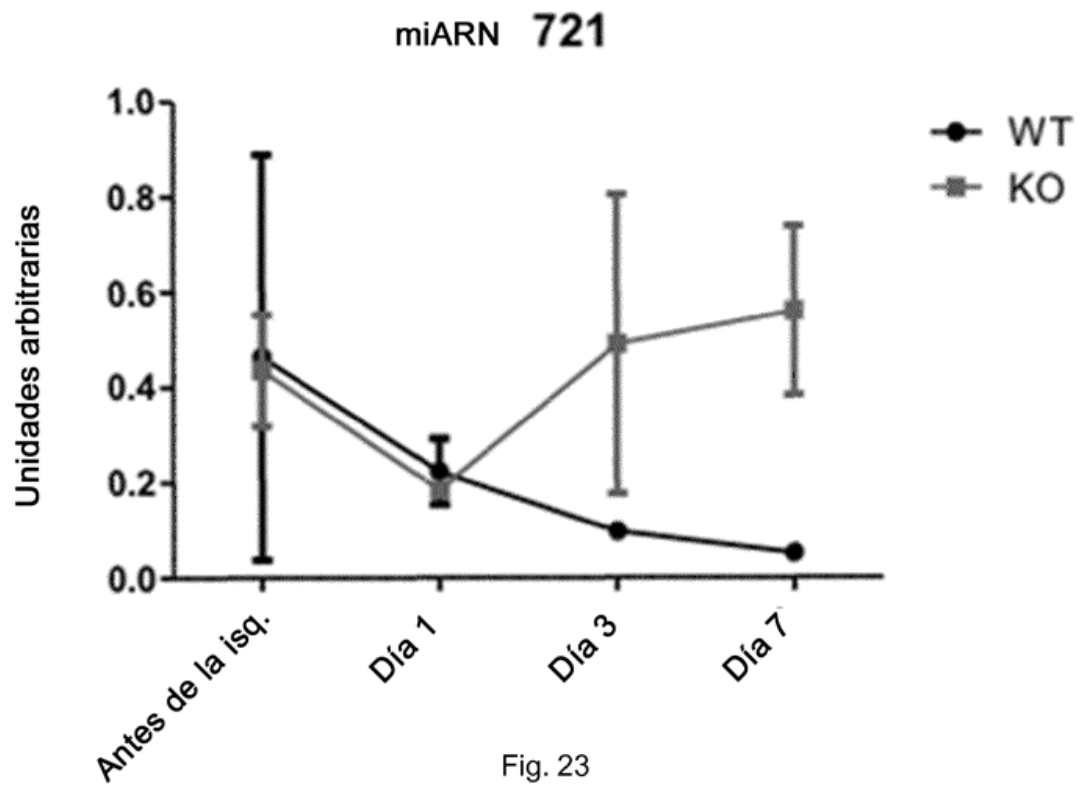


Fig. 22



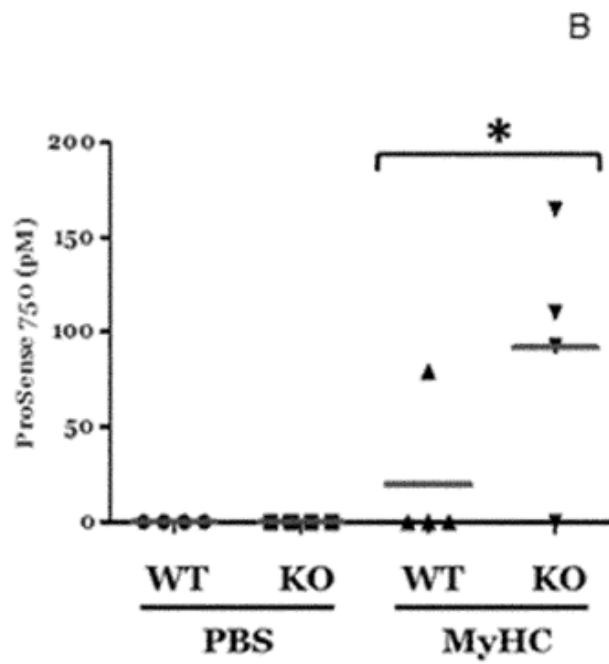
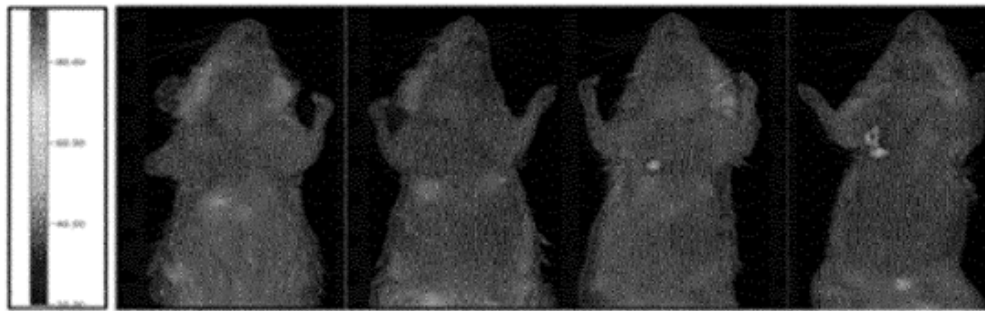


