

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

TESIS DOCTORAL

MicroRNAs y Miocardiopatía Hipertrófica:

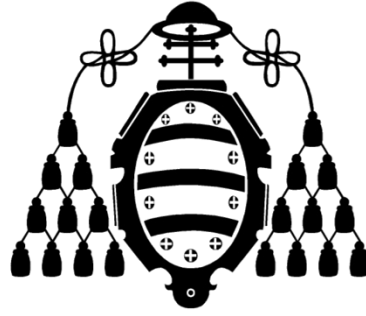
**Análisis mutacional y caracterización de la expresión diferencial en
tejido cardíaco y plasma sanguíneo.**

AUTORA:

María Palacín Fernández 2013

DIRECTORES:

Eliecer Coto García y Julián Rodríguez Reguero



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

TESIS DOCTORAL

MicroRNAS y Miocardiopatía Hipertrófica:

**Análisis mutacional y caracterización de la expresión diferencial en
tejido cardíaco y plasma sanguíneo.**

AUTORA:

María Palacín Fernández 2013

DIRECTORES:

Eliecer Coto García y Julián Rodríguez Reguero



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: MicroRNAS y Miocardiopatía Hipertrófica: análisis mutacional y caracterización de la expresión diferencial en tejido cardiaco y plasma sanguíneo.	Inglés: MicroRNAs and Hypertrophic Cardiomyopathy: mutational analysis and characterization of the differential expression in cardiac tissue and blood plasma

2.- Autor	
Nombre: María Palacín Fernández	
Programa de Doctorado: Investigación en Medicina	
Órgano responsable: Comisión Académica del Programa de Doctorado de Investigación en Medicina	

RESUMEN (en español)

La Miocardiopatía Hipertrófica (MCH) es la enfermedad cardíaca hereditaria más frecuente y tiene gran impacto social por ser la principal causa de muertes súbita en individuos jóvenes. La causa más frecuente de esta enfermedad es la presencia de mutaciones en genes que codifican proteínas del sarcómero cardíaco (la unidad funcional del corazón), aunque en alrededor del 40 % de los casos no se han hallado mutaciones causales.

Los **microRNAS (miRNAS)** son pequeñas moléculas de RNA que regulan la expresión génica uniéndose a la región 3'UTR del ARN mensajero (mRNA). Esta regulación post-transcripcional contribuye tanto a procesos fisiológicos como patológicos, teniendo un papel principal en la patofisiología cardíaca. Los miRNAs han revolucionado el enfoque del estudio genético-molecular de las enfermedades, incluida la MCH. Las mutaciones asociadas a la enfermedad van a localizarse no sólo en las regiones codificantes e intrónicas, sino también en las 3'UTR si afectan a la unión de miRNAs. La comunidad científica está tratando de determinar el **miROMA**, (perfil expresión de miRNAs) en tejidos sanos y patológicos, siendo en el cáncer donde ha habido mayor investigación al respecto. Además, otra característica de estos miRNAs es que son moléculas **muy estables** que pueden ser liberadas a la sangre desde los tejidos enfermos. Por tanto, su detección en el plasma podría ser útil como marcador biológico de la enfermedad.

Con estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo se ha basado en que la variación en la secuencia de los miRNAs relevantes para la MCH podría contribuir a definir el riesgo de desarrollar la enfermedad. Por otro lado, algunos de estos miRNAs podrían ser detectados en la sangre de los pacientes con MCH, y en tal caso empleados como marcadores biológicos para diagnosticar la enfermedad y/o predecir su evolución y eventos adversos, como la muerte súbita. Hemos estudiado la expresión de miRNAs en tejido cardíaco de pacientes y controles sanos, así como en el plasma de pacientes y controles. Observamos una expresión diferencial de miRNAs tanto en tejido cardíaco como en el plasma, identificando varios que podrían ser útiles como marcadores de la enfermedad. Por otro lado, hemos hallado varios polimorfismos en los genes de varios miRNAs que podrían contribuir al riesgo de MCH. Además, tras estudiar las regiones 3'UTR de los genes sarcoméricos hemos hallado cambios que se relacionaron con el riesgo de desarrollar la enfermedad, probablemente a través de su efecto sobre la unión de miRNAs.



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Internacionalización y
Postgrado



**CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO**
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL



RESUMEN (en Inglés)

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common hereditary heart disease and has a great social impact because it is the leading cause of sudden cardiac death in young individuals. The presence of mutations in genes encoding proteins of the cardiac sarcomere (the structural and physiological unit of the heart), used to be the major cause of this disease. But approximately in 40 % of the patients, geneticists' don't achieve identifying the causal mutation of this pathology. On the other hand, microRNAs (miRNAS) are small RNA molecules (20- 25 nucleotides) witch its biological function is the postranscriptional regulation of gene expression by binding to the 3'UTR region of its target messenger RNA. Post-transcriptional regulation by miRNAs contributes to both physiological and pathological processes, having a major role in the heart. These small molecules have revolutionized the approach of genetic diseases, from now on not only exonic changes will be relevant but intronic regions and 3 UTR will have principal role as hosts and targets of this miRNAs. The scientific community is trying to determine miROMA (miRNAs expression profile) in pathological processes compared to healthy individuals. Until now, great advances in the miROMA study are being achieved in the cancer field. Furthermore, miRNAs are very stable molecules resistant to pH, variations, T^a and Rnases, so according to the theory of tissue damage and release of molecules into the bloodstream, miRNAs would have a great potential as biomarkers. With this background, our working hypothesis was based on the variation in the DNA sequence of the MCH-relevant miRNAs could help to identify the risk of developing the disease. Furthermore, some of these miRNAs could be detected in the blood of patients with HCM, and if so, these miRNAs could be used as biological markers for the disease and / or predict their evolution and adverse events such as death sudden. We have studied the expression of these miRNAs in cardiac tissue and blood plasma in patients and healthy controls. We have founded that there is differential expression of miRNAs in tissue and plasma of patients compared to healthy controls. Furthermore, we have studied the genetic variation present in genes encoding certain miRNAs which have been involved in heart disease, and we have founded a novel polymorphism in miR-133a that could be a risk factor of HCM in our population. Furthermore, the study of genetic variation in 3'UTR regions of sarcomeric genes (MYBPC3, MYH7, TNNT2) as putative targets of miRNAs, revealed that variations in these regions of the sarcomeric genes are rare but could contribute to the risk of HCM in our population.

“Nada existe en el mundo que sea insignificante”

Friedrich von Schiller

(Filósofo alemán)

"El modo de dar una vez en el clavo,
es dar cien veces en la herradura”

Miguel de Unamuno.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar me gustaría agradecer a Eliecer y a Mavi el haber confiado en mí, brindándome la oportunidad de incorporarme a su grupo de Investigación, y poder así comenzar mi carrera profesional en el mundo de la ciencia. En estos años, no sólo me he adentrado en el campo de la Genética Molecular, sino que he vivido un sin fin de experiencias tanto profesionales como personales de las que aprendido mucho. Gracias.

Por otro lado, quiero dar las gracias a mis compañeras y compañero de “viaje pre-doctoral” como son: Lorena, Elena, Cristina, Bea y Lucía, y nuestra nota de color: Juan. Gracias a todos por la ayuda prestada, las risas entre geles de acrilamida, los “bio-chistes” y las contribuciones a los “*kits de supervivencia*” en todas sus versiones. Tampoco quiero olvidarme de Isa, nuestra madrina científica, muchas gracias por tu ayuda y consejos.

Me gustaría citar también a Marta, Belén, Sara, Ana, Verónica y Loli, el entramado técnico del laboratorio, ya que han contribuido a que la realización de este trabajo sea posible. Sin olvidarme de nuestra bióloga experta en miniaturas, Blanca. Además me gustaría destacar la colaboración por parte de Dr. Julián Reguero, Dra. María Martín y la Dra. Aurora Astudillo, sin los que habría sido imposible llevar a cabo este trabajo.

En segundo lugar y no por eso no menos importante, me gustaría agradecerles a Eduardo, Julio y a todo su equipo, David, Sonia, Laura, Eldris y Esther el haberme acogido en su laboratorio como lo hicieron, hacer de la mitocondria mi orgánulo favorito, y aunque me haya ido con el apodo de “*María, la placas*”, que mi experiencia allí fuera profesional y personalmente enriquecedora.

Tampoco quiero olvidarme de otros compañeros del hospital, como Jose, Aroa y Sofía gracias a los que los viajes de autobús diarios se hacían mucho más amenos, compartiendo nuestras bio-vivencias.

En tercer lugar quisiera dedicar y agradecer esta tesis a mi gente:

A mis amigos de siempre, Silvia, Gustavo, Marta, Mónica, Lucía, Olaya, Galache, Cristina, Sheila y Helena, y las pequeñas incorporaciones al grupo Daniel, Mateo, Sira y Olaya.

No quiero olvidarme tampoco de mis vecinos Alexia e Iván por las risas en el barrio.

A mi familia en general y a Ana, Chago, July y Emiliano.

A mi Emi, vida, por tolerar mis idas y venidas, subidas y bajadas, por respetar mis decisiones, por recibirme siempre con una sonrisa. Gracias, me haces la vida muy fácil. *Tqm*.

A mi hermano Alberto, tu brillantez es un estímulo constante, “*yes genial*”.

Pero por encima de todo, quiero dar las gracias y dedicar esta tesis doctoral a mis padres, Feli y Emiliano, primer y último motivo de que haya llegado hasta aquí. Gracias por apoyarme en todo, por anteponer nuestros intereses a los vuestros, por ayudarnos en todo momento, por escucharnos, en fin, por estar ahí y porque lo continuéis haciendo durante mucho tiempo. Os quiero.

ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no traducida
A	Adenina
ACE	Enzima convertidor de angiotensina.
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGTR1	Gen del receptor de angiotensina 1
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
C°	Grados centígrados
CK	Creatina kinasa
Del	Delección
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DGCR8	Del inglés: Digeorge critical region gene8
DNTP's	Dideoxinucléotidos
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Sal disódica del ácido etilén-diamino-tetracetato
EDN1	Gen de la endotelina 1
G	Guanina
HVI	Hipertrofia del ventrículo izquierdo
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
Ins	Inserción
MCD	Miocardiopatía Dilatada
MCH	Miocardiopatía Hipertrofica
mRNA	RNA mensajero
miRNAs	micro RNAs
ml	mililitro
NYHA	New York Heart Association
OTSVI	Obstrucción al tracto de salida del ventrículo izquierdo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramo
Preamp. Primers	Cebadores de preamplificación
qtPCR	PCR cuantitativa
RBC	Solución de lisis de eritrocitos
RISC	Del inglés: RNA induced silencing complex.
RQ	Cuantificación relativa. <i>Del inglés Relative quantification</i>
RT primers	Cebadores de retrotranscripción

- SDS Dodecil sulfato sódico
- SIV Septo interventricular
- SNP Polimorfismo de un sólo nucleótido. *Del inglés, Single Nucleotide Polymorphism*
- SRAA Sistema Renina Angiotensina
- SSCA Análisis de la conformación de una sólo hebra. *Del ingles, Single Strand Conformation Analysis.*
- T Timina
- TLDA Micoarray de baja densidad basado en sondas Taqman. *Del inglés, Taqman Low Density MicroArray*
- VI Ventrículo izquierdo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Definición de Miocardiopatía Hipertrófica	1
2. Tipos de MCH	2
3. Diagnóstico, tratamiento y evolución de la MCH	3
4. MCH y muerte súbita	4
5. Anatomía patológica y bioquímica analítica de la MCH.....	6
6. Genómica y proteómica de la MCH	8
7. Epidemiología de la MCH.....	9
8. Genes y mutaciones en la MCH	10
9. Relación fenotipo-genotipo	13
10. Genes modificadores del fenotipo	14
11. MicroRNAs y regulación de la expresión génica.....	15
12. MicroRNAs y cáncer	20
13. MicroRNAs y fisiopatología cardíaca.....	21
14. Las familias miR-1 y miR-133	22
15. La familia miR-208.....	25
16. Otros miRNAs en MCH.....	27
17. MicroRNAs circulantes en procesos isquémicos	27
18. Variación genética en los miRNAs y sus secuencias diana	28
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	33
METODOLOGÍA	37
1. Pacientes y controles	37
2. Cribado mutacional de los genes sarcoméricos	38
3. Obtención y procesamiento del tejido cardíaco.....	38
4. Ensayos TLDA	39
5. Cuantificación de los miRNAs.	42
6. Ensayos individuales	43
7. Procesamiento de los plasmas y selección de los controles endógenos	44
8. Cuantificación de miRNAs plasmáticos	45
9. Análisis de la variación en los myo-miRs	46
10. Genotipado mediante PCR-RFLP.....	46
11. Análisis de la variación genética en las regiones 3'UTR de los genes sarcoméricos.	48
12. Análisis estadístico	48
RESULTADOS	53
1. Perfil de expresión de miRNAs en tejidos hipertróficos.....	53
2. Ensayos individuales	54
3. Perfil de expresión de miRNAs en plasma	59
4. Validación de los miRNAs en plasma	60
5. MiR- 483-5p como marcador plasmático en la MCH	61
6. MiR- 483-5p en leucocitos	64
7. Predicción de las funciones del miR- 483-5p.....	66
8. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos	67
9. Variación genética en los myo-miRs.....	72
10. Posible efecto funcional de las variantes de los myo-miRs	77
11. Polimorfismo AGTR1 rs5182.....	79
DISCUSIÓN	85
MiRNAs en tejido cardíaco	85
MiRNAs en plasma.....	89
Mutaciones sarcoméricas incluyendo las regiones 3'UTR.....	91
Variación genética en los myo-miRs.....	95
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXO: Publicaciones	117

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Definición de Miocardiopatía Hipertrófica (MCH).

En 1958 Donald Teare describió ocho pacientes con un tamaño desproporcionado del septo interventricular y desorganización de las fibras musculares y aumento del tejido conectivo en el corazón (Teare 1958). Teare designó a esta entidad como “hipertrofia asimétrica o tumor benigno de corazón”, y desde entonces ha recibido varias denominaciones hasta la de Miocardiopatía Hipertrófica (MCH), aceptada actualmente (**Figura 1**). Las academias Europea y Norteamericana de Cardiología reconocen a la MCH como la hipertrofia esencial o primaria del ventrículo izquierdo (VI); es decir, en la que la hipertrofia no puede ser explicada por otra enfermedad o condición que la pueda causar, como hipertensión, enfermedad valvular cardíaca, práctica deportiva, etc. La MCH sería una forma “patológica” de hipertrofia del VI (HVI), lo que la diferencia de la “fisiológica” en la que la HVI desaparece al eliminar el posible factor causante (por ejemplo, al cesar la práctica deportiva). El límite para definir la HVI se ha establecido en un septo interventricular $> 15\text{mm}$ de grosor, aunque algunos autores siguen considerando como pacientes a los que presentan septos $>13\text{ mm}$ (Gersh y cols., 2011).

Para entender esta enfermedad debemos tener en cuenta su carácter hereditario, aunque la penetrancia (probabilidad de manifestarla siendo portador de alguna mutación causal) es variable y depende de la edad. Esto hace que el carácter hereditario/familiar sea difícil de establecer en muchos casos, aparentemente esporádicos. Dada su prevalencia (alrededor de 1/500) no puede ser considerada una enfermedad rara, y estaríamos ante la enfermedad cardíaca de naturaleza hereditaria más frecuente.

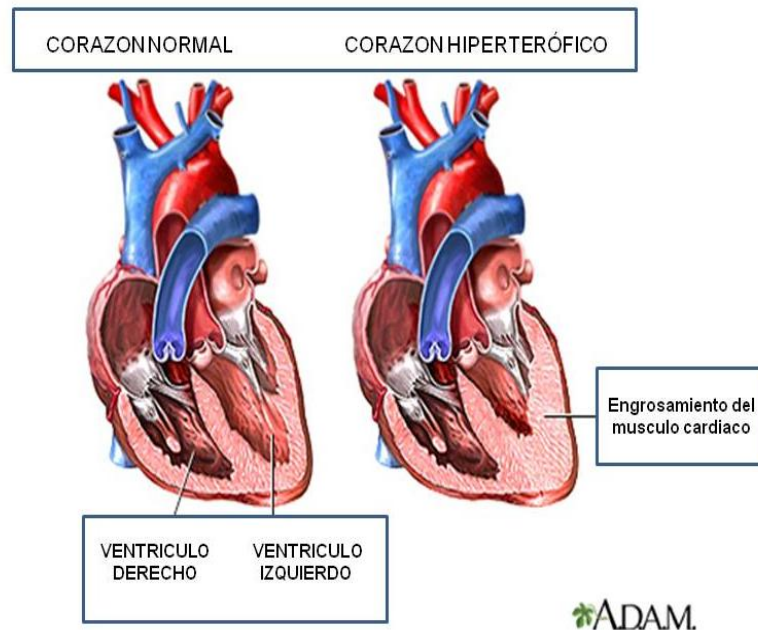


Figura 1. Corazones normal e hipertrofico.

(Adaptado de <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/18141.htm>).

2. Tipos de MCH.

Según la localización del engrosamiento del septo interventricular se distinguen tres tipos de MCH: septal asimétrica, concéntrica y apical. La morfología septal asimétrica es la más frecuente y en ella la hipertrofia se concentra en la parte superior del tabique. Esta a su vez se clasifica en asimétrica sigmoidal, en la que el ventrículo tiene forma ovoide, y asimétrica de curva reversa, en la que el ventrículo se visualizaría como una media luna. La primera es frecuente en enfermos con edad avanzada, mientras que la morfología en media luna es característica de individuos jóvenes, y de aquéllos con mutaciones en MYH7 (Lever y cols., 1989). En la distribución concéntrica la hipertrofia se localiza de forma homogénea en todo el ventrículo izquierdo, y en la *apical* afecta de forma predominante al ápex del VI.

Por otro lado, según la presencia o ausencia de obstrucción al tracto de salida del VI (OTSVI) las hipertrofias se clasifican en *obstructivas* y *no obstructivas*. Las formas de obstrucción más frecuentes son la subaórtica y la medioventricular. Se estima que el 25-40% de los pacientes presentan OTSVI en estado de reposo o latente, aunque no hay consenso sobre significado de este hallazgo para el manejo terapéutico. Los pacientes con

obstrucciones significativas en los que se generan gradientes $>$ de 30 mmHg tienen peor pronóstico.

3. Diagnóstico, tratamiento, y evolución de la MCH.

La edad de manifestación y la evolución clínica de la MCH son muy variables. Muchos pacientes no manifiestan síntomas hasta edades avanzadas y se mantienen estables durante largos periodos de tiempo, mientras que otros pueden presentar hipertrofia severa a edad temprana con manifestaciones extremas. Los casos más “problemáticos” son aquéllos en los que un episodio de muerte súbita cardíaca (MSC) es la primera manifestación de la enfermedad.

El diagnóstico debe en primer lugar descartar una HVI de carácter adaptativo o metabólico (enfermedad de Fabry, Amiloidosis). En algunos pacientes la enfermedad se puede sospechar por la existencia de un murmullo sistólico, relacionado con la obstrucción del flujo sanguíneo a la salida del VI, pero estos hallazgos deben ser confirmados por electrocardiograma (ECG) y ecografía. El ECG de 12 derivaciones suele ser “patológico” en pacientes incluso sin síntomas patentes, pero un ECG normal no excluye una MCH. Una variación de esta técnica es el Holter, registro durante un tiempo prolongado (normalmente 24 horas) para determinar la presencia de arritmias ventriculares. La *eco cardiografía* es el método no invasivo para visualizar la hipertrofia. La *ecografía Doppler* permite verificar el flujo sanguíneo y el gradiente de presión en el tracto de salida del ventrículo.

La *disnea* (dificultad para respirar) es el síntoma más común de insuficiencia cardíaca en pacientes con MCH. Se produce por la incapacidad al llenado diastólico en el VI (disfunción diastólica), con una elevación de la presión en diástole y caída del gasto cardíaco y volumen / minuto. La disnea se clasifica en los 4 grados de la Asociación del Corazón de Nueva York (NHYA):

NYHA I: la disnea sólo aparece cuando el paciente realiza una actividad física superior a la habitual, como andar rápido o correr.

NYHA II: la disnea se presenta con actividades que realizamos en nuestra vida cotidiana, como subir las escaleras.

NYHA III: la disnea aparece con esfuerzos físicos pequeños.

NYHA IV: la disnea está presente incluso en reposo, cuando el paciente no realiza ninguna actividad física. Esta es la situación más grave, y habitualmente requiere ingreso hospitalario para tratamiento intensivo.

Una complicación de la MCH es la presencia de *fibrilaciones* o *arritmias* secundarias a la miocardiopatía; el tratamiento farmacológico es fundamental en estos casos para evitar el riesgo de MSC. Alrededor del 2- 3 % de los pacientes progresan hacia una fase terminal de miocardiopatía dilatada (cámaras cardíacas dilatadas), con grandes zonas fibróticas y/o isquémicas. Esta fase es más frecuente en pacientes de edad avanzada tras varios años de evolución.

El tratamiento farmacológico de la MCH tiene como objetivo aliviar los síntomas y reducir el riesgo de MSC. Para ello es fundamental controlar las arritmias, fundamentalmente mediante beta- *bloqueantes* (siempre que no estén contraindicados por otra patología). La *amiodarona* es el anti-arritmico más utilizado en estos pacientes, aunque su administración está condicionada por efectos sobre la glándula tiroides, pulmones e hígado. Los fármacos bloqueantes de canales de Calcio pueden mejorar la diástole pero están contraindicados cuando existe obstrucción del tracto de salida del VI. Otros fármacos, como las *estatinas* o la *N-acetil-cisteína* han dado resultados positivos en ensayos con animales, pero su valor en pacientes con MCH no está probado. Para pacientes con criterios de alto riesgo de MSC el tratamiento de elección es el *desfibrilador automático implantable (DAI)*. La cirugía se limita a casos muy severos. En la *miectomía* se corta y extrae tejido de la pared cardíaca para aumentar el volumen de la cámara. La *ablación septal alcohólica* consiste en provocar mediante infusión de alcohol (a través de cateterismo) la muerte del tejido muscular causante de la obstrucción. Esto reduce el grosor septal y alivia los síntomas derivados de la obstrucción al flujo de salida. En los pacientes con fallo cardíaco la única alternativa es un trasplante.(Marian 2009).

4. MCH y muerte súbita.

La incidencia de MSC entre pacientes con MCH se ha estimado en aproximadamente 1% por año (Elliott y cols., 2006). Uno de los mayores retos de la investigación sobre ésta enfermedad ha sido encontrar marcadores clínicos o analíticos que pudieran predecir el riesgo de MSC. El cardiólogo podría basarse en evidencias científicas para decidir implantar un desfibrilador (DAI) a los pacientes con mayor riesgo de sufrir eventos

adversos. Tradicionalmente, se han incluido las siguientes variables para ayudar al clínico en la estratificación del riesgo: la historia clínica de parada cardíaca o taquicardia ventricular, historia familiar de muerte súbita, taquicardia ventricular en la monitorización (Holter), hipertrofia masiva (>30mm), síncope o hipotensión secundaria al ejercicio físico.

Recientemente, la Asociación Americana del Corazón en colaboración con la fundación del Colegio Americano de Cardiología AHA /ACCA ha diseñado recientemente una guía en la que se establecen los criterios para la estratificación del riesgo de MSC (Gersh y cols., 2011) En ella se establecen 3 recomendaciones básicas:

- La evaluación inicial para el riesgo de MSC de todos los pacientes con MCH para detectar la presencia de fibrilación ventricular, taquicardias ventriculares, síncope, y previos MSC (en pacientes con DAI). Para los pacientes sin DAI se efectuaran revisiones periódicas para la estratificación del riesgo de forma anual o bianual.
- En aquellos pacientes que tras la evaluación inicial del riesgo MSC con los parámetros de riesgo convencionales quedasen al límite del riesgo debería evaluarse también la implantación del DAI.
- No se utilizará de rutina la electrofisiología invasiva para la estratificación del riesgo en pacientes con MCH.

Teniendo en cuenta estas recomendaciones básicas, la AHA/ACCA establece la los niveles de recomendación para la implantación de DAI en los pacientes con MCH desde **muy recomendado** para pacientes con parada cardíaca, fibrilación ventricular o taquicardia ventricular, hasta **perjudicial** (implantación del DAI sin la evaluación de riesgo de MSC), pasando por la **recomendación razonable** (DAI en pacientes con grosor septal > 30 mm o historia personal de uno o varios episodios de síncope). Se describe también la **utilidad** del mismo en pacientes menores de 30 años, con taquicardias ventriculares no sostenidas y la presencia de otros factores de riesgo de MSC o en pacientes con MCH de cualquier edad, que teniendo otros factores de riesgo tengan una repuesta (Gersh y cols., 2011).

5. Anatomía patológica y bioquímica analítica de la MCH.

Donald Teare describió “unos extraños reordenamientos de la fibra muscular”. Esta desorganización miofibrilar es muy evidente en la MCH pero también puede observarse en menor magnitud en situaciones de hipertrofia secundaria y en la enfermedad coronaria. Esta desorganización miofibrilar suele aparecer tanto en el septo como en la pared ventricular izquierda, y dificulta la transmisión del impulso nervioso contribuyendo a la arritmogénesis.

Otra característica principal en la evolución de la MCH es la aparición de fibrosis, aumento patológico de la cantidad de tejido conectivo, que podría ser el resultado de episodios previos de isquemia miocárdica tras los cuáles los cardiomiocitos muertos son reemplazados por fibroblastos. Se ha descrito que la tasa de proliferación de fibroblastos se incrementa de forma paulatina tanto en ratones portadores de mutaciones en *MYH7* como en pacientes con MCH (Teekakirikul y cols., 2010). A diferencia de lo que ocurre en las enfermedades cardiovasculares de origen isquémico, la apoptosis en la MCH se produce de una manera escalonada y ordenada, siendo poco frecuentes los fenómenos necróticos. Por otro lado, se han descrito áreas de isquemia miocárdica en estudios post-mortem en corazones de enfermos de MCH, sobre todo, en aquellos que presentaban estadios avanzados de la enfermedad. Además, estas autopsias revelaban anomalías estructurales en las arteriolas intramurales, lo que conllevaría una disfunción en la capacidad vasodilatadora de las mismas y como consecuencia tendría lugar una hipoperfusión miocárdica, lo que disminuiría el aporte de oxígeno a las células cardíacas que finalmente contribuiría a la generación de áreas isquémicas miocárdicas. Esto, sumado a otros factores que aparecen exacerbados en las últimas fases de la MCH, como el aumento de la presión de sobrecarga y la disminución de la presión de perfusión, hacen que los fenómenos isquémicos sean más frecuentes en las fases más avanzadas de la MCH. (Maron y cols., 2009)

Dado que los marcadores séricos como las Troponinas cardíacas circulantes son útiles para el diagnóstico de la enfermedad isquémica, se han llevado a cabo numerosos intentos de utilizar estos y otros marcadores cardíacos para diagnosticar y estratificar la MCH. Debido a las diferencias pato-fisiológicas existentes entre los estadios tempranos y tardíos de esta enfermedad, la búsqueda de marcadores cardíacos para la misma es una tarea ardua, ya que marcadores específicos de estadios tardíos en los que hay una mayor

extensión de fenómenos fibróticos o isquémicos no servirían como marcadores de fases precoces.

En la MCH la isquemia se ha relacionado con hipertrofias severas, desorganización miocítica extensa, o alteraciones en los vasos coronarios pequeños (Olivotto y cols., 2006). Los miocitos dañados podrían liberar sus contenidos celulares a la sangre, y podrían ser detectados en el plasma como marcadores indicativos de procesos hipertróficos, en esta línea se ha descrito una mayor concentración de hs- TnT plásmatica en un elevado porcentaje (70%)pacientes con MCH pertenecientes al grado funcional NYHA III- IV, sin embargo, en pacientes con categorías funcionales NHYA< III este porcentaje disminuía considerablemente (37%) (Moreno y cols., 2010). También se ha visto que los niveles séricos del factor de von Willenbrand (vWF) correlacionaban con diferentes condiciones asociadas a la severidad de la MCH como son la presencia de fibrilación atrial, la clase funcional, y obstrucción al tracto de salida. Por otro lado, se ha comprobado la relación entre los niveles de cardiotrofina 1, y el grosor ventricular en pacientes de MCH(Cambronero y cols., 2010; Kawahara y cols., 2011; Monserrat y cols., 2011). En resumen, se han encontrado marcadores plasmáticos de etapas tardías que serían de utilidad para el pronóstico de la MCH pero, a día de hoy, no existe un marcador molecular que se pueda aplicar para el diagnóstico precoz de la MCH.

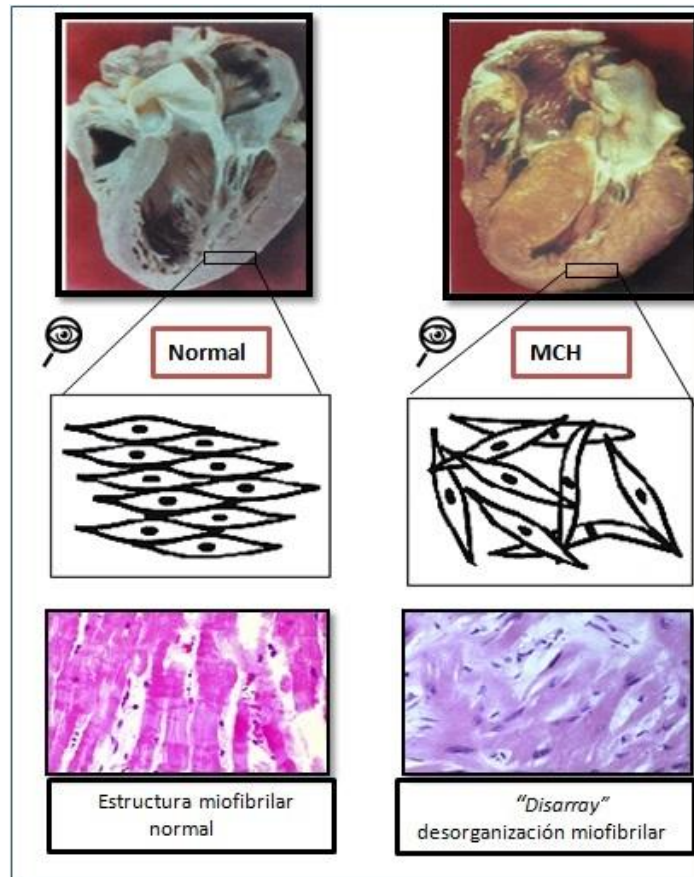


Figura 2. Representación macro y microscópica de un corazón normal (izquierda) frente a un corazón con MCH(derecha).En la parte inferior se muestra un esquema y tinción de hematosina-eosina de los cardiomiocitos , se puede observar que el corazón normal presenta una organización miofibrilar normal y el corazón con MCH muestra una clara desorganización miofibrilar (Imágenes tomadas de (Chung y cols., 2003))

6. Genómica y proteómica de la MCH.

Los estudios genómicos y proteómicos en tejidos de pacientes con MCH han evidenciado la sobreexpresión de genes/proteínas como *ANP*, *TGFβ*, calsecuestrina. Otros, como la elastina y la ATPasa dependiente de Ca^{++} se encontraban sub-expresados con relación a tejido sano. Este patrón de expresión en el corazón hipertrofico podría responder al efecto *compensador* del defecto contráctil caracterizado por el aumento del tamaño miofibrilar en un intento por mantener las demandas funcionales del corazón. En general, la hipertrofia cardiaca se caracteriza por la reactivación de genes que siendo activos en el corazón fetales están silenciados en el adulto, como los de los factores natriuréticos, *MYH6*, y factores de transcripción como GATA 4, GATA6, MEF2A, NFAT, CxX-Nkx-2-5etc. Estos últimos han sido ampliamente estudiados en la MCH, y se ha comprobado que los factores GATA- 4, GATA- 6 y MEF2-A regulan de forma

activa la respuesta hipertrófica, induciendo el crecimiento hipertrófico de los miocitos, sin embargo los factores HAND2 y, CxX- Nkx-2-5 participan en la activación pero no tienen la capacidad de inducir por sí mismos el crecimiento hipertrófico miofibrilar. (Lim y cols., 2001; Akazawa y cols., 2003; Harvey y cols., 2011). Otras células cardíacas como los fibroblastos desempeñarían un papel relevante en procesos como la fibrosis. Así, en ratones con mutaciones en la α -miosina se produce una activación y liberación de TGF- β , lo que provoca la aparición de fibrosis intersticial (Teekakirikul y cols., 2010).

7. Epidemiología de la MCH

La MCH afectaría a 1/500 hombres y 1/1.000 mujeres (Maron y cols., 1995). Se han descrito frecuencias ligeramente más alta y más bajas en algunas poblaciones (Zou y cols., 2004). Se trata de la enfermedad cardíaca hereditaria más frecuente, aunque hasta 1995 fue considerada una enfermedad rara.

La incidencia de esta enfermedad podría ser mayor de lo estimado si consideramos el porcentaje de personas que pueden ser portadoras de alguna mutación en un gen implicado en la MCH. Recientemente, en un análisis de varios genes sarcoméricos en las cohortes *Fragmingham* y *Jackson Heart* se hallaron posibles mutaciones (cambios de aminoácidos) en un 0,6 % de los participantes. Aunque estos sujetos de la población general no tenían síntomas de la enfermedad, el análisis ecográfico mostró en varios HVI leve. De este estudio podría inferirse que la frecuencia de portadores de mutaciones duplicaría a la estimada hasta ahora, basada en casos con enfermedad manifiesta (Bick y cols., 2012). Esto debe ligarse al concepto de penetrancia variable, ya que la misma mutación puede dar síntomas en una persona y no en otra (que no sería identificada como afectado). Esta situación es menos probable a edad avanzada, ya que la penetrancia aumenta con la edad.

La MCH tiene un gran impacto social por ser la primera causa de muerte súbita en deportistas jóvenes, y es una de las causas frecuentes de la muerte súbita a edad temprana (Suarez-Mier y cols., 2002; Moak y cols., 2012).

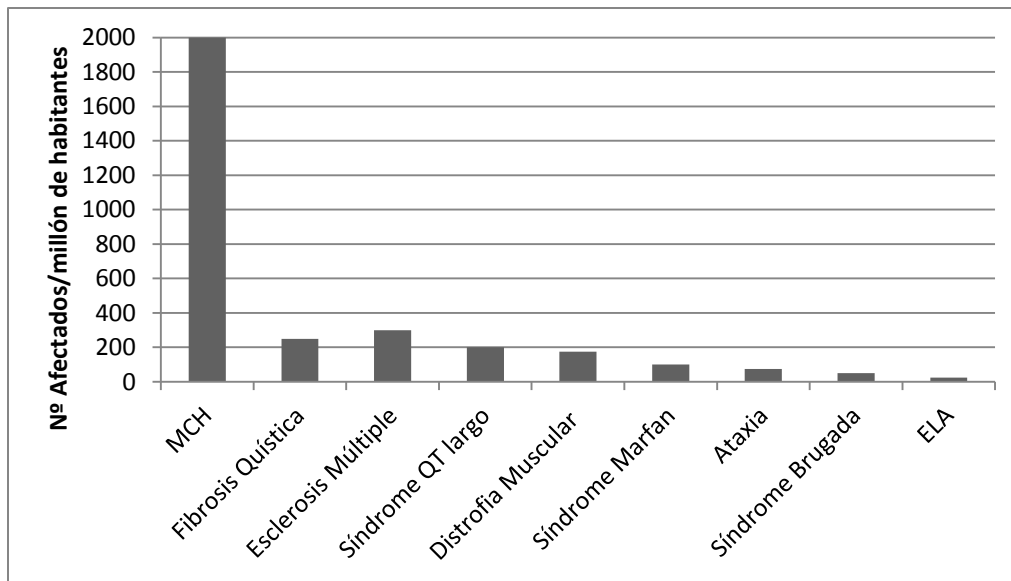


Figura 3. Prevalencia de la Miocardiopatía Hipertrófica (MCH) comparada con otras enfermedades hereditarias ELA: Esclerosis lateral amiotrófica (modificado de Maron y cols. 2010).