Fig. 25

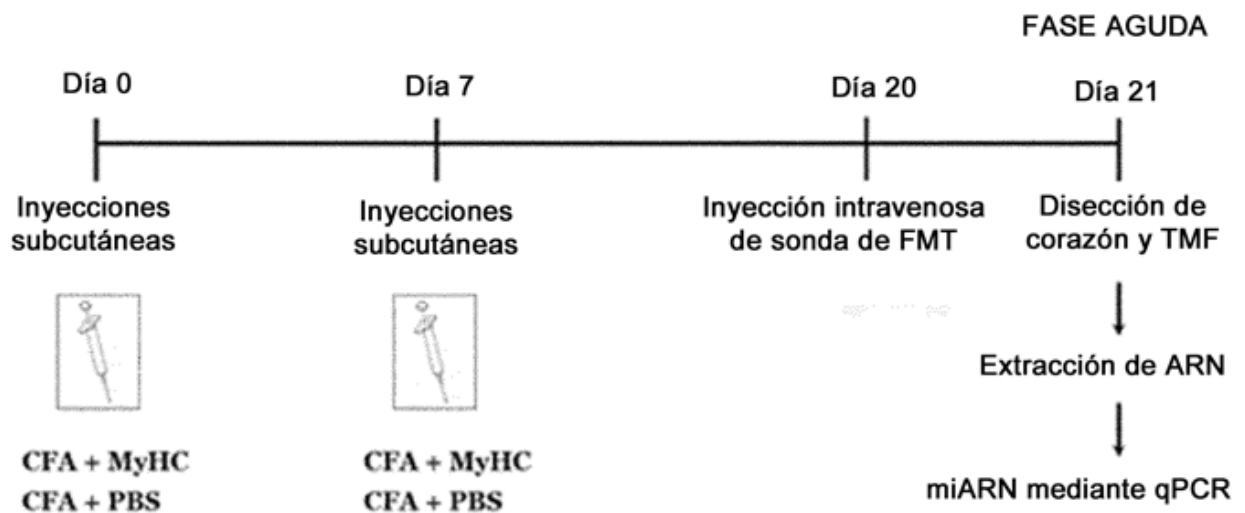


Fig. 26

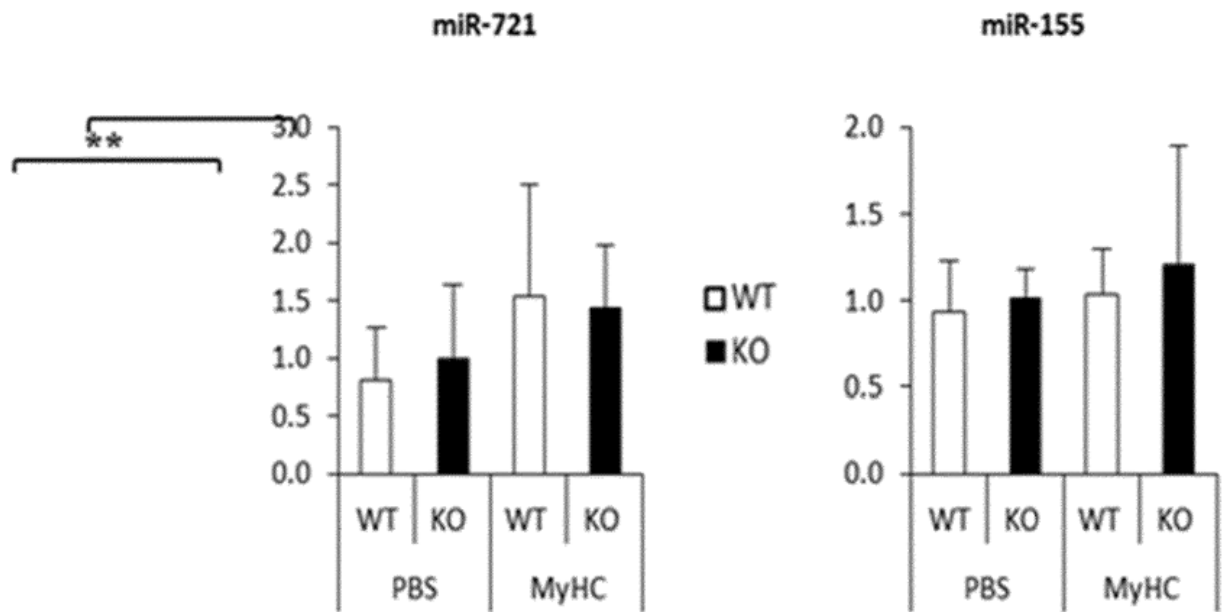


Fig. 27

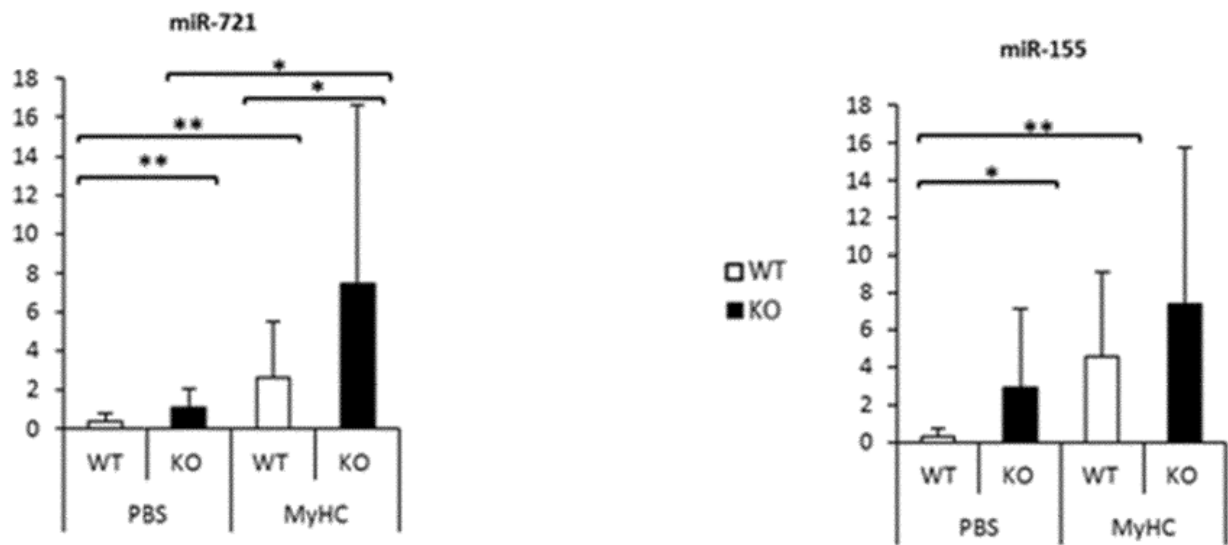


Fig. 28

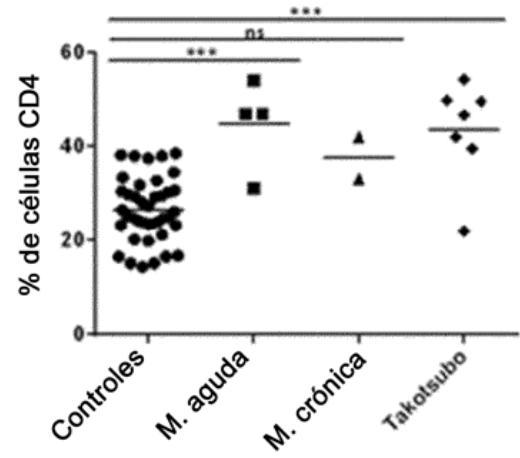
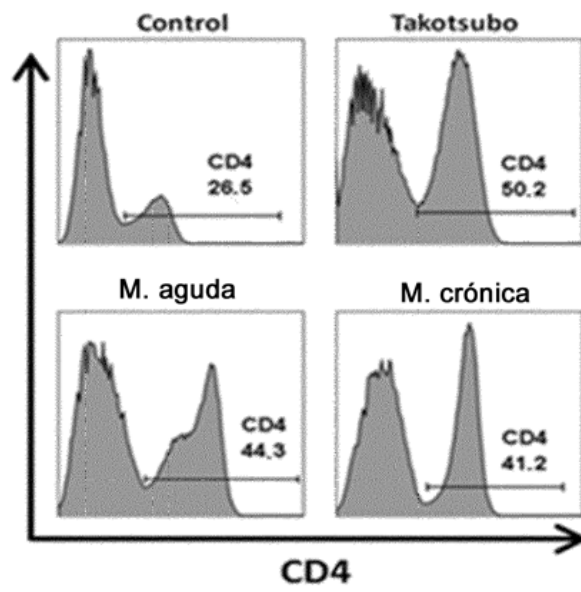


Fig. 29

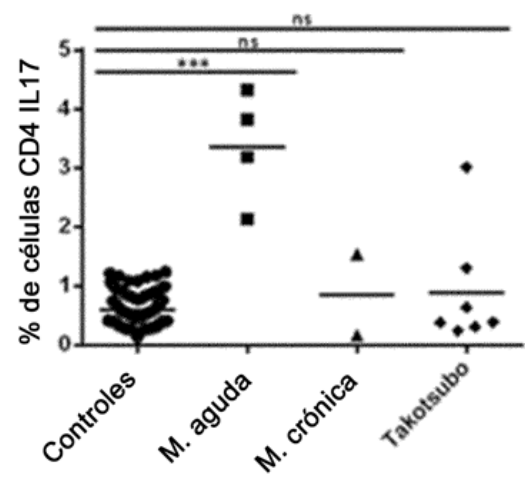
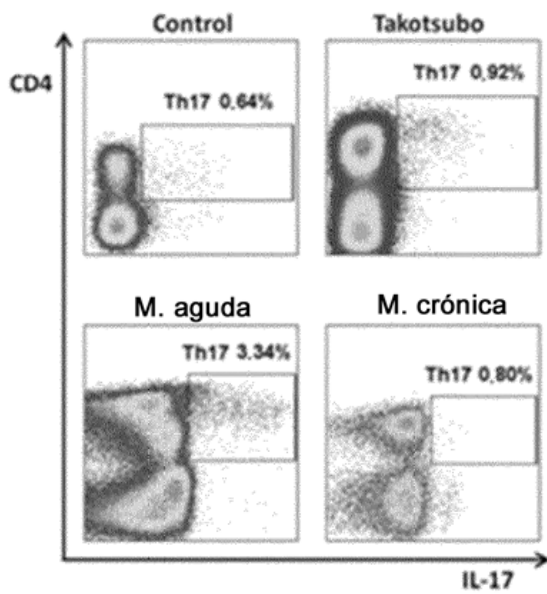


Fig. 30

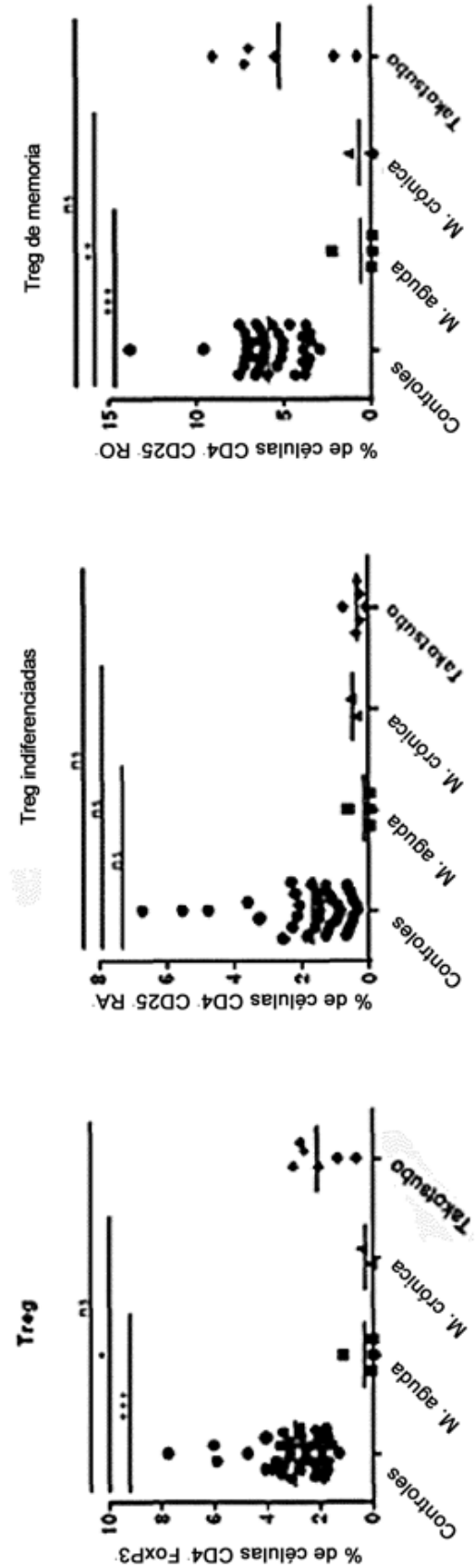
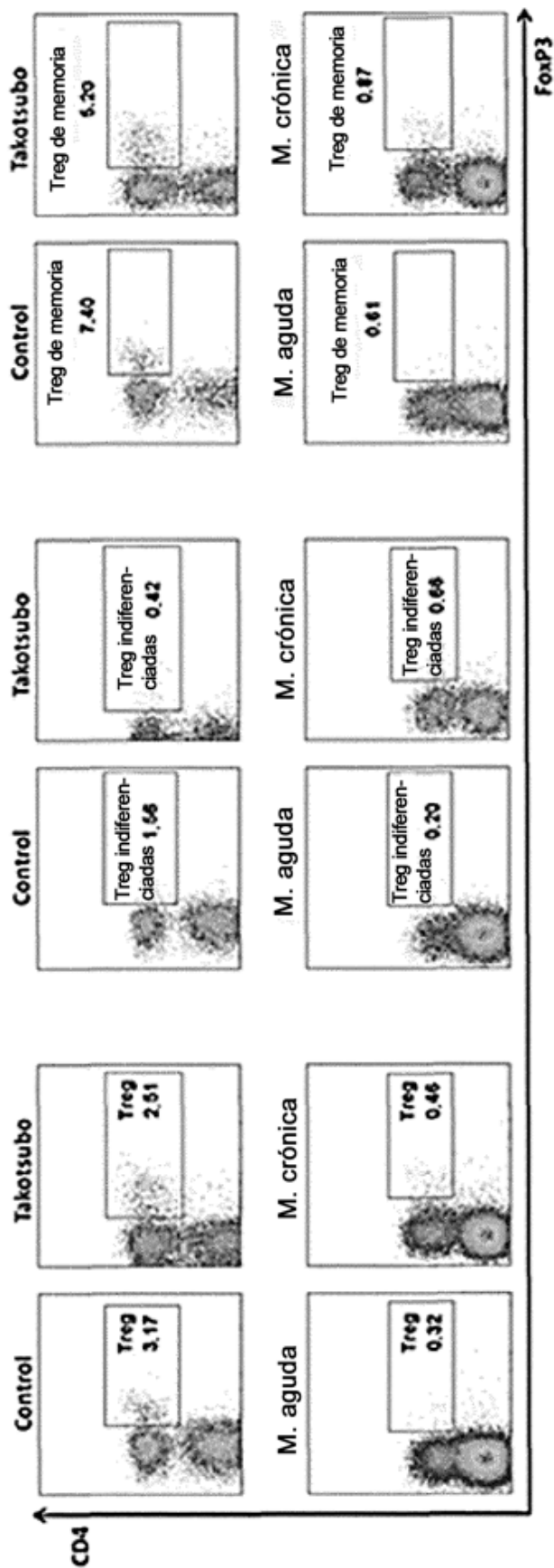