8. Genes y mutaciones en MCH.

La MCH se considera una enfermedad mendeliana con herencia autosómica y dominante, en la que los genes implicados codifican proteínas de la maquinaria contráctil del sarcómero (figura 4). La primera mutación relacionada con la MCH fue p.R403>Q en el gen *MYH7*, que codifica la cadena pesada de la β -miosina cardiaca (la principal proteína contráctil del sarcómero). Hasta hoy, se han descrito centenares de mutaciones en varios genes, todos ellos codificantes de proteínas estructurales o reguladoras de la contracción sarcomérica. Los genes más frecuentemente mutados (alrededor del 50 % de los casos) son *MYH7* y *MYBPC3* (**Tabla 1**).

Se han descrito más de 20 genes relacionados con la MCH, aunque aproximadamente en la mitad de los pacientes no se ha hallado ninguna mutación, por lo que gran parte de la base genético/mutacional de la MCH permanece por descubrir. En este ámbito debemos considerar varios aspectos:

-Las mutaciones pueden estar en un gen ya conocido, pero fuera de las regiones que se analizan. Los estudios genéticos se limitan a la secuencia codificadora (exones) y unas pocas bases intrónicas flanquantes. Un paciente podría tener una mutación en zonas reguladoras de la expresión (promotor, secuencia 3'UTR) o en bases internas de los intrones.

-Las mutaciones están en genes aún no relacionados con la MCH. En muchos pacientes en los que se han analizado todos los genes conocidos no se hallaron mutaciones. Esta situación es más probable en casos esporádicos, en los que los genes implicados podrían estar relacionados con una “penetrancia” reducida, pero también se ha descrito en familias con varios afectados. Muchos de estos genes se identificarán en los próximos años mediante secuenciación del genoma completo de los pacientes, una aproximación experimental que ya ha permitido identificar nuevos genes en familias con MCD (Frey y cols., 2012).

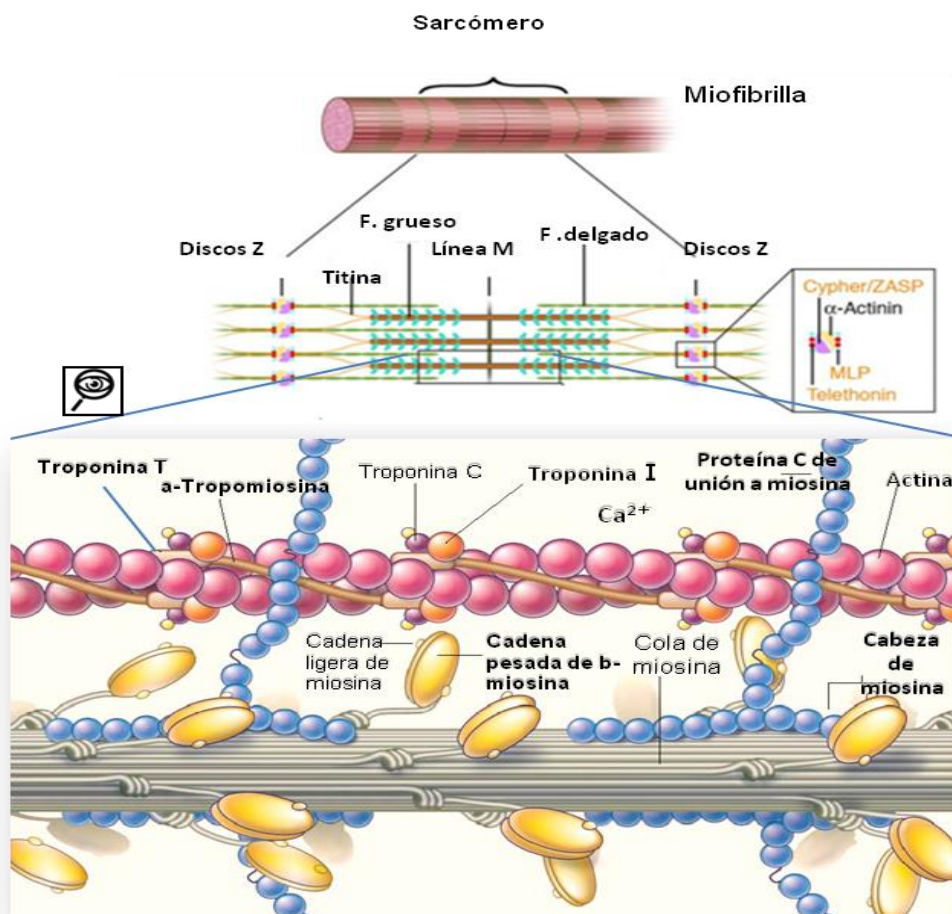


Figura 4. Estructura del sarcómero cardíaco, con las proteínas cuyos genes se han hallado mutados en pacientes con MCH (adaptada de Seidman y cols. 1995 y Morita y cols. 2005).

La actina y las troponinas C, T e I componen los filamentos finos, y los filamentos gruesos están formados por la cadena pesada de la miosina, las cadenas reguladoras y esenciales de miosina, la proteína C de unión a la miosina y la titina. El sarcómero se ancla a los discos Z a través de la titina y la actina. Los discos Z están compuestos por alfa actinina, calsarcina 1, MLP, telotonina y ZASP.

Tabla 1. Genes más frecuentemente mutados en pacientes con MCH. (Sombreados en gris los incluidos en el protocolo de análisis de nuestro laboratorio)

Gen	cromosoma	Proteína	Función en el sarcómero	% mutaciones
<i>MYH7</i>	14q12	Cadena pesada de la β -miosina cardiaca (β -MHC)	Filamento grueso (motora)	25%
<i>MYBPC3</i>	11q11	Proteína C de unión a miosina	Estructural	25%
<i>TNNT2</i>	1q32	Troponina T cardiaca (cTnT)	Filamento fino (reguladora)	5%
<i>TNNI3</i>	19q13	Troponina I cardiaca (cTnI)	Filamento fino (reguladora)	5%
<i>TPM1</i>	15q22.1	α -tropomiosina (α -TM)	Filamento fino (reguladora)	1%
<i>ACTC</i>	15q11-q14	α -actina cardiaca	Estructural	Raro
<i>MYL2</i>	12q23-p24	Cadena ligera reguladora de la miosina (MLC1)	Filamento grueso (motora)	Raro
<i>MYL3</i>	3p21.3-p21.2	Cadena ligera esencial de la miosina (MLC2)	Filamento grueso (motora)	Raro
<i>MYOM2</i>	8p23.3	Miomesina	Estructural Línea M.	Raro
<i>MYH6</i>	14.q11.2-q12	Cadena pesada de alfa miosina cardiaca	Grueso (estructural)	Raro
<i>ACTN2</i>	1q42-q43	Alpha actinina 2	Estructural	Raro
<i>CSRP3</i>	11p15.1	Proteína LIM del musculo liso	Estructural	Raro
<i>LBD3</i>	10q22.2-q23.3	Dominio de unión a LIM	Estructural	Raro
<i>MYOZ2</i>	4q26-q27	Myozenina 2	Estructural	Raro
<i>TCAP</i>	17q12-q21.1	Telotonina	Estructural	Raro
<i>VCL</i>	10q22.1-q23	Vinculina	Estructural Citoesqueleto	Raro
<i>JPH2</i>	20q13.12	Junctofilina	Uniones entre canales de Ca^{2+}	Raro
<i>PLN</i>	6q22.1	Fosfolamban	Recaptación Ca^{2+}	Raro
<i>CALR3</i>	19p13.11	Calreticulina 3	Almacenamiento de Ca^{2+}	Raro

Alrededor del 5% de los pacientes con MCH serían portadores de dos mutaciones en los mismos o en diferentes genes sarcoméricos. Se han descrito casos raros homocigotos para

una mutación, y algunos con tres mutaciones. Estos pacientes doble o triple portadores manifiestan una forma más severa de la enfermedad con un riesgo alto de MSC. (Ingles y cols., 2005) Se han hallado mutaciones de todos los tipos posibles: sin sentido (*missense*), cambios en la pauta de lectura (*frameshift*) debidos a deleciones o inserciones de pocas bases, y mutaciones de ajuste (*splicing*) por cambios en los intrones. En el gen *MYH7* la mayoría de las mutaciones son cambios de un aminoácido por otro, mientras que en *MYBPC3* son frecuentes las deleciones en la secuencia codificadora y las mutaciones intrónicas de ajuste.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar el efecto patogénico de las mutaciones y su efecto dominante:

- Péptido tóxico: la proteína mutada se incorporaría al sarcómero interfiriendo con su función. Sería característico de los cambios de aminoácido.
- Haploinsuficiencia: no se produce proteína mutada por un mecanismo de degradación durante el procesamiento del pre-mRNA. La reducción de la cantidad de proteína normal comprometería la función sarcomérica.

Los estudios con ratones genéticamente modificados (*knockout* y *knock in*) han demostrado alteraciones moleculares inducidas por las mutaciones en tres niveles:

- Desplazamiento actina – miosina (Sweeney y cols., 1994).
- Actividad ATPasa (Sweeney y cols., 1994)
- Alterando la sensibilidad al Ca^{2+} de la ATPasa (Rust y cols., 1999)

9. Relación fenotipo-genotipo.

Aunque hay algunas mutaciones recurrentes como R403Q en *MYH7* y R92Q en *TNNT2*, una característica de la MCH es que la mayoría de las mutaciones que se han descrito hasta el momento son *privadas*; es decir, exclusivas de cada familia. Este grado de heterogeneidad mutacional dificulta estudiar la relación entre una mutación y el fenotipo. Del análisis de miles de pacientes/familias parece concluirse que las mutaciones en *MYH7* tienden a dar formas severas comparadas con las mutaciones en *MYBPC3*, que suelen ser más benignas (Arad y cols., 2002). Los portadores de algunas mutaciones en *TNNT2* pueden manifestar hipertrofia ligera o incluso ausencia de hipertrofia, pero un riesgo alto de MSC. Con todo, no se ha podido establecer de forma inequívoca una relación entre un gen mutado o una mutación concreta y el fenotipo, por lo que no es recomendable el simple dato genético para tomar decisiones como implantar un DAI.

10. Genes modificadores del fenotipo.

A pesar de que la MCH es una enfermedad monogénica, al fenotipo final pueden contribuir otros genes implicados en la fisiopatología cardíaca. Entre los candidatos más estudiados están los del sistema renina- angiotensina- aldosterona (SRAA) y las oxido nítrico-sintasas. En general, cualquier gen codificador de proteínas con un papel demostrado en la enfermedad cardiovascular sería un candidato a modular el fenotipo en la MCH.

Estudios GWA (*Genome wide association*) han permitido identificar loci/genes candidatos, como *Slit*, *SRF*, *KNB2*, *HSPA* (**Tabla 2**).

Tabla 2. Posibles genes modificadores del fenotipo en la MCH.

<i>Gen</i>	Proteína codificada	Polimorfismo	Efecto	Referencias
<i>ECA</i>	Enzima convertidor de angiotensina	I/D intrón 16	DD, mayor transcripción mayor nivel sanguíneo.	(Schunkert y cols., 1994)
<i>AGT</i>	Angiotensinógeno	M235T(T/C)	CC, mayor transcripción génica mayor nivel sanguíneo de AGT	(Ishanov y cols., 1997)
<i>AGTRI</i>	Receptor de Angiotensina 1	1166 A/C	Más niveles de ATR1	(Coto y cols., 2010; Ceolotto y cols., 2011)
<i>EDNI</i>	Endotelina 1	-1224A/198K haplotipo	Homocigotos AA/KK OR=2,10 de MCH.	(Castro y cols., 2007)
<i>CMA</i>	Chymasa 1	-1903 A/G	Homocigotos AA peor pronóstico	(Belenkov y cols., 2010)
<i>CYP11b2</i>	Citocromo P450 polipeptido 2	-344C/T CYP11B2	Homocigotos CC severidad del LVH.	(Belenkov y cols., 2010)
<i>ESRI</i>	Receptor de estrógenos 1	Repeticiones CAG A/G promotor Rs6915267,	Menor número de repeticiones CAG se ha asociado con un mayor grosor de la pared. AA, menor grosor de la pared	(Lind y cols., 2008)
<i>SLIT2</i>	Proteína homóloga a Slit de <i>Drosophila</i>	Rs1379659	Mayor dimensión del VI	(Vasan y cols., 2007)
Genoma mitocondrial	-----	Haplogrupo T, Polimorfismo G13368A	AA, mayor riesgo de MCH,	(Castro y cols., 2006)

11. MicroRNAs y regulación de la expresión génica.

Los microRNAs (miRNAs) son ARNs de 20-25 nt que modulan la expresión génica uniéndose de forma complementaria a las zonas 3'UTR de los ARN mensajeros (mRNAs). Esta unión induce un proceso de degradación de los mRNAs, por lo que los miRNAs actúan como reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los miRNAs fueron descubiertos en *Caenorhabditis elegans* en un cribado genético en busca elementos génicos controladores del desarrollo. El gen *lin-4* de *C. elegans* se transcribía en RNAs pequeños (61 y 22 nucleótidos) y el más largo era precursor del más corto. Éste era complementario de la región 3'UTR del gen *lin-14*, cuya expresión era regulada por *lin-4* (Ambros 1989)

Los miRNAs están codificados por secuencias de ADN de regiones intergénicas y tendrían sus propios promotores y secuencias reguladoras de la expresión. Pero también pueden localizarse en intrones de genes que codifican proteínas (**figura 5**). En estos casos la expresión del miRNA suele estar regulada por el mismo promotor de su gen hospedador. Por último, los hay en exones no codificantes de algunos genes. En cuanto a la secuencia que los codifica los miRNAs pueden ser *monocistrónicos* o *policistrónicos*. En los primeros, tras la transcripción por la RNA pol II el pri-miRNA es procesado para dar un solo pre-miRNA, mientras que en los segundos un único pri-miRNA da lugar a varios pre-miRNAs (**figura 6**).

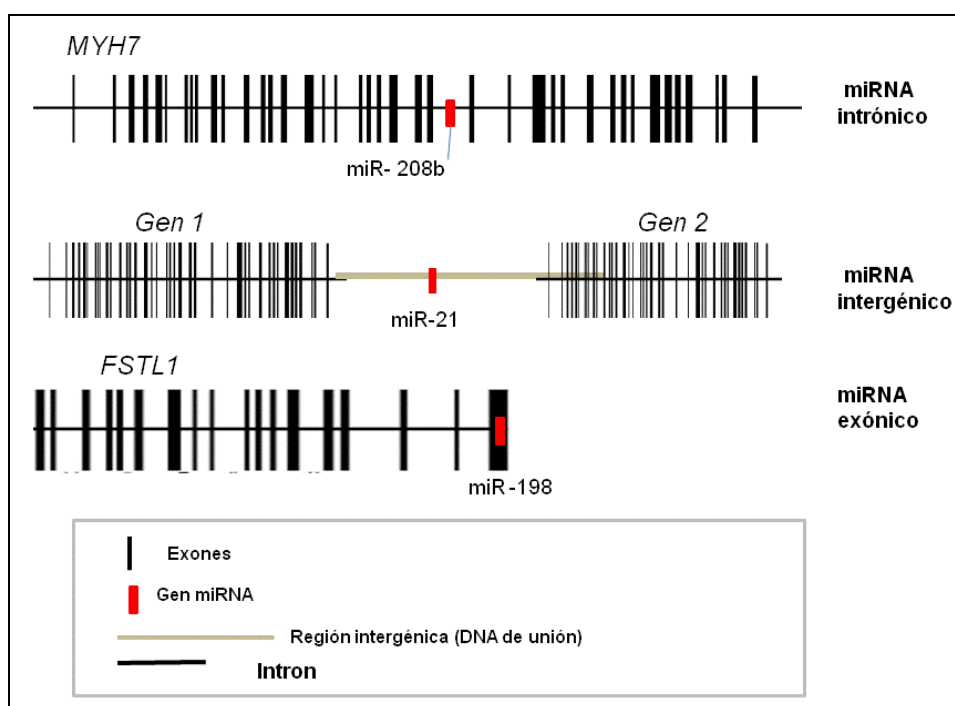


Figura 5. Tipos de miRNAs según su codificación en el genoma. MiR-208b se localiza en un intrón del gen *MYH7* que codifica la β -miosina; miR-21 en una región intergénica; miR-198 en un exón no codificante del gen *FSTL1* que codifica la frp (proteína relacionada con la folistatina).

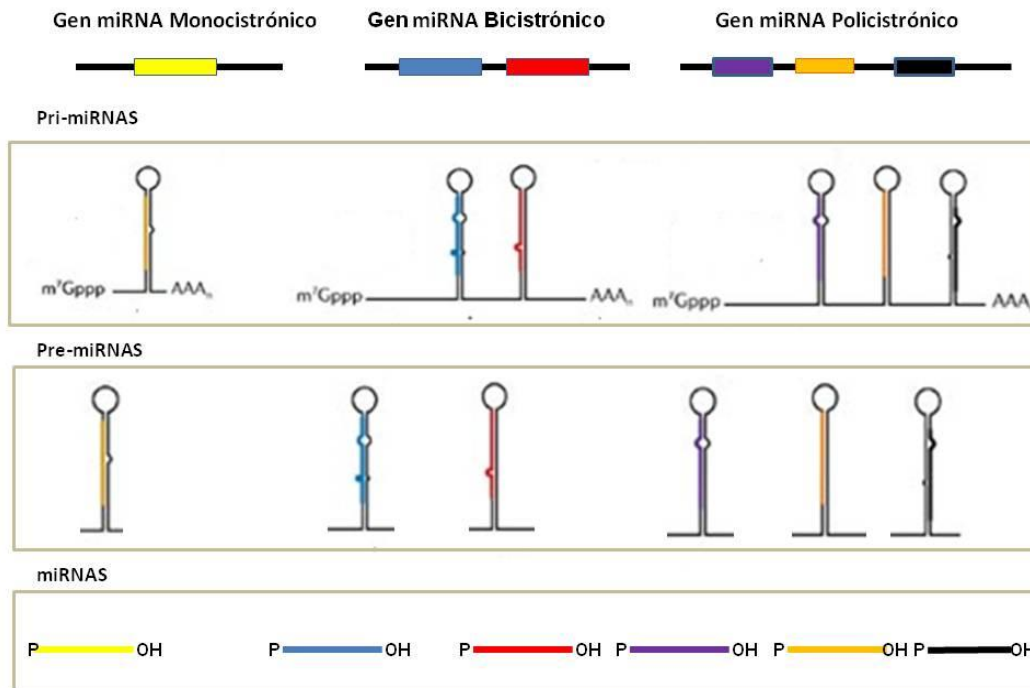


Figura 6. Tipos de miRNAs según su secuencia codificadora. Representación de los miRNAs monocistrónicos, bicistrónicos y policistrónicos.

Los miRNAs se sintetizan en el núcleo a partir de un precursor (pri-miRNA) que se transcriben a partir de la secuencia de ADN mediante la RNA polimerasa II. El pri-miRNA es procesado por la RNasa III Drosha y su proteína de unión a RNA de doble hebra (Pasha, en *Drosophila*; DGCR8 en hombre) para dar el pre-miRNA, de 70-90 bases. El pre-RNA es exportado al citoplasma a través de las proteínas RAN-GTP y exportina 5. Los pre-miRNAs tienen una estructura característica, en forma de horquilla en la que parte de las bases son complementarias y forman un tramo de doble hebra. Una vez en el citoplasma un complejo de DICER (endonucleasa RNAIII), y las proteínas TRBP y PACT degrada los nucleótidos en hebra sencilla quedando una doble hebra de ARN que se denomina RNA dúplex. Por último, una de las dos hebras (la menos estable energéticamente) es degradada y la resultante (el miRNA) se incorpora al complejo RISC (RNA induced silencing complex) (He y cols., 2004). El miRNA maduro monocatenario reconoce una secuencia complementaria en el mRNA y se une a éste, “señalándolo” para su degradación o inhibición de la expresión por el RISC (Flynt y cols., 2008) (**Figura 8**).

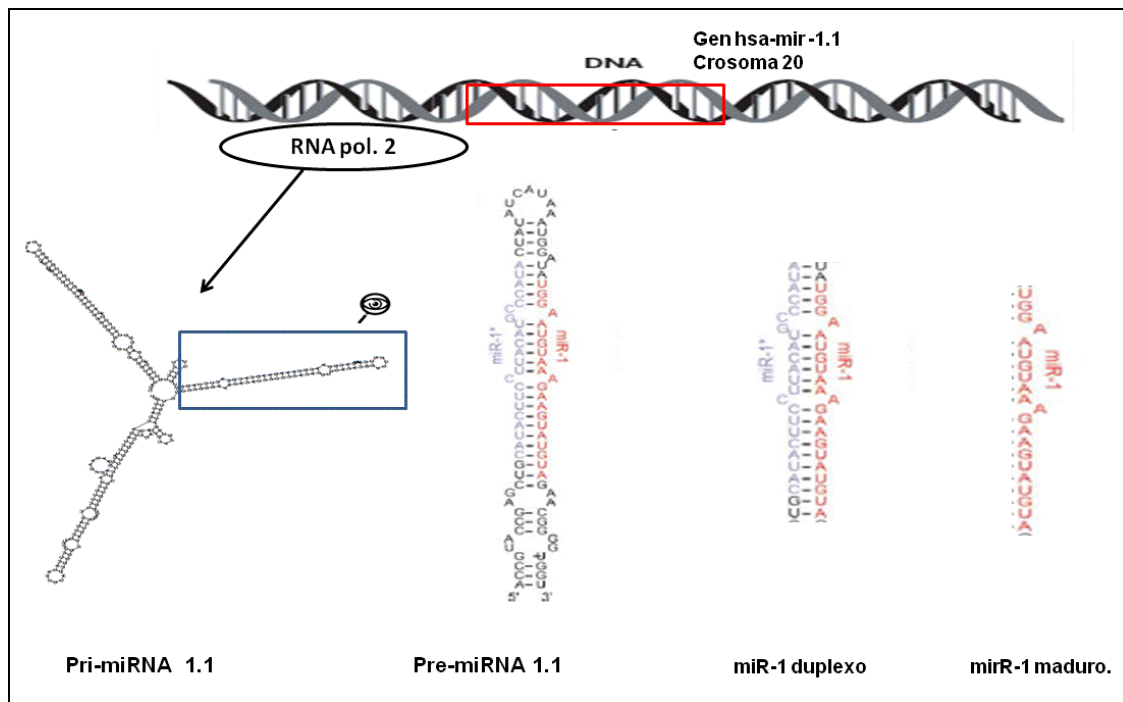


Figura 7. Fases del proceso de síntesis de los miRNAs. En este caso se representa el proceso del miR-1.1. El gen será transcrito a RNA por la RNA polimerasa II dando lugar al pri-miRNA, (se representa la estructura secundaria) éste será procesado por la nucleasa Droscha para dar lugar al pre-miRNA, que a su vez será transformado por Dicer miRNA-duplexo mediante la escisión de los nucléotidos de cadena sencilla. A partir de esta estructura en duplexo se genera el miRNA maduro monocatenario.

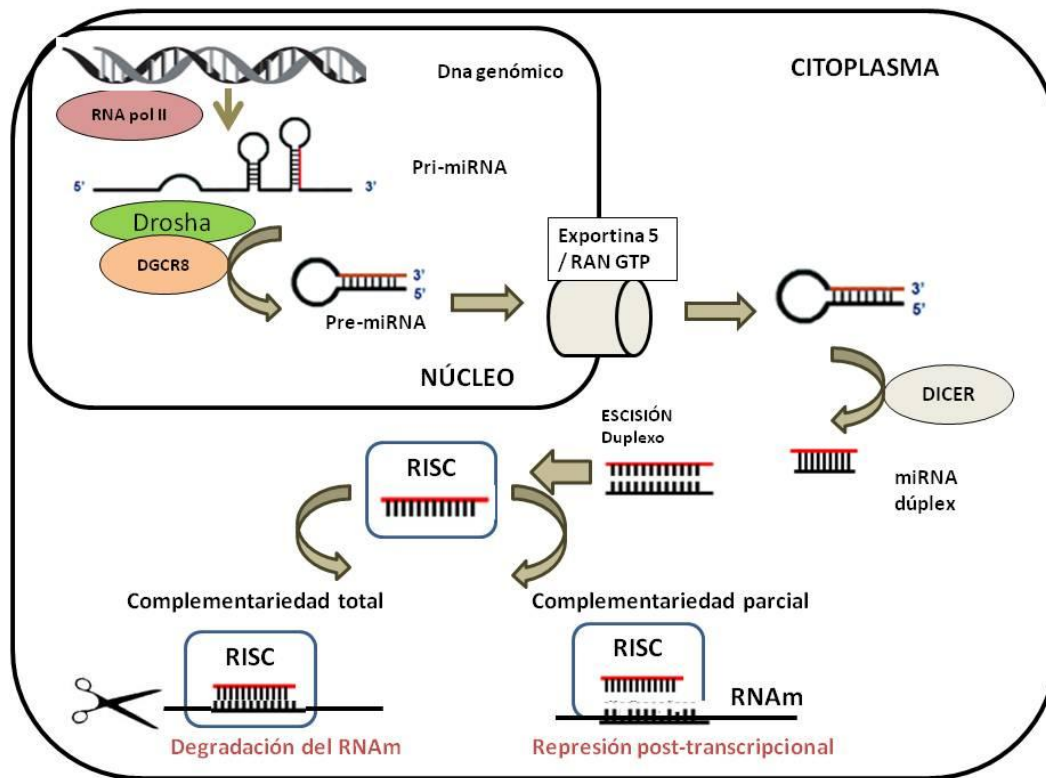


Figura 8. Biogénesis de los miRNAs y mecanismo de regulación post-transcripcional, según la complementariedad con sus mRNA diana.

La unión miRNA-mRNA tiene lugar a través de sólo 6-8 bases consecutivas. Esta secuencia del miRNA se ha denominado región *semilla* (*seed region*). Cada miRNA puede reconocer y unirse a varios mRNAs, y la secuencia 3' UTR de cada mRNA contiene dianas para varios miRNAs. Para estudiar las posibles dianas (mRNAs) de los miRNAs se han desarrollado algoritmos basados en criterios como el número de bases complementarias entre la región semilla del miRNA y el mRNA y la energía libre de la doble hebra miRNA-mRNA (Rajewsky 2006).

El patrón de expresión de los miRNAs varía entre los diferentes estadios del desarrollo de un tipo celular, lo que contribuye a definir el perfil de expresión proteica. Cada tipo celular/tejido se caracteriza por la expresión de miRNAs concretos, que determinan qué proteínas se expresan (o regulan sus niveles) en un tejido normal. En los tejidos patológicos se han descrito alteraciones de la expresión de muchos de esos miRNAs, que podrían emplearse así para la caracterización patológica de las enfermedades. Aunque hay datos de la relevancia de los miRNAs en el origen y/o progresión de la mayoría de las enfermedades humanas, es el campo de los tumores donde han alcanzado mayor

relevancia por su papel en el origen del cáncer y la regulación de procesos como las metástasis (Tavazoie y cols., 2008)

12. MiRNAs y cáncer.

Las primeras asociaciones entre miRNAs y patología se describieron en el ámbito del cáncer y más en concreto en la leucemia linfocítica crónica (LLC), donde se halló que los genes miR-15a y miR-16a estaban ausentes en los pacientes. Más tarde se descubrió que los miR-15 y miR-16 tenían como diana la proteína antiapoptótica Bcl2, y la ausencia de los mismos contribuiría a la proliferación tumoral (Calin y cols., 2002; Cimmino y cols., 2005). Muchos genes que codifican miRNAs se localizan próximos a regiones cromosómicas asociadas al cáncer, por lo que su pérdida o ganancia explicaría que esos miRNAs actúen como oncogenes o como supresores de tumores (Calin y cols., 2004; Hayashita y cols., 2005; Dews y cols., 2006). Por otro lado, algunos oncogenes y genes supresores de tumores actúan como factores de transcripción para el gen que codifica el miRNA (Corney y cols., 2007; Hermeking 2007).

Estas evidencias impulsaron estudios de expresión de miRNAs comparando tejido tumoral y sano, estableciéndose en muchos casos lo que constituiría la “*firma de miRNAs*” específica de cada tumor (Volinia y cols., 2006). Estos miRNAs sobrerrepresentados en el tejido tumoral pueden ser detectados en la sangre de los pacientes estando ausentes en sujetos sanos, por lo que serían útiles como marcadores para diagnosticar el tumor o valorar su pronóstico y/o respuesta a un tratamiento. Por ejemplo, el miR-21 sería un marcador de diagnóstico temprano de cáncer de pulmón de células no pequeñas. La presencia del miR-141 en sangre sería un factor independiente de mal pronóstico en enfermos de cáncer de colon. Mir-21 podría emplearse para detectar tratamiento refractario al Docetaxel en el Cáncer de Próstata (Cheng y cols., 2011; Wei y cols., 2011; Zhang y cols., 2011).

En este sentido, los miRNAs tienen una característica que les hace atractivos como posibles marcadores biológicos sanguíneos de los procesos patológicos: su estabilidad molecular. Son resistentes a las RNAsas (comparados con ARNs de mayor tamaño, como el mRNA) y a condiciones extremas de pH y temperatura. Para su cuantificación pueden emplearse técnicas de *microarray* o de PCR en tiempo real (Gilad y cols., 2008).

13. MicroRNAs y fisiopatología cardiaca.

El papel de los miRNAs en el desarrollo de alteraciones cardiovasculares fue puesto de manifiesto a partir de los estudios con ratones *knockout* para los enzimas Dicer y Drosha (Chen y cols., 2008). Estos animales desarrollaban miocardiopatía dilatada y una expresión aberrante de proteínas cardíacas. Una característica del patrón de expresión de miRNAs en el tejido hipertrófico es que se asemeja al del corazón fetal (Thum y cols., 2007). Esto coincide con la observación de una “regresión” al patrón de expresión fetal observado para muchos mRNA y proteínas. Varios estudios posteriores han identificado miRNAs concretos implicados en el desarrollo cardíaco, muchos de los cuales se expresan de forma anómala en la hipertrofia ventricular. Estos miRNAs son conocidos como myoMIRS (tabla 3). Entre ellos destacan los de las familias miR-1, miR-133, y miR-208 (Schroen y cols., 2009).

Tabla 3. MiRNAs desregulados en la hipertrofia cardiaca.

MiRNA / Dicer DGCR8	Localización (Gen hospedador)	Evidencias de Implicación en la hipertrofia cardiaca	Dianas confirmadas funcionalmente	Referencias
1	1.1 Crom. 20 1.2 Crom. 18	Contribuye a la apoptosis de cardiomiocitos. Arritmogénico.	Hsp60, hsp70 contribuyendo a la apoptosis miocitos	(Xu y cols., 2007; Shan y cols., 2010)
133b	Crom 6. Cluster con miR-206.	Sobre-expresión de miR-133b in vitro inhibe la hipertrofia cardiaca y la supresión de miR-133b induce hipertrofia. La sobreexpresión de miR-133b resulta en una represión de la α -actina y β -miosina sin cambios en la expresión del <i>BNP</i> y del <i>ANF</i> en miocitos de rata.	Calcineurina regula el Mir 133 α actina y β miosina en miocitos de rata	(Care y cols., 2007) (Sucharov y cols., 2008; Dong y cols., 2010)
133a	miR-133 a2 cluster miR-1.1 crom 20 miR-133 a1 Cluster miR-1.2 Crom 18	MEF2A, factor de transcripción muy implicado en la patología cardiaca, regula el cluster miR-133a1-miR-1.2 durante la embriogénesis	Hand2 RhoA, Cdc42, Nelf-A/WHSC2 IGF1,SGK1,ANP, BNP	(Zhao y cols., 2005; Ji y cols., 2007; Bostjancic y cols., 2009) (Care y cols., 2007; Vo y cols., 2010)
208a	Crom 14 (intron de MYH6)	-Knockout del miR-208 reduce la hipertrofia ventricular y la fibrosis en modelos murinos. -Control fenotipo miofibrillas en ratones. -Niveles mayores de miR-208a en biopsias de miocardio de pacientes de DCM correlación con los niveles de β -miosina.	GATA4 Conexina 40 . En ratones knockout para miR-208a	(Bostjancic y cols., 2009; Callis y cols., 2009; Satoh y cols., 2010)
208b	Crom 14 (intron de Myh7)	Sobreexpresado en pacientes de DCM.	Sox6,purb,Sp3 (en-ratón) represores de β -miosina	(Corsten y cols., 2010)
499b	Crom 20(Myh7b)	Sobreexpresado en modelos murinos de cardiomiopatía.		(Matkovich y cols., 2012)

155	Crom 21.	Infraexpresado en corazón de ratas, después de 14 días de constricción aórtica para inducir la hipertrofia. El polimorfismo +1116 A/C en <i>AGTRI</i> atenúa la unión de este miRNA. Regulación de la expresión de <i>AGTRI</i> en fibroblastos.	ATR1 , polimorfismo 1116 A/C localizado en la diana para este miRNA.	(Sayed y cols., 2007; Ceolotto y cols., 2011)
195	Crom.17	La sobre-expresión de este miRNA en la hipertrofia, conduce a fallo cardíaco en ratones transgénicos.	BNCL2	(van Rooij y cols., 2006)
126	Crom.9	La delección de este miRNA produce una pérdida de la integridad de los vasos, defectos en la proliferación migración de las células endoteliales.	Spred 1 , inhibidor de la Angiogénesis.	(Wang y cols., 2008)
29	Crom 7	Antifibrótico. miR-29 reprime una serie de profibróticos como los colágenos 1 y2	Colágenos 1 y 2, Fibrillina,Elastina	(van Rooij y cols., 2008)
21	Crom17	Profibrótico. Niveles mayores de miR-21 en miocardio y plasma en pacientes con Estenosis Aórtica.	No determinadas	(Villar y cols., 2012)
23a	Crom.19	Pro-hipertrofico. Miembro de la ruta del NFATC3.	No determinadas	(Lin y cols., 2009)

Gen	Localización	Evidencias de Implicación en la hipertrofia cardiaca	Citas
DICER	14q32.13	Ratón knockout condicional: muerte prematura por MCD y fallo cardíaco	(Chen y cols., 2008)
DGCR8	22q11.21	Ratón Knockout condicional: muerte prematura por fallo cardíaco	(Rao y cols., 2009)

14. Las familias miR-1 y miR-133.

Las familias 1 y 133 están constituidas por los miRNAs miR-1.1, miR-1.2, miR-133a1, miR-133a2, miR-133b y miR-206. Los miRNAs miR-1.1 y miR-133a2 están ligados en una secuencia de ADN de unas 6 kb en el cromosoma 20 y se transcriben de forma bicistrónica en un único pri-miRNA que será luego procesado en los dos pre-miRNAs. Del mismo modo se transcriben miR-1.2 y miR-133a1 (cromosoma 18) y miR-133b y miR-206 (cromosoma 6) (**figura 9**). Tanto los miRNAs 133 a1 y 133a2 como los 1.1 y 1.2 codifican miRNAs maduros con la misma secuencia. Los miRNAs miR-133a y miR-1 se expresan en el músculo cardíaco y esquelético mientras que la de miR-133b se restringe al músculo esquelético.

La implicación de estos miRNAs en la patología cardíaca ha sido ampliamente demostrada, en primer lugar mediante estudios con *arrays* para comprobar la expresión en tejido patológico y sano. Otros estudios con modelos animales y celulares han analizado sus mecanismos de actuación y regulación fisiológica. Sayed y cols,

describieron una serie de miRNAs desregulados en la hipertrofia cardiaca; en concreto, mir-1 es abundante en tejido normal pero sus niveles se reducían desde el día 1 de la inducción de la hipertrofia mediante constricción aórtica. Esta caída del nivel de miR-1 explicaría la reactivación de varios genes que regula, como *MEF2A*, *GATA-4*, *RHO*, *CDC* y *NELFA*, conocidos pro-hipertróficos. (Ikeda y cols., 2007; Sayed y cols., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión del miR-133 era capaz de atenuar la hipertrofia inducida por endotelina o fenilefrina (Care y cols., 2007).