Fig. 31

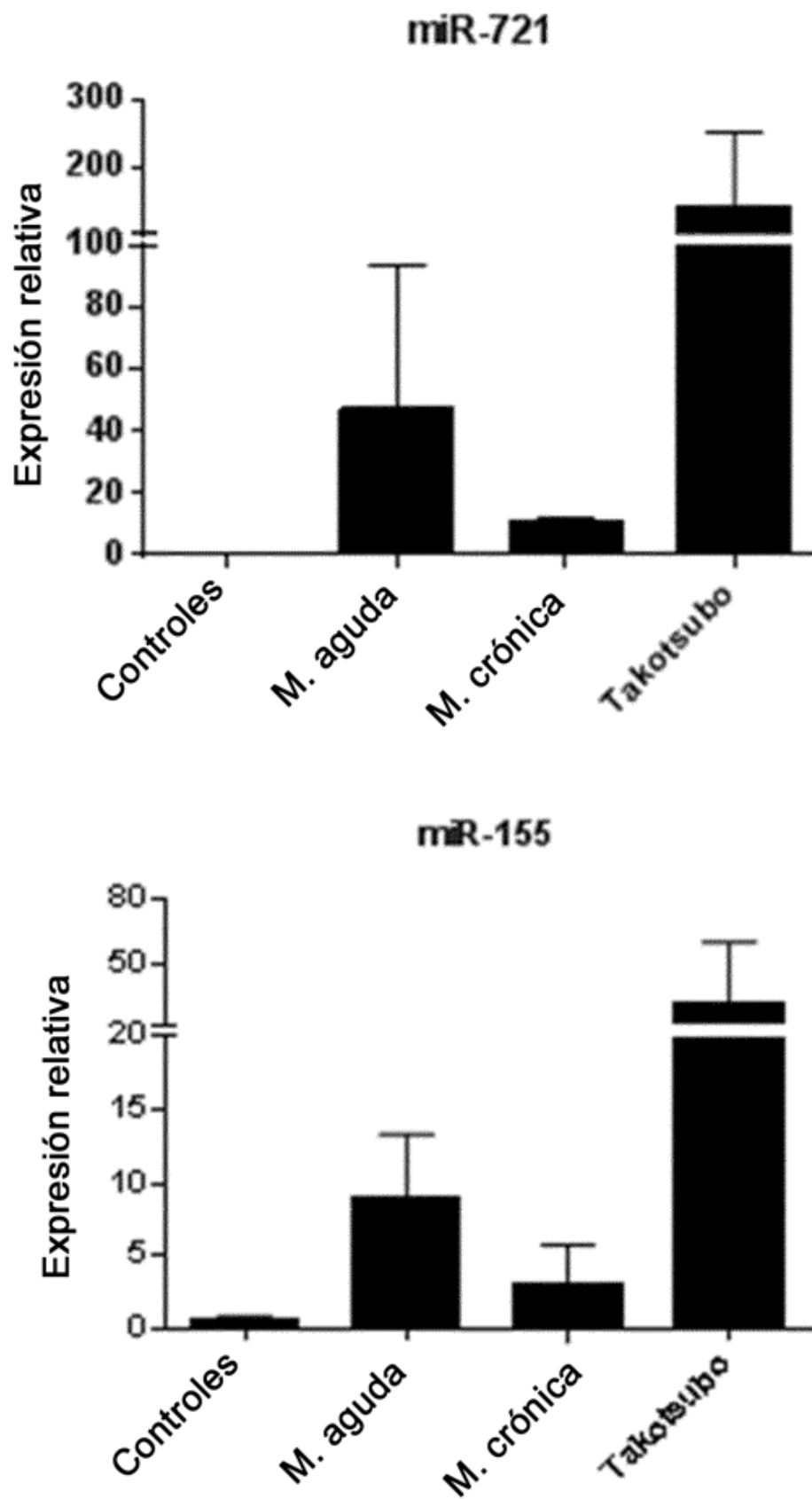


Fig. 32

A
Miocarditis autoinmunitaria
experimental en suero
de ratón
Fase aguda

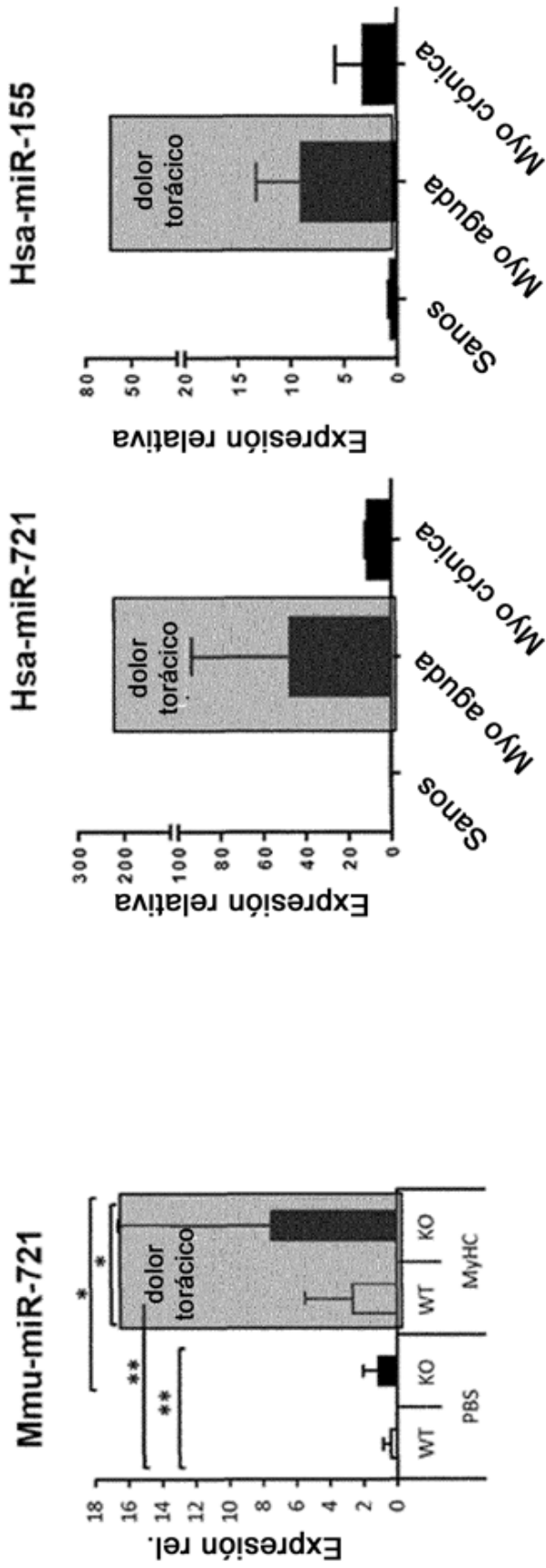


Fig. 33 A

B

Modelo animal de infarto agudo de miocardio

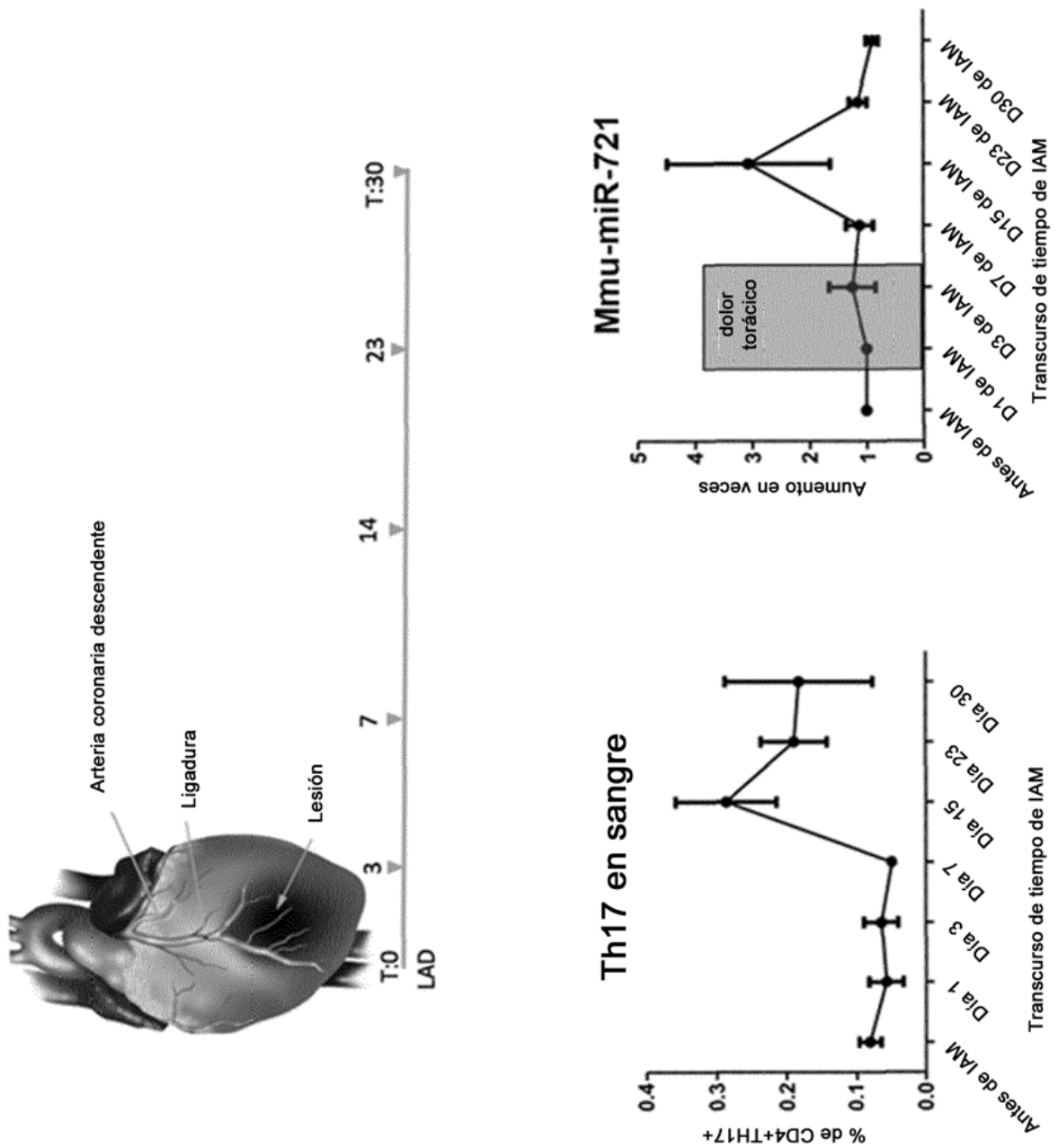


Fig. 33 B

miR-155 y miR-721 en exosomas de ganglios linfáticos drenantes con MAE

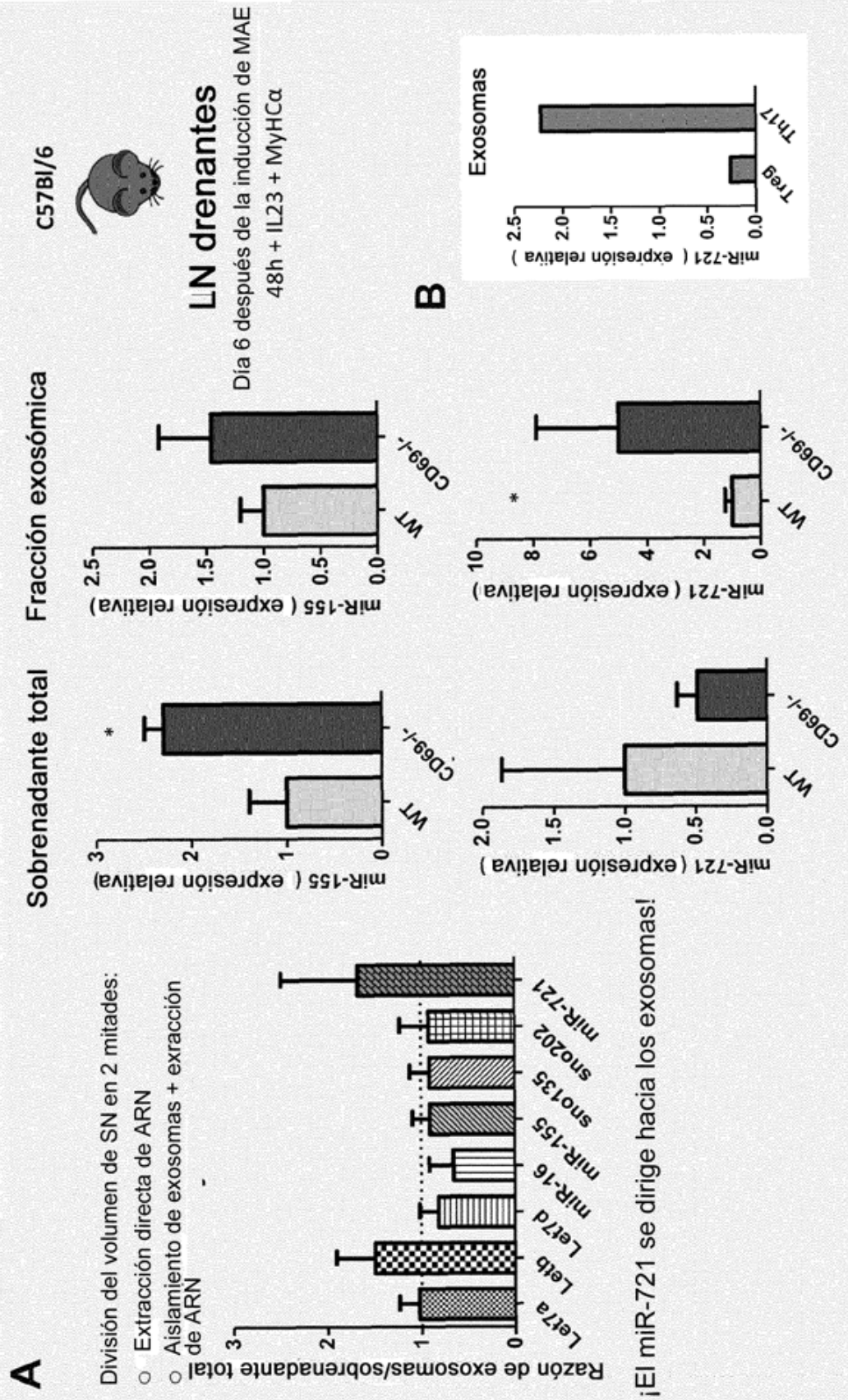


Fig. 34

Parámetros clínicos

TFOS (d)*	Sexo	Edad	Angiografía*	Ecocardiografía	Segmento ST (ECG)	Realce de gadolinio (IRM)	Trata- miento con ABX	Dislipidemia
IAM1	1	V	56 lesión CX	Hipocinesia local	Disminución	NO	NO	SI
IAM2	2	V	58 lesión CD	Acinesia local (60% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM3	1	M	78 oclusión DA	Acinesia local (35% de FEVI)	Elevación	NO	NO	SI
IAM4	1	M	81 oclusión DA	Acinesia local (41% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM5	2	V	64 oclusión CD	Acinesia local (50% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM6	2	V	64 oclusión CD	Hipocinesia local (50% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM7	1	M	77 oclusión DA	Acinesia local (40% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM8	1	V	73 lesión CD	(50% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM9	1	V	48 oclusión DA	Acinesia (40% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM10	1	M	50 lesión CD	Acinesia local (45% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM11	1	V	49 oclusión CX	Acinesia local (48% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM12	0	V	56 lesión CD	Hipocinesia local (50% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
IAM13	1	V	55 lesión CD	Acinesia local (40% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO
MYO1	0	M	39 Incapaz (embarazo)	anodino	Elevación	NO	NO	NO
MYO2	8	V	34 Sin lesión	anodino	SI, positivo	NO	NO	NO
MYO3	2	M	23 No realizada	anodino	SI, negativo	NO	NO	NO
MYO4	3	M	51 No realizada	Acinesia (10% de FEVI)	SI, positivo	NO	NO	NO
MYO5	6	V	46 Sin lesión	Hipocinesia (55% de FEVI)	Elevación	SI, positivo	SI	NO
MYO6	6	V	20 Sin lesión	Hipocinesia (45% de FEVI)	Elevación	SI, positivo	SI	NO
MYO7	4	V	40 Sin lesión	Hipocinesia local (60% de FEVI)	Elevación	NO	NO	NO

*TFOS: tiempo desde la aparición de síntomas (días)

**DA: anterior descendente

CX: coronaria circunfleja

CD: coronaria derecha

13 pacientes con infarto agudo de miocardio
11 pacientes con miocarditis aguda
+66 sujetos sanos (función cardíaca normal)

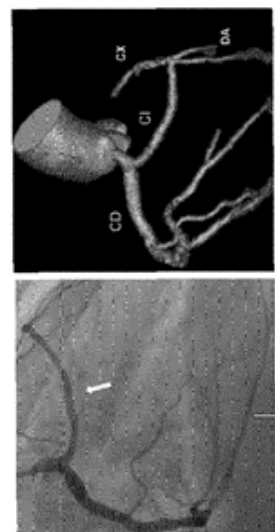
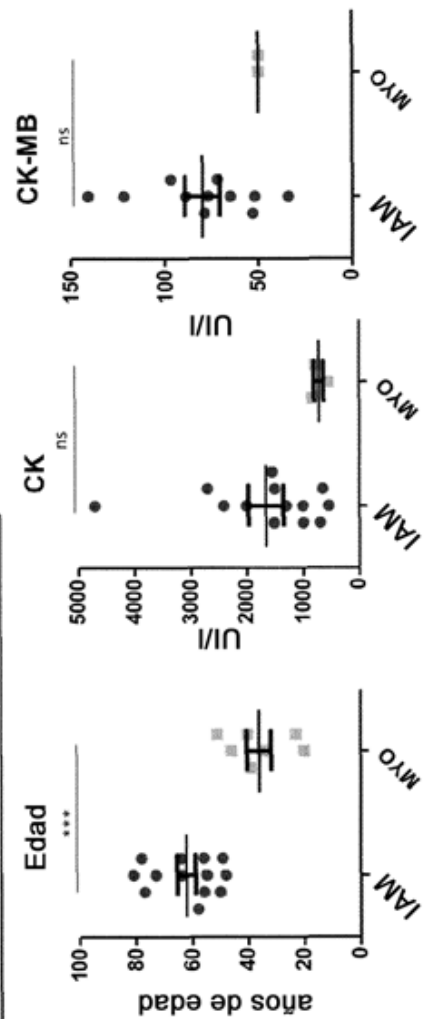
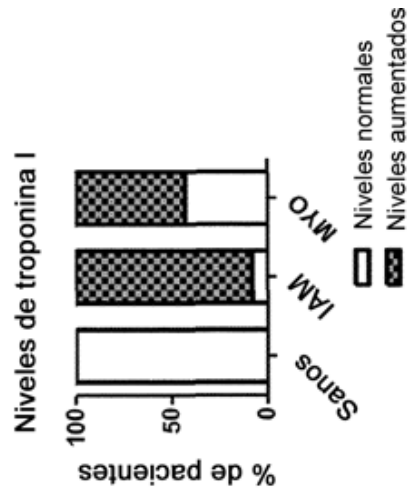


Fig. 35

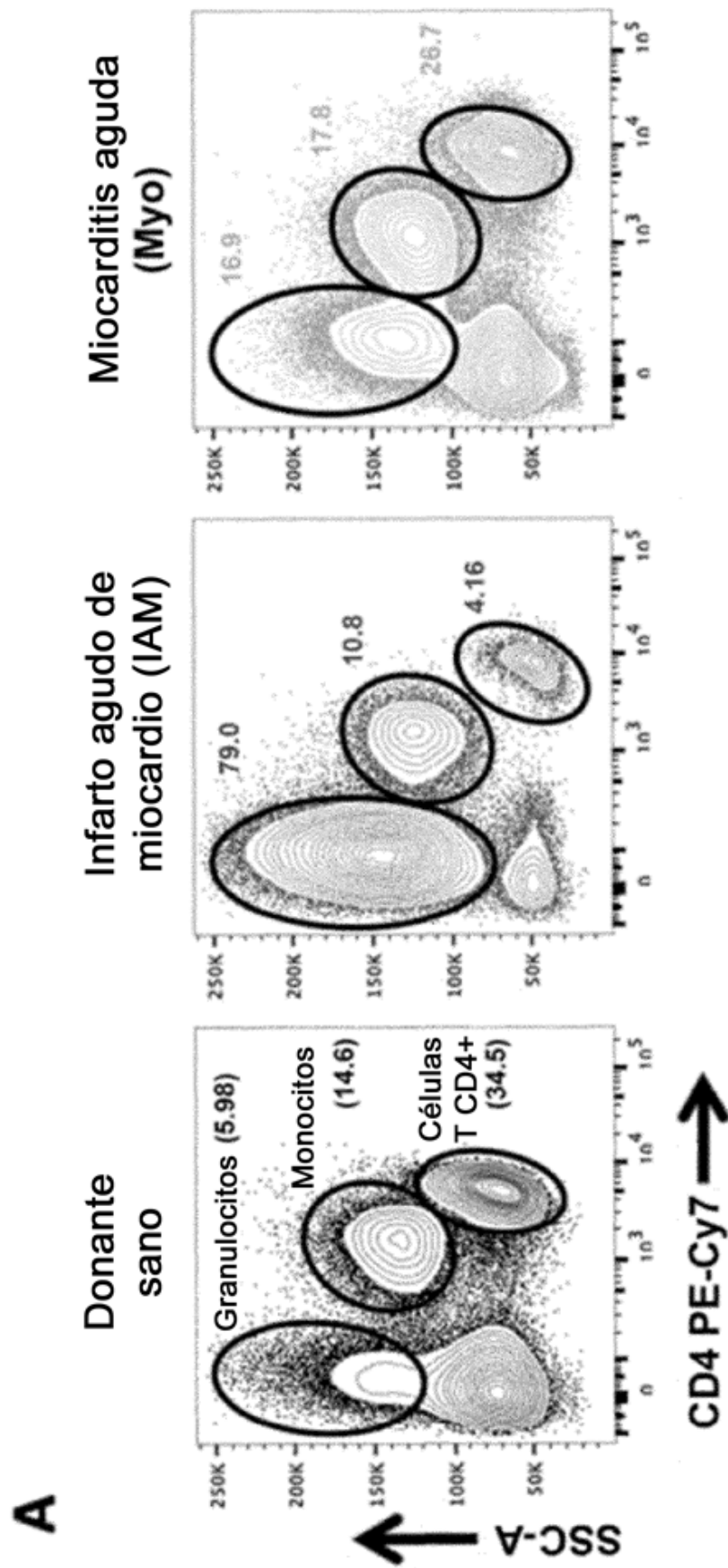


Fig. 36 A

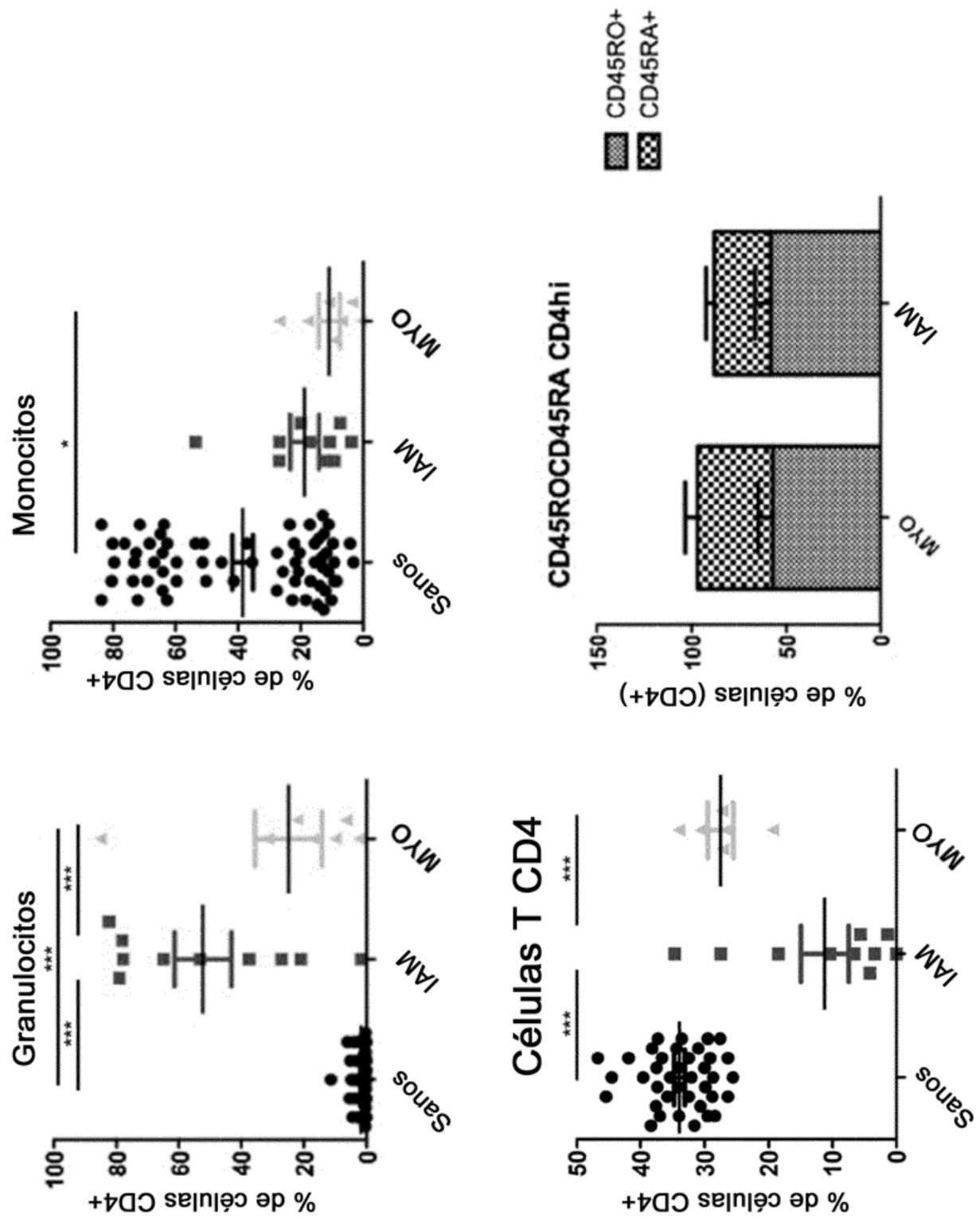


Fig. 36 A cont.