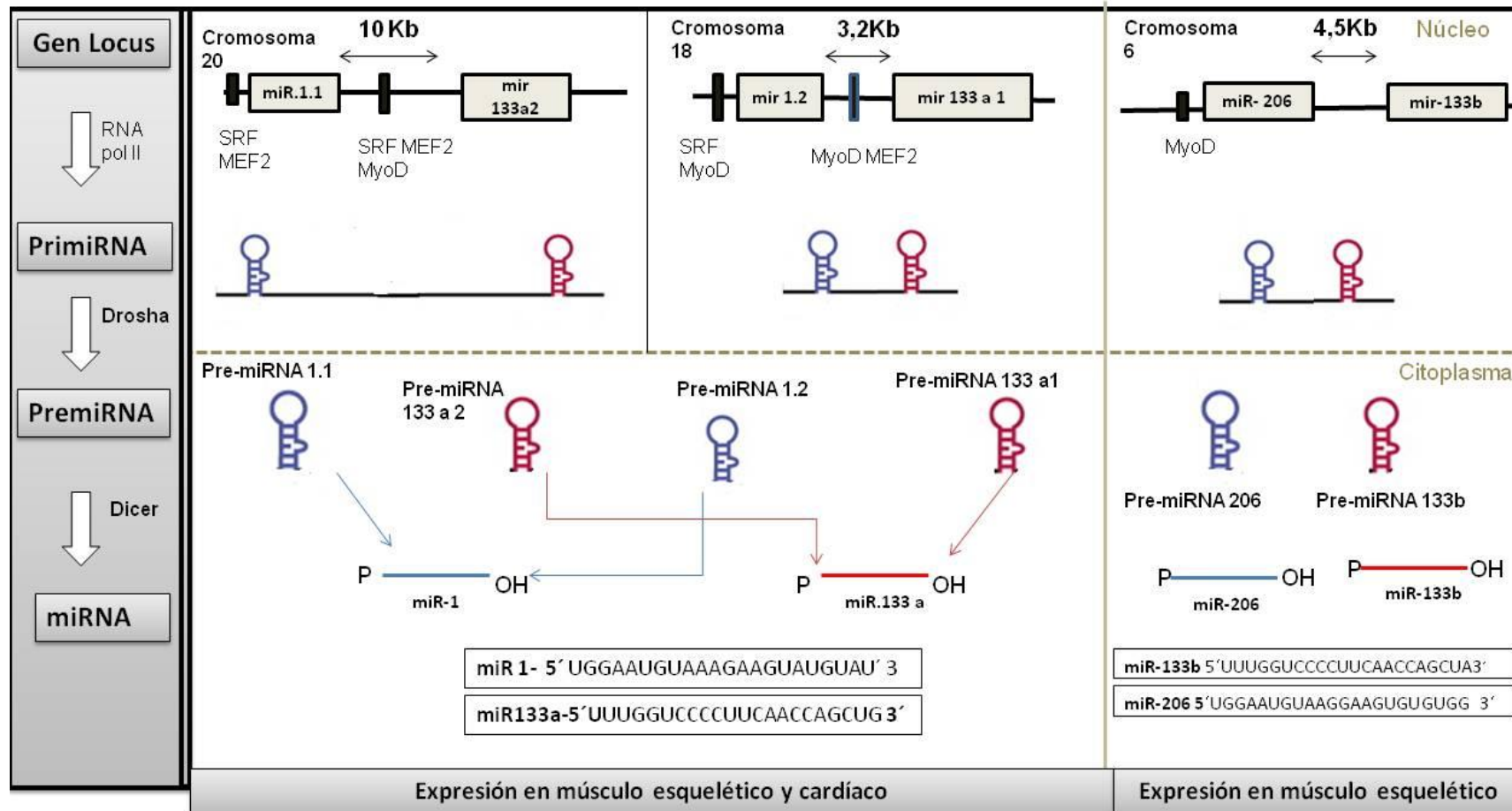


Figura 9. Esquema de los genes que codifican miRNA: 1, 133a, 133b y 206.

En humanos existen dos loci que codifican los miR-1 y miR-133a, y uno que codifica miR-133b y miR-206. Se indican las distancias entre los loci que codifican para cada transcrito bicistrónico, así como los lugares de unión a factores de transcripción.

15. La familia miR-208.

La familia 208 está compuesta por miR-208a, miR-208b y miR-499b, cada uno codificado en intrones de MYH6, MYH7, y MYH7b, respectivamente. MiR-208a y miR-208b tienen una región semilla idéntica y se diferencian únicamente en las tres bases del extremo 3' del miRNA maduro. En ratones estos miRNAs regulan el fenotipo cardiaco en respuesta a varios estímulos. Al contrario de lo que sucede en el hombre, en los ratones, la β miosina (contracción lenta) es abundante en el embrión y la α miosina (contracción rápida) predomina en el corazón adulto. En condiciones de estrés inducido por ausencia de hormona tiroidea se produce una retroalimentación positiva a favor de la expresión de fibras lentas, a través de un mecanismo dirigido por los myo-miRs (van Rooij y cols., 2009). **Figura 10.**

La sobreexpresión del miR-208a es suficiente para inducir la hipertrofia en ratones y su papel pro fibrótico también ha sido recientemente confirmado. Con estos datos la hipótesis de la inhibición artificial del miR-208 como mecanismo para evitar la hipertrofia está siendo estudiada. Aunque se ha constatado su efecto protector a corto plazo, parece que a largo plazo la depleción del miR-208 produciría defectos en la contractilidad, mediados por defectos en los factores de transcripción cardiacos como Gata4 o la Conexina 40 (Callis y cols., 2009). Pese a ello, la inyección de un anti-miR-208 en la circulación sistémica es capaz de aumentar la supervivencia durante el fallo cardiaco en ratas (Montgomery y cols., 2011). Estos estudios confirman el potencial de los miRNAs para modular la función cardiaca durante la patología cardiovascular.

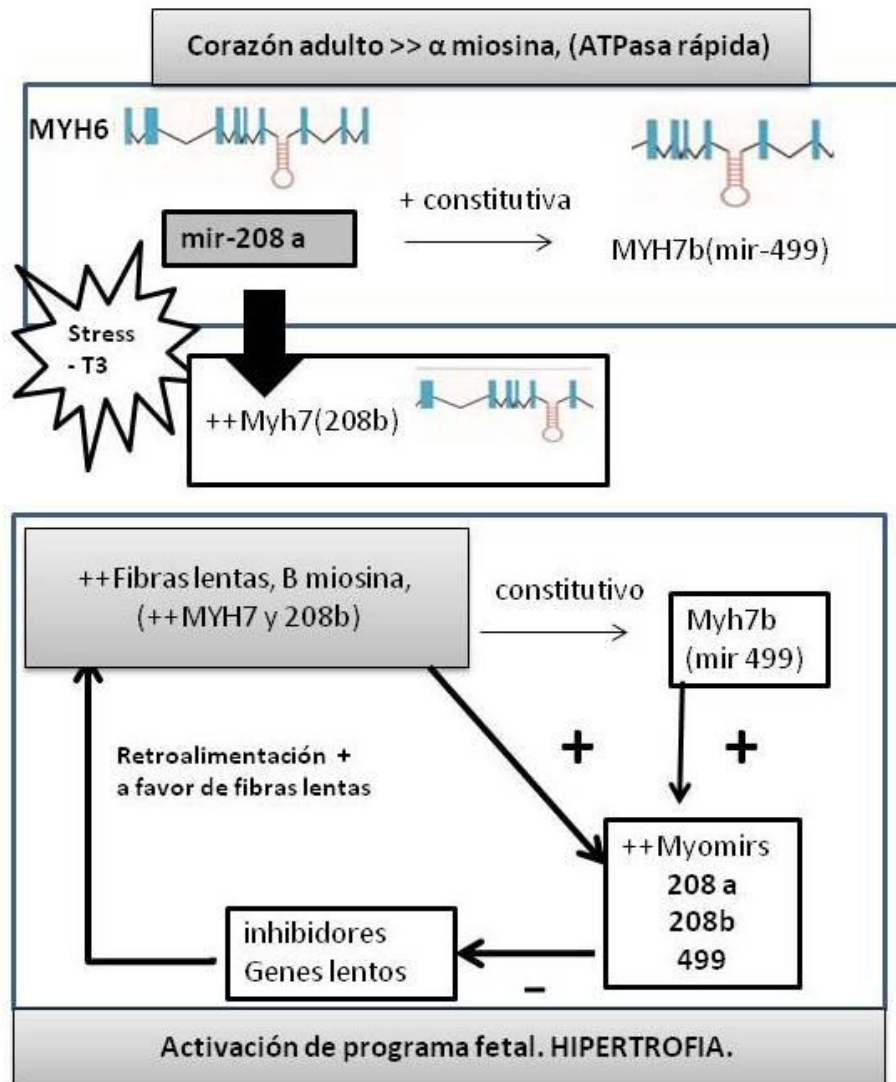


Figura 10. Mecanismo de control del fenotipo miofibrilar por los myoMIRS.

En el corazón adulto predominan las fibras de α miosina, codificadas por el gen *MYH6*, el cual hospeda al miR-208a. Este miRNA en condiciones normales (ausencia de estrés) es requerido para la activación constitutiva de *MYH7b*, que hospeda al miR-499b. Sin embargo, la activación de *MYH7* por el miR-208 no es constitutiva y requiere señales de estrés. Esta homeostasis se mantiene además, por la presencia de unos inhibidores de la expresión de *MYH7*, (inhibidores de genes lentos, como Sp3, Sox6, Tharp) que presentan dianas para myo-miRs en sus regiones 3'UTR. La inducción de estrés desencadena la activación por el miR-208 a del gen *MYH7*, en el cual reside el miR-208b, que es capaz de bloquear a los inhibidores de genes lentos. Esto resultará en una retroalimentación positiva a favor de las fibras lentas, conduciendo a la hipertrofia cardíaca (Adaptado de van Rooj y cols. 2009).

16. Otros miRNAs en la MCH.

Un estudio con 428 miRNAs en 25 tejidos cardiacos de pacientes con Miocardiopatía Dilatada (MCD), 19 con cardiopatía isquémica, 13 hipertróficos por hipertensión, y 10 controles sanos ha sugerido la posibilidad de predecir el tipo de patología en base al perfil de expresión de miRNAs. MiR-214 estaba aumentado en las tres condiciones patológicas. MiR-1 se mantendría subexpresado en los tres, mientras que no se hallaron diferencias para miR-133a y miR-133b entre los tejidos patológicos y sanos (Ikeda y cols., 2007). La sobreexpresión de miR-195 y subexpresión de miR-133b y miR-92 podría ser característica de la MCD (comparada con el tejido sano) (Sucharov y cols., 2008).

Podemos concluir que muchos miRNAs estarían implicados en la patogénesis de las cardiopatías estructurales, incluida la MCH. Con todo, hay varias controversias derivadas en gran parte de diferencias metodológicas (tipos de *arrays* utilizados), las características de las muestras (hipertrofias en grados diferentes), y los tamaños muestrales.

17. MiRNAs circulantes (sanguíneos) en los procesos isquémicos.

Hay varios miRNAs que podrían ser marcadores plasmáticos para la cardiopatía isquémica (infarto y angina). Así, los niveles de miR-133, miR-1, miR-499 miR-208 estarían elevados en el plasma de pacientes que habían sufrido episodios isquémicos, correlacionándose con la presencia de TnT circulante (Adachi y cols., 2010; Wang y cols., 2010) Muchos de éstos miRNAs son indetectables en el plasma de sujetos sanos y con otras patologías cardiovasculares no isquémicas. (Ai y cols., 2010; Satoh y cols., 2010; Wang y cols., 2010)

En el modelo murino de inducción de infarto por ligación de las arterias coronarias se halló una elevación marcada de los niveles de miR-208a a partir de la primera hora, con disminución a partir de la sexta hora (Wang y cols., 2010). Tras la inducción de infarto en ratas mediante isoproterenol se detectaron también niveles aumentados de miR-208, de forma paralela a la elevación de los niveles de TnT (Ji y cols., 2009). Otro miRNA cuya presencia plasmática ha sido ampliamente relacionado con la patología isquémica cardiaca, es el miR-1, encontrándose sobre-expresado en pacientes con IAM frente a controles sanos, revirtiendo a niveles normales tras el tratamiento. Estos resultados son consistentes con la sobreexpresión del miR-1 descrita en el miocardio de modelos murinos

y pacientes con enfermedad isquémica, apoyando la teoría de que la abundancia de este miR-1 en pacientes con IAM se debe a la liberación del mismo a partir del corazón dañado. (Ai y cols., 2010)

Apoyando esta teoría de daño tisular cardiaco, liberación de miRNAs y posibilidad de detección plasmática, se ha publicado recientemente un estudio en el que se midió la abundancia de los miRNAs miR-499, miR-133a, miR-208a, específicos cardiacos y de miR-126 en la aorta, (muestra pre-coronaria) y en el seno venoso coronario (muestra post-coronaria) en pacientes con IAM y controles sanos. Se comprobó que los niveles de los miRNAs, miR-133a y miR-499 aumentaban a través de la circulación transcoronaria en pacientes con IAM y elevación de TnT. Este estudio confirma que la aparición de los miRNAs miR-133a y miR-499 en la circulación se debe a su liberación del corazón tras el daño isquémico. (De Rosa y cols., 2011)

Por otro lado, se ha asociado la expresión de determinados miRNAs a procesos patológicos que contribuyen a la enfermedad isquémica, como la fibrosis, este es el caso del miR-21, cuya expresión plasmática ha sido recientemente asociada a la fibrosis en pacientes de estenosis aórtica. Se comprobó que los niveles de miR-21 tanto plasmáticos como en el tejido miocárdico eran mayores en los enfermos de AS, que en los controles sanos, además los niveles de miR-21 correlacionaban positivamente con el gradiente transvalvular, la expresión de *TGFβ* y con la expresión de genes que codifican para proteínas de matriz extracelular como son el colágeno I y la fibronectina. (Villar y cols., 2012)

18. Variación genética en los miRNAs y sus secuencias diana.

La variación genética en las secuencias que codifican los miRNAs puede contribuir al riesgo de desarrollar patologías. El mecanismo más directo sería el de un cambio nucleotídico en el propio miRNA maduro, particularmente en la región *semilla*. Estas variantes afectarían a la unión a las secuencias diana, alterando la regulación de la expresión de genes diana. Dado lo drástico de su efecto tendrían un carácter de mutación muy penetrante, por lo que se han descrito como causa rara de enfermedades mendelianas como el queratocono o la sordera familiar (Mencia y cols., 2009; Hughes y cols., 2011). Algunos miRNAs maduros presentan polimorfismos frecuentes, normalmente fuera de la región *semilla*, que podrían afectar al riesgo de desarrollar enfermedades prevalentes.

Como ejemplo, el polimorfismo rs2910164 en miR-146a podría predisponer al carcinoma de tiroides por afectar al proceso de síntesis del miRNA a partir del pre-miRNA (Jazdzewski y cols., 2009). Este polimorfismo se ha relacionado también con el riesgo para otros cánceres, como el de próstata, ovario y mama (Shen y cols., 2008; Xu y cols., 2010).

Alrededor del 10% de las secuencias pre-miRNA serían polimórficas, y la variación en los pri-miRNAs es aún mayor. Algunos de estos alelos podrían afectar a la síntesis del pre-miRNA y del miRNA maduro (Duan y cols., 2007). Así, el polimorfismo rs11614913 en pre-miR-196a2 ha sido relacionado con los cánceres de mama y pulmón en la población de China (Hoffman y cols., 2009; Tian y cols., 2009), y el rs213210 en el pri-miRNA-219 con el cáncer esofágico en población caucásica (Ye y cols., 2008). En el ámbito de las enfermedades cardíacas existen pocos trabajos publicados sobre el efecto de los polimorfismos en miRNAs. Dos variantes en los genes mir-196a2 y miR-499 se han asociado con el riesgo de MCD en la población china (Zhou y cols., 2010)

Finalmente, la variación genética en las regiones de unión a miRNAs en los mRNAs podría afectar al riesgo de desarrollar enfermedades a través de su efecto sobre la degradación del mRNA. Hay varios estudios publicados para varias patologías, pero por su relevancia en la enfermedad cardiovascular mencionaremos la variante rs5182 en la región 3'UTR del gen *AGTR1*, que codifica el receptor tipo 1 de la angiotensina. Éste polimorfismo (+1166 A/C) ha sido ampliamente relacionado con el riesgo de cardiopatías isquémica y no isquémica o hipertensión, entre otras. El efecto patológico podría explicarse por su efecto sobre la unión del miR-155, a través de la que se regularía la expresión del receptor y la respuesta vasopresora de la angiotensina.(Ceolotto y cols., 2011)

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los micro ARNs (miRNAs) juegan un papel fundamental en el origen y evolución de la Miocardiopatía Hipertrófica (MCH). Algunos miRNAs estarían más o menos representados en los corazones hipertróficos comparados con el tejido cardiaco normal. Esta desregulación se traduciría en un cambio en el programa de expresión génica cardiaca. Nuestra hipótesis de trabajo es que la variación en la secuencia de ADN de los miRNAs relevantes para la MCH podría contribuir a definir el riesgo de desarrollar la enfermedad. Por otro lado, algunos de estos miRNAs podrían ser detectados en la sangre de los pacientes con MCH, y en tal caso podrían emplearse como marcadores biológicos para diagnosticar la enfermedad y/o predecir su evolución y eventos adversos, como la muerte súbita.

Objetivos

El objetivo general ha sido definir el papel de los miRNAs en la MCH y su posible utilidad como marcadores para el diagnóstico y/o monitorización de la enfermedad. Como objetivos concretos se plantearon los siguientes.

1. Caracterizar qué miRNAs se expresan de forma diferente en tejido cardiaco de pacientes con MCH y en corazón normal.
2. Determinar si algún miRNA está presente en mayor o menor cantidad en el plasma sanguíneo de los pacientes (comparado con controles sanos), de forma que pudiera emplearse como nuevo marcador para esta enfermedad.
3. Analizar la variación en la secuencia genómica de varios miRNAs que han sido relacionados con la MCH (myo-miRs) para determinar si alguna contribuye al riesgo genético de desarrollar la enfermedad.