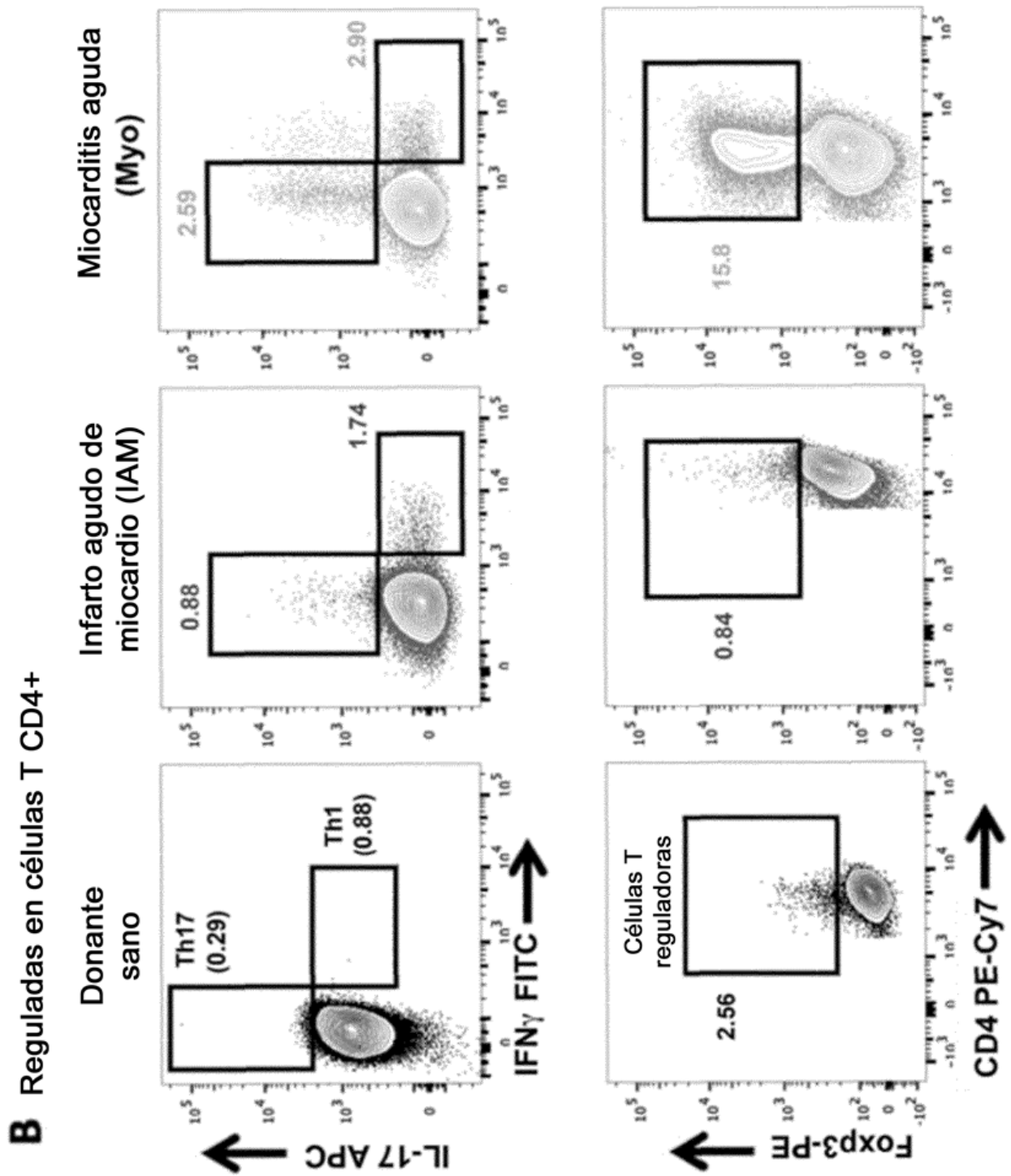


Fig. 36 B

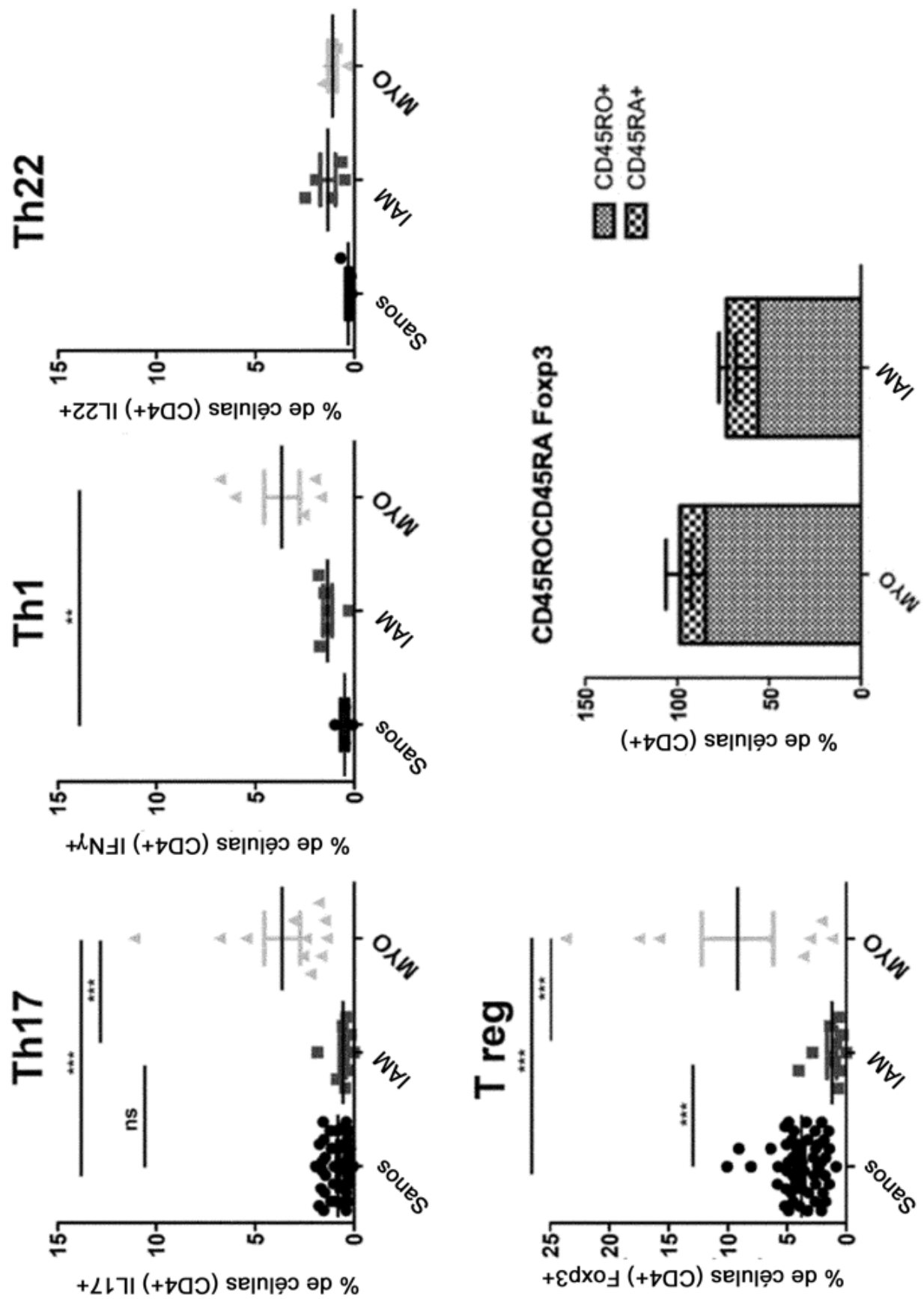


Fig. 36 B cont.

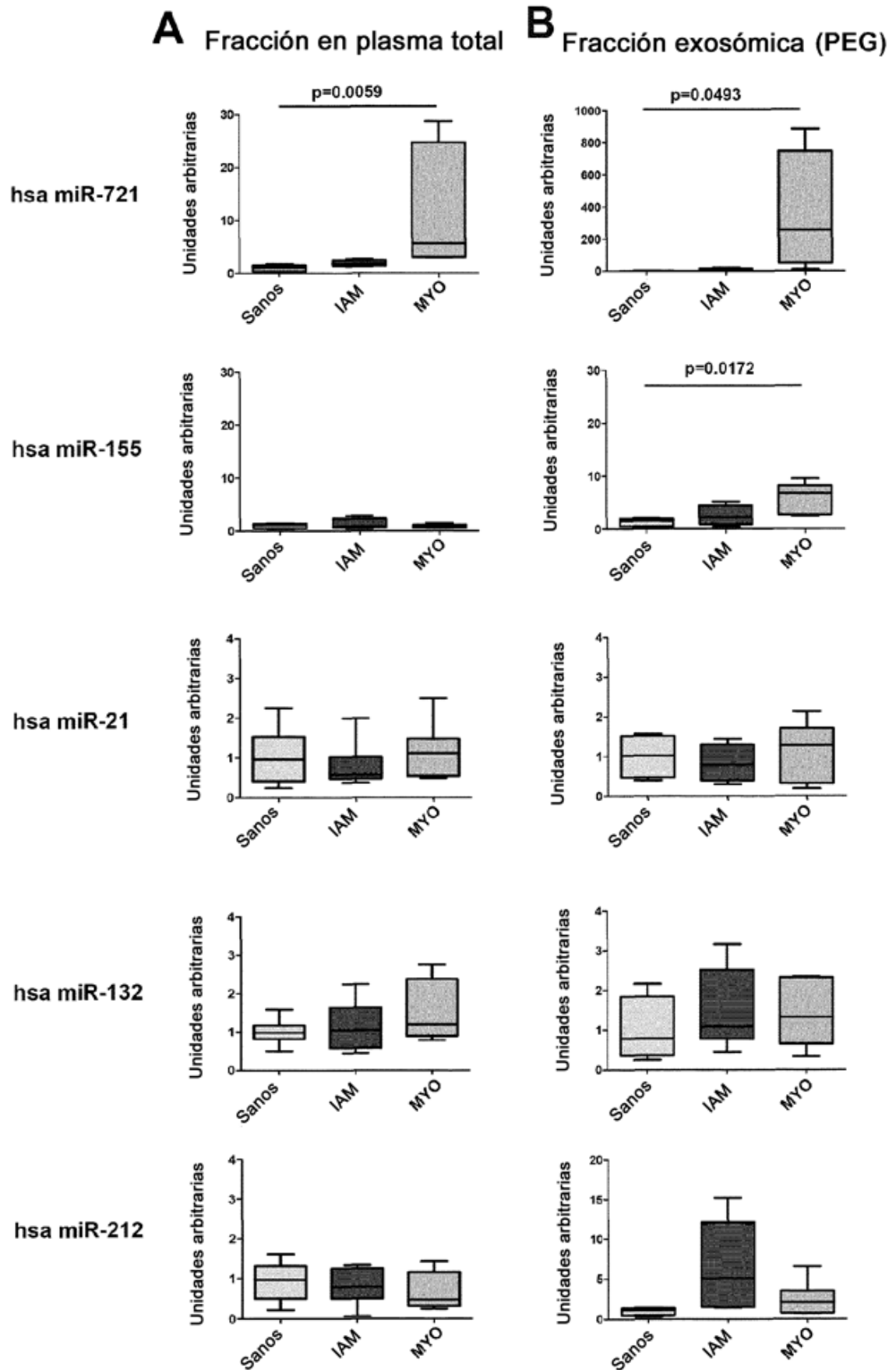


Fig. 37

Enfoque diagnóstico (*biopsia líquida cardiovascular*)

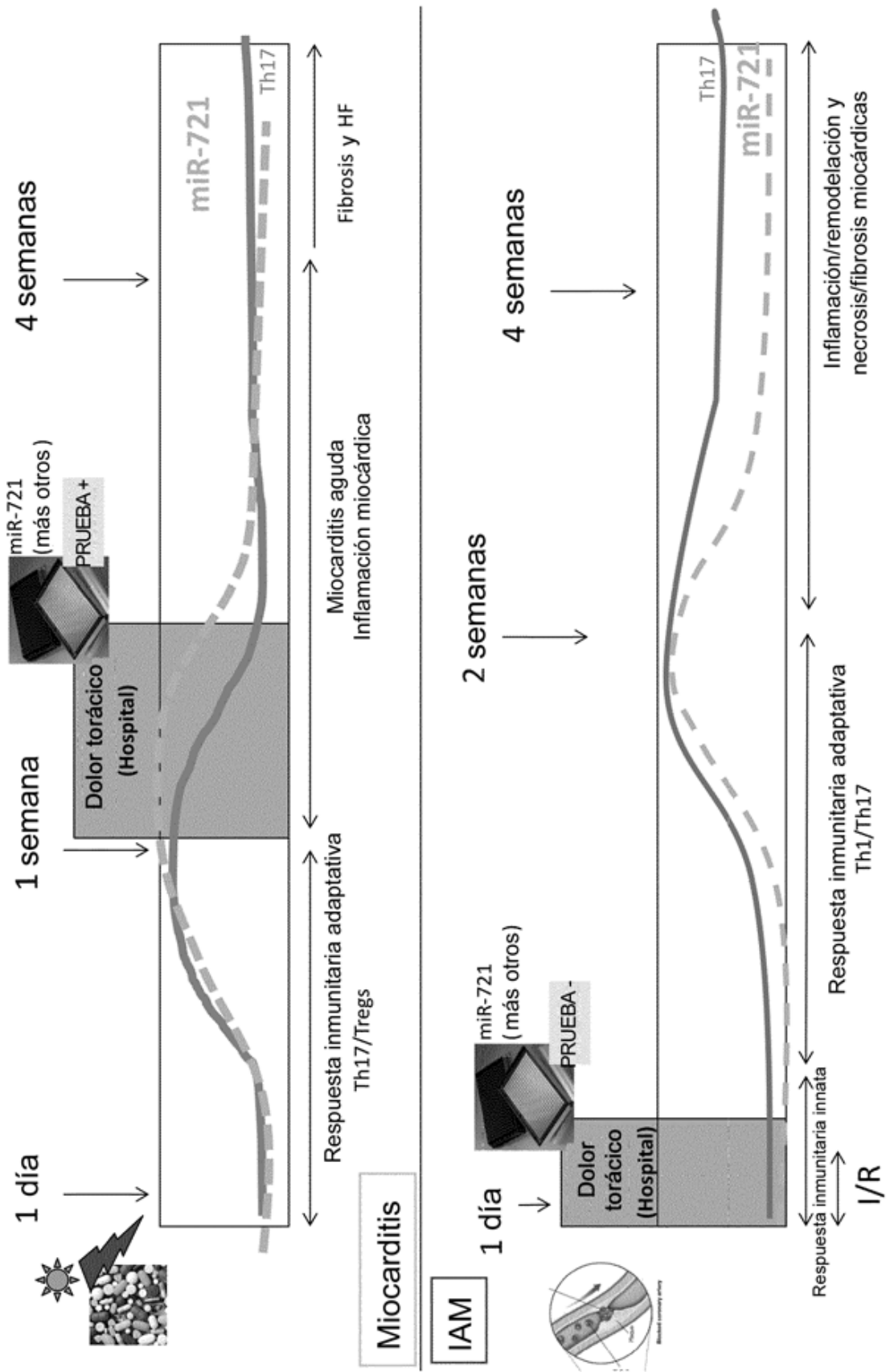


Fig. 38