Metodología

METODOLOGÍA

1. Pacientes y controles.

Para este estudio empleamos un total de 245 pacientes con diagnóstico de MCH entre los años 2000 y 2011 según los criterios establecidos por las academias americana y europea de cardiología (Gersh y cols., 2011). Es decir, sujetos con un grosor septal ≥ 13 mm en ausencia de otras condiciones que pudiesen explicar la hipertrofia, como estenosis aórtica, hipertensión, ejercicio físico, entre otras causas. De todos los pacientes se obtuvieron datos antropométricos, clínicos, analíticos, y de la historia familiar de la enfermedad, que fueron almacenados en una base de datos disociada siguiendo la normativa legal. Todos los pacientes procedían de la consulta de Cardiología del HUCA, centro de referencia nacional para las cardiopatías familiares. Además se incluyeron en para los estudios de asociación un grupo de 120 pacientes con hipertrofia del ventrículo izquierdo secundaria a hipertensión HVI, que también habían sido diagnosticados por el servicio de Cardiología del HUCA. El grupo control consistía en 250 sujetos sanos no relacionados de la población de Asturias, todos caucásicos y mayores de 45 años. Estos controles fueron reclutados a través del banco de sangre del Principado de Asturias (40%) y de varios centros de atención primaria del área sanitaria de Oviedo (60%). Todos los controles y pacientes firmaron un consentimiento en el que accedían a participar en la investigación en los términos que se indicaban en el documento, aprobado por el Comité Ético del HUCA.

A todos los pacientes y controles se les extrajeron 20 ml de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante. En los 30 minutos posteriores a la extracción se procedió a centrifugar la sangre durante 15 min a 2.000 rpm para separar el plasma del precipitado celular, del que se obtuvo el ADN siguiendo el procedimiento de precipitación salina de las proteínas (Miller y cols., 1988). El ADN se ajustó a una concentración final de 250 ng/ μ l y congeló hasta su uso en los estudios genéticos. El plasma se distribuyó en alícuotas de 250 μ l a los que se añadieron 4 pg (10 μ l de una dilución 0,4 pg/ μ l de un ARN sintético con la secuencia del miR-159 de *Arabidopsis Thaliana* (5'UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA3'). Esta cantidad del miRNA sintético era la óptima para su detección alrededor del ciclo 25 en los ensayos Taqman en tiempo real, permitiendo así valorar la calidad de la precipitación del plasma en los ensayos de miRNAs. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C .

2. Cribado mutacional de los genes sarcoméricos.

En todos los pacientes se determinó la presencia de mutaciones en los 5 genes sarcoméricos más frecuentemente mutados en la MCH: *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*. Para ello, se amplificó el ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en con cebadores complementarios de las bases intrónicas flanqueantes a los exones codificadores. En total, de cada paciente se amplificaron 45 fragmentos y un total de aproximadamente 30 kilobases (kb), que fueron secuenciadas mediante química de BigDye en un equipo ABI3130xl. El protocolo detallado del análisis de los genes sarcoméricos ha sido publicado en varios artículos (Garcia-Castro y cols., 2003; Garcia-Castro y cols., 2009; Coto y cols., 2012).

Los cambios nucleotídicos ya descritos como mutación (bases de datos www.cardiogenomics.com y www.HGMD.org) se consideraron mutaciones que explicarían el fenotipo en el paciente. Los cambios nuevos se clasificaron como mutaciones en base a su efecto funcional sobre la proteína (cambios de aminoácido, empleando Polyphen-2 para predecir el efecto), al procesamiento del pre-ARNm (posibles mutaciones de ajuste en los intrones), no haber sido descritas como polimorfismos (base de datos Ensembl www.ensembl.org/index.html y, en caso de ser posible su segregación con la enfermedad en la familia del paciente.

3. Obtención y procesamiento del tejido cardiaco.

Obtuvimos tejido del ventrículo izquierdo de 9 pacientes con MCH que habían sido sometidos a un trasplante cardiaco (4 casos) o a miectomía (5 casos). Como ARN de tejido cardiaco normal empleamos uno suministrado por Ambion © (*Human Heart total RNA. AM.7966*). Las piezas quirúrgicas se recogieron en tubos con RNA later (*RNA later Tissue Protect Tubes ref.76154 Quiagen*, <http://www.qiagen.com/products/rnastabilizationpurification/rnalaterrnaprotectsystems/rnalatertissueprotect.aspx>) inmediatamente tras su obtención en el quirófano y se conservaron a -80°C. Unos 50 mg de tejido fueron homogeneizados mediante el homogeneizador eléctrico Ultraturax© y la fracción de ARN de bajo peso molecular que incluye a los miRNAs se purificó con el reactivo *TRI ls Reagent Ambion*© (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/10296010>). La cantidad final de ARN fue

determinada mediante la relación de absorbancia 260/230 y 260 /280 en un equipo nanodrop (*GE nanovue*, <http://www.es.fishersci.com>).

Para cada una de las muestras de ARN se retrotranscribieron 350 ng en una reacción conteniendo una mezcla de 384 cebadores para miRNAs (*miRNA-specific stem-loop primers, pool A*) y una retrotranscriptasa (*miRNA Reverse Transcription Kit*) según el protocolo del fabricante. AppliedBiosystems; http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_054158.pdf. La reacción se llevó a cabo en un termociclador mediante 40 ciclos de 2 min a 16°C 2 min, 1 min a 42°C y 1 s a 50 °C, seguido de una desactivación enzimática a 85°C durante 5 min.

Una vez realizada la retrotranscripción se procedió a la preamplificación las muestras, cuyo objetivo es la obtención de varias copias de los cDNAs específicos de cada miRNA presente en nuestra muestra. En este proceso se incrementa la cantidad de miRNAs muy poco representados en la muestra original, facilitando así su detección final. La preamplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo 2,5 µl de la retrotranscripción , 2,5 µl de una mezcla de parejas de cebadores para los 384 miRNAs (*miRNA Preamp primers kit*; <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catProductDetail&productID=4401009&catID=605479&backButton=true>), y Taq polimerasa (No Amp Erase UNG2x; <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602680>) a una concentración final 1x. Las condiciones de termociclación fueron 95° durante 10 min , 55°C 2 min, 72 °C 2 min, seguidos de 12 ciclos a 95°C durante 15 s +60°C durante 4 min, y una inactivación final a 99°C durante 10 min.

4. Ensayos TLDA.

La cuantificación final de los miRNAs preamplificados se realizó mediante ensayo en placas TLDA-A (*Taqman low density arrays part A*) ; <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catProductDetail&productID=4398965&catID=605481&backButton=true> conteniendo un total de 384 miRNAs incluidos varios controles internos para la normalización de la expresión **Figura 11**. Empleamos los preamplificados de tejido de dos pacientes nombrados como H1, H9 (uno con la mutación V822M en *MYH7* y otro con la mutación R453C en *MHY7*) y de la

muestra de ARN control. Cada reacción de preamplificación se se diluyó 1:3 en agua, y 10 µl se añadieron a una mezcla de 490 µl de *Taqman universal master mix no amperase UNG*®+ 500 µl de agua. Cada mezcla final fue cargada en una placa TLDA-A que una vez sellada se colocó en un equipo de PCR en tiempo real ABI 7900HT, amplificándose durante 45 ciclos de 15 s a 95°C + 60°C durante 1 min. Cada muestra se analizó por triplicado, empleando el programa informático SDS para cuantificar la expresión de cada miRNA. El RNAU6 se empleó como interno, contra cuya expresión se normalizó la de cada miRNA. El valor de cada miRNA en las muestras de los pacientes se comparó con el correspondiente al ARN control.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-miR-1	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	MammU-6	MammU-6	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22
2	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	MammU-6	MammU-6	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-32	hsa-miR-33b	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-92a	hsa-miR-93
3	hsa-miR-95	hsa-miR-96	hsa-miR-98	hsa-miR-99a	hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-106b	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-129-5p
4	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-147b
5	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	RNU48	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-194
6	hsa-miR-195	hsa-miR-196b	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-208b	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-216a	hsa-miR-216b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-221
7	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	ath-miR159a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-331-5p
8	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-355	hsa-let-7b	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-345	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374a
9	hsa-miR-374b	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449a	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p
10	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-496
11	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516b	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c
12	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-519a	hsa-miR-519d	hsa-miR-519e	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-520g	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-526b	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532-5p
13	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548d-3p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-579	hsa-miR-582-3p
14	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-652	hsa-miR-653	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p
15	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-888	hsa-miR-889	hsa-miR-890	hsa-miR-891a	hsa-miR-891b	hsa-miR-892a	hsa-miR-147
16	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-220	hsa-miR-220b	hsa-miR-220c	hsa-miR-298	hsa-miR-325	hsa-miR-346	hsa-miR-376c	hsa-miR-384	hsa-miR-412	hsa-miR-448	hsa-miR-492	hsa-miR-506	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-517b	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-520b	hsa-miR-520e	hsa-miR-520f

Figura 11. Mapa de la TLDA-A utilizada. En amarillo se señalan los controles internos.

5. Cuantificación de los miRNAs.

La cuantificación relativa de cada miRNA se realizó mediante el método de los $\Delta\Delta CT$. En primer lugar se calculó el valor de Ct medio (C_{tm} , de los tres ensayos de cada muestra). Cada C_{tm} se normalizó frente al valor correspondiente del control de normalización (el U6 en el caso de los tejidos). Para cada miRNA se calculó el ΔCT (C_t paciente - C_t control), $\Delta\Delta CT$ (ΔCT paciente - ΔCT control) y la cuantificación relativa ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$). El valor RQ (*Relative Quantification*) nos indica el nivel de expresión de cada miRNA con relación al control.

Esta fórmula es aplicable a los ensayos TLDA y de miRNAs individuales, tanto en tejidos como en plasmas, variando sólo el normalizador en cada caso (U6 en tejidos y miR-191 en plasmas).

Tabla 4. Formulación del método de los $\Delta\Delta Ct$

Control endógeno, de expresión constante.
Muestra de Referencia, control sano.
Ct= primer ciclo en que se detecta fluorescencia.
C_{tm} = media duplicados- triplicados
ΔCt = C_t gen problema - c_t del gen control
SD ΔCt = Desviación standard del ΔCt
$SD \Delta Ct = \sqrt{sd \text{ gen problema}^2 + sd \text{ gen control}^2}$
$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt gen problema- ΔCt del gen control
$SD \Delta\Delta Ct = SD \Delta Ct = \sqrt{sd \text{ gen problema}^2 + sd \text{ gen control}^2}$
$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$
SDRQ = Desviación standard del RQ

Los RQ se obtuvieron para un intervalo de confianza del 95%, considerándose significativos aquellos que se encontraban entre el RQ mín y RQ máx., (límites inferior y superior del intervalo). De esta forma miRNAs que obtuvieron $RQ > 1$ con RQ mín. y RQ máx. > 1 se consideraron, significativamente sobre-expresados, por el contrario aquellos en los que se obtuvo un valor de $RQ < 1$ y RQ mín y RQ máx < 1 se consideraron subexpresados. Para la obtención de los p- valores, se compararon los $\Delta\Delta C_t$ obtenidos mediante una prueba T de comparación de medias. (Bostjancic y cols., 2009).

6. Ensayos Taqman individuales.

Los miRNAs que en los ensayos TLDA resultaron estar significativamente sobre o subrepresentados en la muestra patológica (comparados con el valor en el control) fueron analizados individualmente mediante ensayos Taqman en un equipo de PCR en tiempo real ABI 5500. Para la realización de los ensayos taqman individuales se partió de los preamplificados previamente generados y diluidos 1:3. (25 μ l en 75 μ l).

Estos ensayos fueron realizados en volumen final de 10 μ l conteniendo 5 μ l del buffer con la *Taq 1X no Amperase Applied biosystems*®, 0,5 μ l de la sonda Taqman específica para cada miRNA, 1 μ l del producto de preamplificación diluido y 3,5 μ l de agua libre de RNasas. (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>). Debido a que los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado, estos se generaron a partir de una pre-mix que contenía todos los componentes de la reacción por triplicado que posteriormente se dividió en las tres reacciones individuales.

Para cada ensayo Taqman de expresión de un miRNA se incluyeron los 10 tejidos (9 tejidos a estudio más el control) por triplicado, así como todos los tejidos fueron ensayados para simultáneamente para el control interno U6 con el fin de homogeneizar. Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 95°C 10 min, 40 ciclos de 95°C 15 segundos y 60°C durante 1 min. La semi-cuantificación fue llevada a cabo por el método de los $\Delta\Delta C_t$ como se indica anteriormente, considerándose como control interno el U6 y como muestra de referencia el control sano (Apdo. 5)

7. Procesamiento de los plasmas y selección de controles endógenos.

Como indicamos en un apartado anterior las muestras de plasma de pacientes y controles se distribuyeron en alícuotas de 250 μ l a los que se añadieron 10 μ l de un ARN con la secuencia Ath-miR-159. Se seleccionó como cantidad óptima de control endógeno (Ath-mir-159) aquella cantidad que amplificaba a los ciclos 26 y 28 en los ensayos Taqman, que son los ciclos en los que amplificaban la mayoría de los miRNAS. Esta cantidad fue determinada a partir de la cuantificación de varias alícuotas de 250 μ l de plasma conteniendo cantidades diferentes del ARN, entre 400 y 0,4 pg (**Figura12**).

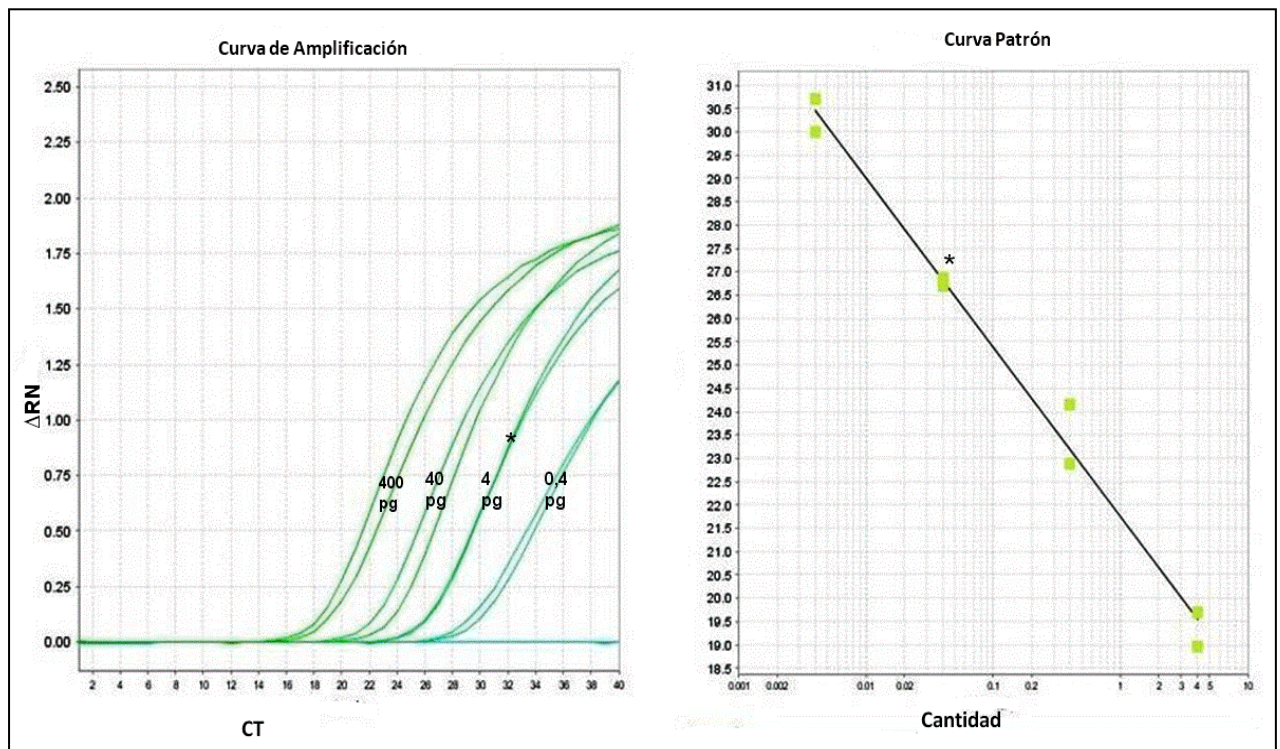


Figura 12. Curvas de amplificación y curva standard del ensayo Taqman del miRNA *Ath-miR-159*, a concentraciones iniciales de 400, 40, 4 y 0,4 pg.

El ARN total de los plasmas se aisló empleando reactivo TRI- Is Reagent, siguiendo el mismo protocolo empleado con los tejidos, descrito en un apartado anterior. Una vez medida la absorbancia se ajustó la concentración de ARN a 100 ng/ μ l, y 350 ng fueron retrotranscritos con los 384 cebadores del miRNA poolA siguiendo el protocolo descrito anteriormente. 2,5 μ l del producto restrotranscrito fueron preamplificados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Finalmente, realizamos un ensayo en tiempo real de cada muestra por triplicado empleando sondas Taqman específicas del miRNA. Todas las muestras de plasma empleadas en ensayos de cuantificación de miRNAs fueron

validadas previamente con el ensayo para el Ath-miR-159. Sólo aquellas con un Ct en el rango 26-28 fueron admitidas como válidas.

No existe consenso sobre qué miRNA es el mejor como control interno para la normalización en plasma. Hay varios cuyos niveles no parecen diferir entre muestras de sujetos sanos y varias patologías, como el cáncer, y han sido propuestos como normalizadores en estos estudios. Uno de estos es *miR-191*, cuyos niveles serían constantes en la sangre.(Liang y cols., 2007). Puesto que no se conocía su comportamiento en pacientes con MCH determinamos sus niveles en una muestra de 20 pacientes y 20 controles sanos mediante un ensayo Taqman específico para este miRNA. En todas las muestras se obtuvieron Cts entre los 21 y 25 ciclos, sin diferencias significativas entre pacientes y controles, por lo que *mir-191* fue adoptado como miRNA para la normalización de los otros miRNAs en los ensayos con plasma.

8. Cuantificación de miRNAs plasmáticos.

El nivel de los 384 miRNAs plasmáticos se determinó sobre tres muestras de controles y tres de pacientes, cada una constituida por una mezcla (*pool*) de 4 preamplificaciones. Por tanto, empleamos 12 controles y 12 pacientes para este análisis mediante TLDA. Cada una de los seis pools de preamplificados se analizó por triplicado, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el análisis de los tejidos con placas TLDA. Todos los miRNAs se normalizaron frente al miR-191, y los valores medios C_{tm} de los tres pools de los pacientes se compararon con las medias de los controles. Los miRNAs con $CT > 35$ (nivel de detección del ensayo Taqman), fueron clasificados como “no detectados”, y se consideró un $CT = 40$ para el análisis estadístico. Los C_{tm} entre pacientes y controles fueron comparados mediante una prueba T de comparación de medias, con un nivel de confianza del 95%.

Los miRNAs con C_{tm} significativamente elevados (p valor $< 0,05$) en los pacientes se analizaron de forma individual y por triplicado en los 12 pacientes y 12 controles que constituían los *pools*. Además de éstos, analizamos en los mismos casos y controles otros miRNAs que han sido relacionados con la patogénesis de la MCH, como los de las familias miR-1 y MiR-133. Aquéllos miRNAs cuyos niveles medios diferían entre pacientes y controles se analizaron en una muestra adicional de 24 pacientes y 24 controles.

9. Análisis de la variación en los myo-miRs.

Para la búsqueda de variantes génicas en los myo-miRs, amplificamos mediante la PCR con cebadores específicos varios fragmentos que contenían las secuencias pre-miRNA. Los amplificados de todos los pacientes (n=245) y 250 controles se analizaron mediante la técnica SSCA (del inglés *Single Strand Conformation Analysis*) en condiciones optimizada por nuestro grupo para incrementar la probabilidad de detectar cambios nucleotídicos (Orita y cols., 1989) (Tabla 5). Cada reacción fue diluida 1:10 en formamida y se calentó a 95 °C durante 5min. Las mezclas desnaturalizadas se enfriaron en hielo e inmediatamente, 10 µl fueron cargados en geles de acrilamida-bisacrilamida de 0,5 mm de grosor y 50 cm de longitud y sometidos a electroforesis a 10-12 W de potencia a temperatura ambiente durante 20-24 horas. Las bandas de cada muestra se visualizaron mediante tinción con plata, lo que permitió identificar muestras con patrones electroforéticos atípicos.

Para caracterizar los cambios nucleotídicos responsables de las diferencias en el patrón SSCA procedimos a amplificar y secuenciar el fragmento amplificado a partir de los pacientes y/o controles correspondientes. Para secuenciar los fragmentos de PCR empleamos química de BigDye en un equipo ABI3130xl.

Para las variantes en las que el cambio de base no afectaba a un enzima de restricción y cuyos tres genotipos eran claramente diferenciables por su patrón SSCA, el genotipo de los pacientes y controles se determinó mediante esta técnica confirmando su fiabilidad mediante secuenciación de varios fragmentos de cada genotipo.

10. Genotipado mediante PCR-RFLP.

Las variantes alélicas que creaban o eliminaban sitios para enzimas de restricción se genotiparon mediante digestión del fragmento de PCR (PCR-RFLP) seguida de electroforesis en geles de agarosa para visualizar los alelos (**Tabla 6**) Mediante PCR-RFLP se genotiparon todos los pacientes y controles, incluidas aquellas variantes que pudiendo ser también analizadas mediante esta técnica habían sido genotipadas mediante SSCA.

Tabla 5. Cebadores y condiciones de amplificación y SSCA en los miRNAS estudiados.

miRNA	Cebadores	Tamaño (Pb)	Temperatura °C	Gel Acrilamida: Bisacrilamida	Condiciones electroforesis
208a	F-GTATGAGACGGACGCCATTTCAGC R-CTTAGACCGTAAGTCCAGCC	480	62	49:1 10%	12W20h
208b	F-AGTTCTGAGCAGCCTGACTTC R-TATGGACATTGAGGAGGTATGG	305	60	49:1 12 %	10W 22h
133a1	F-CAGTGACTGAAGCATTGGTATGATAA R-AAGTTATTTGATTATAATCACAGTCTGCTT	360	58	49:1 10%	10W 23h
133a2	F-GCAGAGCGAGAGGGTGGT R-GCTTCACTTACTTGGAGCTGAC	444	59	49:1 12 %	12W 20h
133b	F-GCATTTGACAGATGCTAATGCT R-GCATAAGAATATGGTGAAAAAACC	306	56	49:1 12%	10W24h

Tabla 6. Tabla de cebadores, condiciones PCR, enzima utilizado para la digestión y tamaño de los alelos observados en la electroforesis en geles de agarosa, de los polimorfismos analizados mediante PCR- RFLP.

Gen	Polimorfismo	Cebadores (dirección 5', 3') F: <i>forward</i> R: <i>reverse</i>	PCR (C°)	Tamaño (pb)	Enzima	Tamaño Alelos (pb)
hsa-miR-133a1	+85 A/C	F-CAGTGACTGAAGCATTGGTATGATAA R-AAGTTATTTGATTATAATCACAGTCTGCTT	58	360	<i>AflI</i>	A:360 C: 330+ 30
hsa-miR-133a2	191 G/A - rs45547937	F-GCAGAGCGAGAGGGTGGT R-GCTTCACTTACTTGGAGCTGAC	59	444	<i>MspI</i>	A:354+55+35 G:212+142+55+35
Hsa-miR-133b	-90 ins/del A.	F-GCATTTGACAGATGCTAATGCT R-GCATAAGAATATGGTGAAAAAACC	56	306	<i>MboI</i>	insA:306 DelA:231+75
AGTRI	c.1166 A/C rs5182	F-GCAGCACTTCACTACCAAATGAT R-TGTTCTTCGAGCAGCCGT	58	176	<i>Bcl-1</i>	C=176 A=156+20

11. Análisis de la variación genética en las regiones 3'UTR de los genes sarcoméricos:

Todos los pacientes de MCH fueron incluidos en el estudio del cribado genético de las regiones 3'UTR de los genes. Este cribado se realizó mediante SSCA utilizando los siguientes cebadores y las siguientes condiciones de amplificación y electroforesis. Se amplificaron regiones de 200 a 300bp que incluían la región 3' UTR completa de cada gen. Los patrones anómalos o raros fueron posteriormente secuenciados para su identificación como variaciones genéticas. Además aquellas variantes nuevas no descritas fueron estudiadas en los 250 controles sanos. **Tabla 7**

Tabla 7. Tabla de cebadores, condiciones de amplificación y SSCA para las regiones 3'UTR de genes sarcoméricos.

Gen	Cebadores utilizados	Tamaño amplificado (pb)	Temperatura (°C)	Gel	
				Acrilamida: Bisacrilamida	Electroforesis
<i>MYH7</i>	F-TGCCCAATACCATCTCTCCAA	301	62	29:1, 12%	10W 23h
	R-AGGCCTCCTAGGCCAGGC				
<i>MYBPC3</i>	F-TGTCCTCGGCAAGCA	241	64	29:1, 12%	10W 21h
	R-TACAGCCTCCCATTTACTGAT	206	60	29:1, 12%	10W 20h
	F-ATTCACCTCGTAAGATAACCTGTGT				
R-TTCAGGAGCCCTGTGGAC	243	60	29:1, 12%	10W 25h	
<i>TNNT2</i>	F-ATCAGCAGGGCAGTTGTGCG	265	67	29:1, 12%	10W 24h
	R-GTGTGGGGCAGGCAGGA	247	55	29:1, 12%	10W 22h
F-CTGAAAATAGAGCCTGGCCTC					
	R-GTTTCTCTCTCTCTGAAGGGGAC				

12. Análisis estadístico.

Los valores antropométricos y clínicos y genotipos de cada paciente se recogieron en una base de datos. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS, y en todos los casos un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos de las variables clínicas cuantitativas se expresaron en forma de media y desviación estándar. Además para determinar si estas variables seguían una distribución normal empleamos el test de Kolmogorov-Smirnov. Para comparaciones entre variables cuantitativas se utilizó el test T de comparación de medias. Los estadísticos Chi-cuadrado

y F-Fisher se emplearon para comparar las frecuencias de las variables discretas entre grupos.

El riesgo atribuible a cada genotipo y alelo se representó mediante el valor OR (odds ratio) y su intervalo de confianza (95% CI).

Resultados

RESULTADOS

1. Perfil de expresión de miRNAs en tejidos hipertróficos.

Analizamos tejido de 5 corazones con HVI (dos MCH y tres secundarias a enfermedad valvular), uno con MCD, y tres de pacientes trasplantados tras fallo cardiaco por infarto de miocardio (**Tabla 8**).

Tabla 8. Características de los 9 pacientes de los que se obtuvieron tejidos cardiacos.

	Diagnóstico	Edad al trasplante	Sexo
H1	MCH (MYH7 V822M)	28	M
H9	MCH (MYH7 R453C)	47	M
H2	HVI secundaria	35	M
H3	HVI secundaria	13	H
H5	HVI secundaria	56	M
H4	Infarto extenso de miocardio	57	M
H6	Miocardiopatía dilatada	57	H
H7	Infarto extenso de miocardio	53	H
H8	Infarto extenso de miocardio	64	H
HC	RNA de Corazón comercial	–	–

H: Hombre
M: Mujer

El perfil de expresión de los 384 miRNAs en placas TLDA se realizó sobre un mezcla equimolecular de dos tejidos de pacientes con mutación sarcomérica ,H1 y H9, comparándola con el ARN control ,Hc. .(La placa consta de 384 miRNAs: 4 de ellos son controles internos, de ellos MammU6 está por cuadruplicado, por tanto se analizan 377 miRNas + 4 controles internos distintos: MammU6, RNU 48, RNU44, y ath-miR-159. *Ver figura 11 Metodología*) Cada fue analizada por triplicado, observándose entre las réplicas diferencias para el control interno (U6) y para cada miRNA menor de 3 ciclos. Los Ctm de cada miRNA en cada ensayo se obtuvieron a partir de los valores normalizados de las tres placas TLDA.

En total, se detectaron **252** miRNAs (Ct<35), y de éstos 107 lo fueron en el control exclusivamente, 145 en ambos, (**Figura 13**). De los 145 detectados en ambos tejidos, 3 eran los controles internos y sólo 17 tenían valores de Ct significativamente diferentes entre las muestras patológicas (media de los dos tejidos HCM) y el ARN control: miR-1, miR-93, miR-191, miR-218, miR-223, miR-374, miR-451, miR-454, miR-495, miR-

125a-3p, miR-133a, miR-133b, miR-199a-3p, miR-30b, miR-483-5p, miR-590-5p, y miR-92a (Tabla 9).

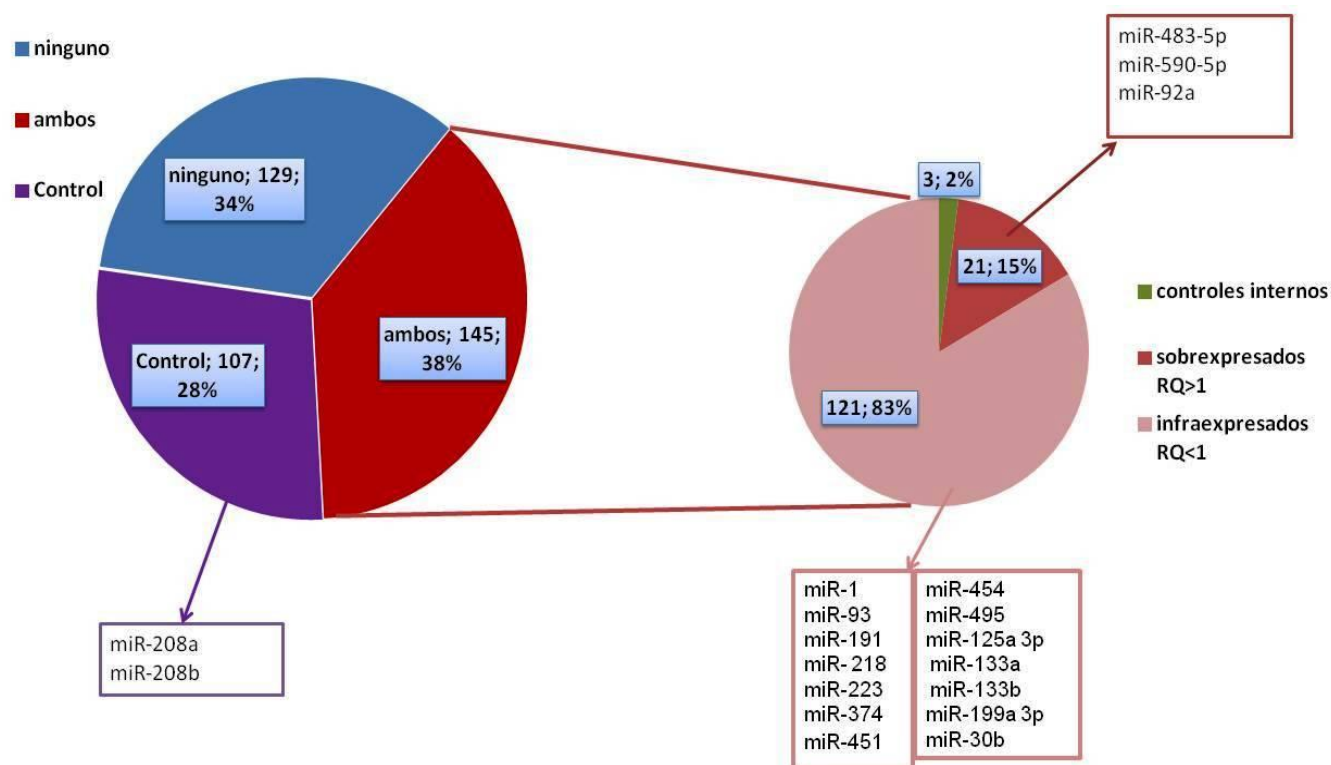


Figura 13. Resultados obtenidos en el análisis del nivel de miRNAs mediante TLDA-A. De los 145 miRNAs detectados en ambos tejidos 121 y 21 estaban sub y sobrepresados en el tejido patológico. Sólo 17 de estos miRNAs (recuadros rojos) tenían valores Ct significativamente diferentes entre los dos tejidos.

2. Ensayos individuales.

Un total de 19 miRNAs fueron seleccionados para analizar su expresión individualmente en los 9 tejidos cardiacos y el ARN control: además de los 17 miRNAs significativamente sobre- o sub-representados en el tejido patológico se valoraron miR-208a y -208b (Tabla 9). En un primer análisis comprobamos que el patrón de expresión de estos miRNAs diferenciaba los tres corazones de pacientes con enfermedad isquémica de los hipertróficos, con 13 de los 19 sobrepresados en los tejidos isquémicos (Figura 14).

Tabla 9. Ctm y RQ obtenidos en el estudio mediante TLDA del tejido patológico y el ARN control.

Detector	Ctm control	Ctm pool MCH	RQ
miR-1	22,656	29,980	0,032
miR-133a	16,966	21,968	0,16
miR-133b	22,744	27,995	0,134
miR-191	21,394	24,983	0,425
miR-218	23,392	30,947	0,027
miR-30b	19,987	25,464	0,115
miR-374a	26,921	32,972	0,077
miR-454	25,956	31,329	0,123
miR-483-5p	30,961	32,614	1,625
miR-495	29,776	34,988	0,138
miR-590-5p	27,963	35,476	1,28
miR-92a	26,954	31,754	1,83
miR-451	26,739	32,956	0,069
miR-223	20,943	25,462	0,223
miR-125a-3p	29,964	34,467	0,225
miR 199a-3p	23,792	28,955	0,143
miR-93	27,208	30,962	0,379
miR-208a	30,303	40,000	0,006
miR-208b	31,965	40,000	0,019

Los valores de estos 19 miRNAs en los dos tejidos MCH (H1 y H9) y los tres de hipertrofias secundarias a enfermedad valvular (H2, H3, H5) se resumen en la tabla 10. Nueve (miR-1, miR-133b, miR-191, miR-208b, miR-218, miR-306, miR-30b, miR-374) estaban infra-expresados y dos (miR-92a, miR-590-5p) sobre-representados en los 5 tejidos hipertróficos comparados con el ARN control. Sólo miR-495 diferenciaba los tejidos HCM de las HVI secundarias, mostrando expresión menor en los dos tejidos con mutación sarcomérica.

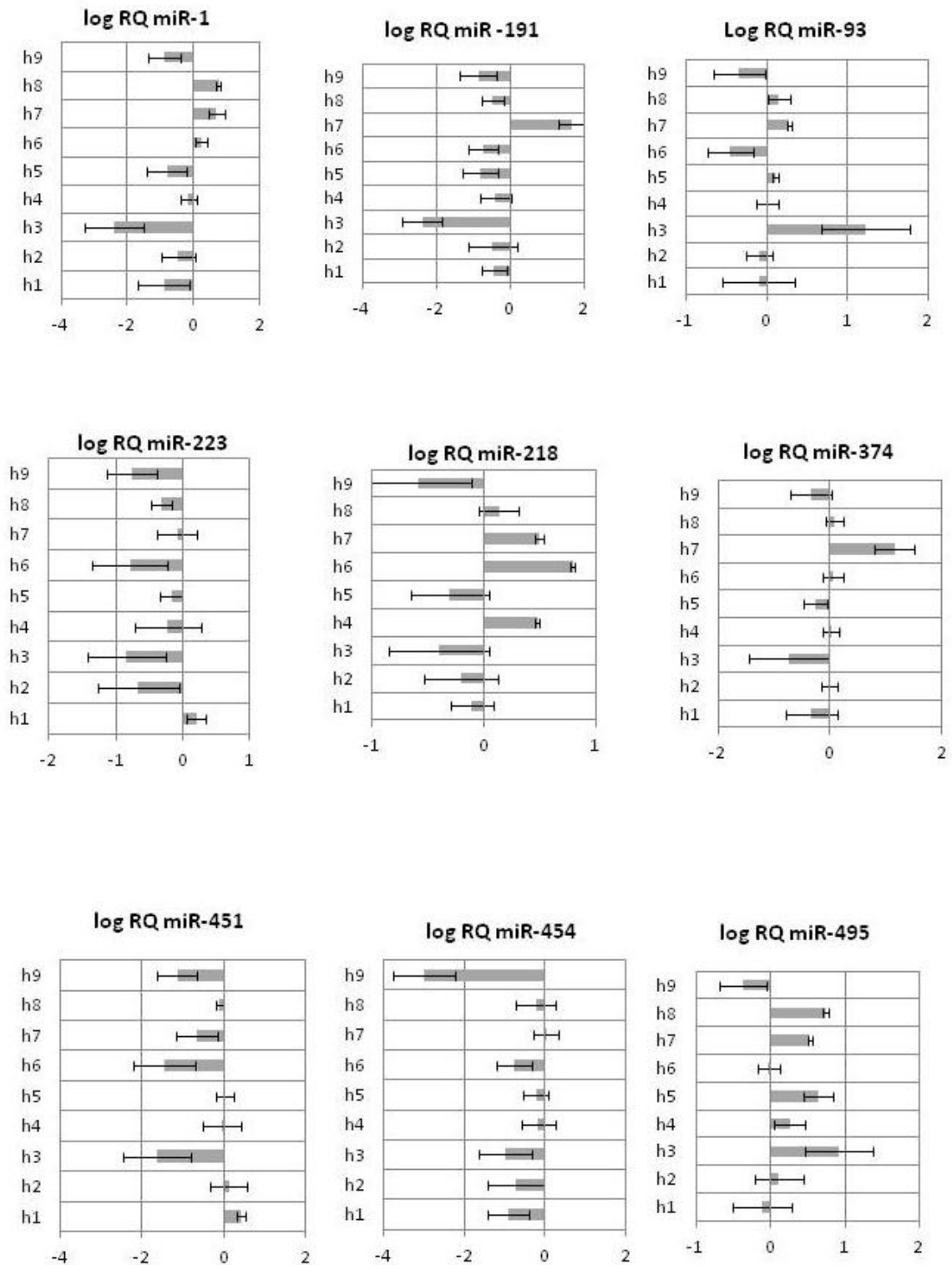
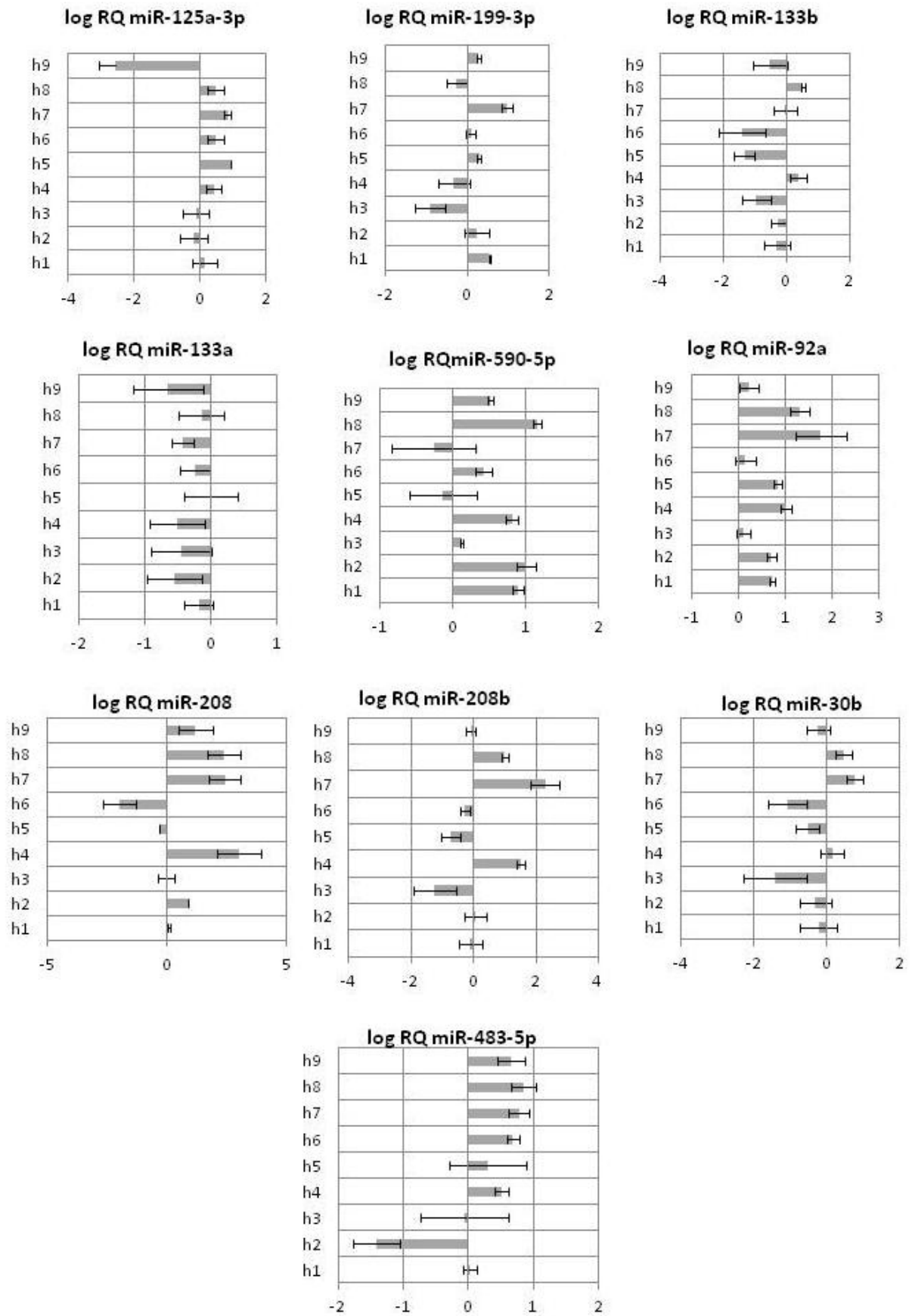


Figura 14. Valores RQ del análisis individual de los 19 miRNAs candidatos



Continuación figura 14. Valores RQ del análisis individual de los 19 miRNAs candidatos.

Tabla 10. Valores RQ (cuantificación relativa) y p ($\Delta\Delta Ct$; entre paréntesis) de los 19 miRNAs en los 5 tejidos hipertróficos comparados con el control.

miRNA	HC Ctm	H1	H9	H2	H3	H5
<i>l</i>	15	0.13 (0.0001)	0.13 (0.0001)	0.34 (0.0018)	0.004 (0.0001)	0.15 (0.0036)
<i>133a</i>	15	0.67 (0.16)	0.23 (0.0054)	0.28 (0.015)	0.36 (0.0026)	1.00 (0.9)
<i>133b</i>	19	0.50 (0.049)	0.30 (0.0152)	0.55 (0.122)	0.11 (0.0106)	0.04 (0.37)
<i>191</i>	14	0.37 (0.0094)	0.13 (0.0066)	0.40 (0.0126)	0.84 (0.082)	0.21 (0.068)
<i>218</i>	22	0.77 (0.324)	0.26 (0.016)	0.62 (0.034)	0.39 (0.004)	0.49 (0.049)
<i>30b</i>	12	0.59 (0.014)	0.58 (0.027)	0.48 (0.0118)	0.04 (0.0004)	0.29 (0.002)
<i>374</i>	22	0.46 (0.001)	0.4 (0.013)	0.90 (0.93)	0.19 (0.001)	0.53 (0.1348)
<i>454</i>	25	0.12 (0.0024)	0.001 (0.0612)	0.19 (0.0016)	0.10 (0.0006)	0.58 (0.038)
<i>495</i>	25	0.78 (0.884)	0.42 (0.002)	1.30 (0.025)	8.32 (0.29)	4.40 (0.036)
<i>93</i>	19	0.79 (0.087)	0.45 (0.022)	0.82 (0.287)	16.51 (0.186)	1.29 (0.58)
<i>199a-3p</i>	13	3.48 (0.067)	1.86 (0.05)	1.73 (0.07)	0.12 (0.047)	1.96 (0.40)
<i>590-5p</i>	17	7.90 (0.0018)	3.33 (0.014)	10.13 (0.00002)	1.31 (0.05)	2.62 (0.086)
<i>92a</i>	23	5.31 (0.004)	1.65 (0.042)	5.05 (0.0026)	1.26 (0.25)	6.68 (0.046)
<i>125a-3p</i>	26	1.37 (0.062)	0.003 (0.1128)	0.65 (0.0122)	0.75 (0.0336)	8.26 (0.0026)
<i>208a</i>	26	1.17 (0.823)	15,4 (0.002)	7.21 (0.039)	0.93 (0.869)	0.47 (0.0086)
<i>223</i>	17	1.59 (0.0634)	0.18 (0.001)	0.22 (0.0002)	0.14 (0.0016)	0.67 (0.1114)
<i>483-5p</i>	23	1.05 (0.08)	4.46 (0.007)	0.04 (0.043)	0.872 (0.449)	2.02 (0.1046)
<i>451</i>	19	2.65 (0.012)	0.07 (0.0004)	1.33 (0.114)	0.02 (0.0004)	1.09 (0.5)
<i>208b</i>	24	0.79 (0.763)	0.81 (0.663)	1.13 (0.76)	0.06 (0.016)	0.18 (0.035)

3. Perfil de expresión de miRNAs en plasma

Para determinar los niveles de los 377 miRNAs en el plasma de los pacientes y controles se analizaron mediante placas TLDA-A 3 mezclas (pooles) de pacientes y 3 de controles, cada una constituida por 4 preamplificaciones. Las características de los casos/controles que formaban cada mezcla se resumen en la **tabla 11**.

Tabla 11. Características de los pacientes y controles que formaban los 6 pooles.

	Nº	Edad	Sexo	Antecedentes	NYHA	SIV	Mutación
Pool MCH1	3	51	H	Sí	IV	19	MYH7 R787>C
	87	57	M	Sí	IV	17	MYBPC3 M844>FS
	185	58	H	Sí	III	17	TNNT2 R92>Q
	214	30	H	Sí	III	18	NO
Media±DS		49±13,0					
Pool MCH2	219	34	M	No	III	19	MYBPC3 G1248>R
	227	14	M	No	III	17	NO
	229	75	H	No	III	18	NO
	230	72	H	Sí	IV	22	NO
Media±DS		48,7±29,7					
Pool MCH3	236	59	H	No	III	19	NO
	239	42	H	No	IV	18	NO
	242	29	M	No	III	21	NO
	243	26	H	Sí	III	14	TNNI3 S199>R
Media±DS		39±15,0					
Pool CT1		50	H	ND	ND	ND	ND
		49	H	ND	ND	ND	ND
		55	M	ND	ND	ND	ND
		75	H	ND	ND	ND	ND
Media±DS		57,2±12,1		ND	ND	ND	ND
Pool CT2		32	H	ND	ND	ND	ND
		35	M	ND	ND	ND	ND
		23	H	ND	ND	ND	ND
		76	M	ND	ND	ND	ND
Media±DS		41,5±23,5					
Pool CT3		70	H	ND	ND	ND	ND
		57	H	ND	ND	ND	ND
		43	M	ND	ND	ND	ND
		31	M	ND	ND	ND	ND
Media±DS		50,2±16,9		ND	ND	ND	ND

NYHA: Grado de disnea según la clasificación *New york Heart Association*

SIV: Septo interventricular.

ND: No determinado

En total, 160 miRNAs fueron detectados (Ct<35) en al menos una de las 6 mezclas. Sólo 5 miRNAs (miR-92a, miR-199-3p, miR-30b, miR-451, y miR-483-5p) estaban significativamente sobre-representados (p<0.05) en los pacientes (**tabla 12**), por lo que se valoraron individualmente en una muestra más amplia.

Tabla 12. Cts de los 5 miRNAs sobre-representados en el plasma de los pacientes (análisis mediante placas TLDA). Mostramos también los valores del Ath-miR-159 (añadido a las muestras de plasma) y del miR-191 (control de normalización), y los de los RNA U6 y U8.

miRNA Ref. sonda Taqman	Cont1	cont2	cont3	Control media	MCH1	MCH2	MCH3	MCH media
Ath-miR-159 4373390	22	23	22	22	22	24	25	24
hsa-miR-199a-3p 4395415	29	28	27	28	23	24	25	24
hsa-miR-30b 4373290	28	27	26	27	21	24	25	23
hsa-miR-451 4373360	27	25	24	25	21	22	23	22
hsa-miR-92a 4395169	27	23	22	24	20	20	21	20
hsa-miR-483-5p 4395449	34	32	31	32	27	26	27	27
MammU6- 4395470	34	32	31	32	31	34	35	33
RNU48 4373383	31	32	31	31	32	33	34	33
hsa-miR-191 4395410	23	22	21	22	22	23	24	23

4. Validación de los miRNAs en plasmas.

El empleo de pools de pacientes y controles ha sido ampliamente usado para identificar miRNAs candidatos en muestras de diferente origen, incluido el plasma sanguíneo. Sin embargo, las diferencias significativas no implican mayor o menor nivel en todas las muestras de cada mezcla, sino que una puede contribuir a la diferencia siendo los niveles de las otras similares a los de los plasmas control. Por ello, los 24 plasmas de pacientes (n=12) y controles (n=12) empleados para configurar las 6 mezclas fueron ensayados individualmente para los 5 miRNAs candidatos. Tras comparar los Ctm sólo el miR-483-5p estaba significativamente sobre-representado ($p < 0.05$) en los pacientes (**Figura 15**).

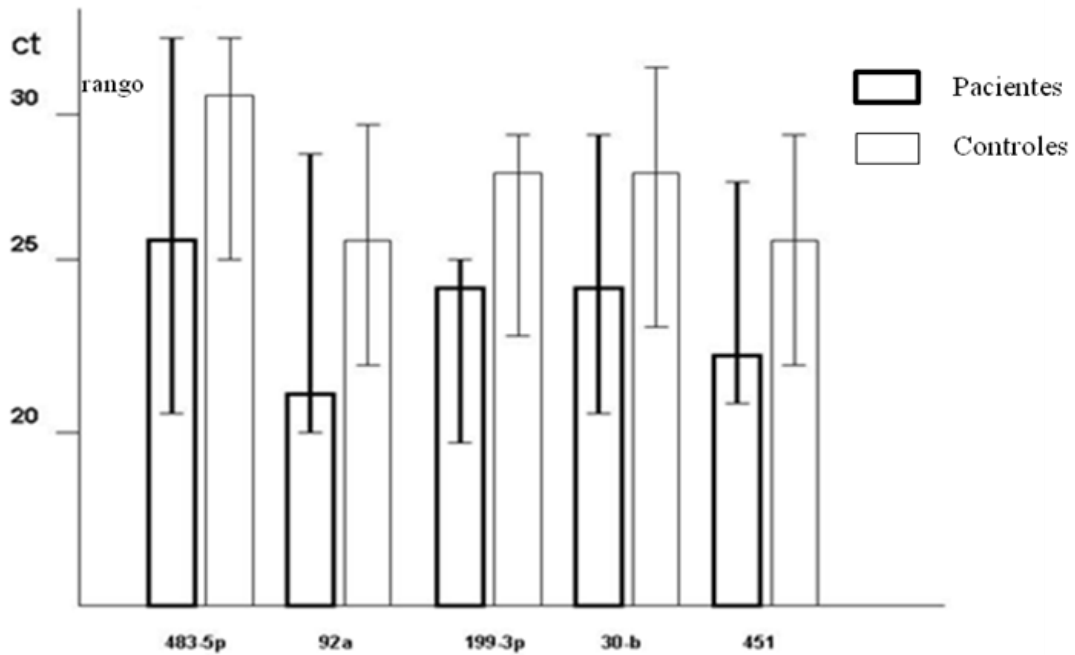


Figura 15. Representación de los Ctm de los 5 miRNAs candidatos en plasmas de pacientes (n=12) y controles (n=12).

5. MiR-483-5p como marcador plasmático en la MCH.

Para confirmar la sobre-representación de miR-483-5p en los pacientes, determinamos su nivel en el plasma de una muestra adicional de 12 pacientes y 13 controles (**Tabla 13**). La comparación de los 24 pacientes y 25 controles mostró una diferencia significativa para los Ctm ($p=0.03$). Mir-483-5p fue detectado ($Ct < 35$) en el plasma de todos los pacientes, y en 18 de los 25 controles, con una diferencia significativa para los Ctm (28 vs. 33; $p=0.03$). El valor RQ del miR-483-5p en los 24 plasmas MCH frente a un *pool* de los 25 controles se representa en la **tabla 14**.

Tabla 13. Características de los 24 pacientes en los que se determinó el nivel del miR-483-5p en plasma.

MCH	Edad Inicio años	sexo	Antecedentes familiares	Grado NYHA	SIV mm	Mutación
3	51	H	Sí	IV	19	MYH7 R787>C
87	57	M	Sí	IV	17	MYBPC3 M844>FS
185	58	H	Sí	III	17	TNNT2 R92>Q
214	30	H	Sí	III	18	NO
219	34	M	No	III	19	MYBPC3 G1248>R
227	14	M	No	III	17	NO
229	75	H	No	III	18	NO
230	72	H	Sí	IV	22	NO
236	59	H	No	III	19	NO
239	42	H	No	IV	18	NO
242	29	M	No	III	21	NO
243	26	H	Sí	III	14	TNNI3 S199>R
244	25	M	Sí	III	26	MYH7 R403Q
247	38	H	Sí	III	22	MYBPC3 IVS16 +1G>A
250	64	H	No	III	29	NO
255	45	H	Sí	III	18	NO
257	49	M	Sí	III	19	MYBPC3 R773>H
263	49	H	Sí	III	24	MYBPC3 Q791>X
264	65	H	Sí	IV	31	MYBPC3 Q791>X
266	49	M	No	III	13	NO
267	57	H	No	III	27	NO
270	45	H	No	III	23	NO
273	47	M	Sí	III	21	NO
280	55	H	No	III	25	MYH7 R1261>W

M: Mujer

H: Hombre

Grado NYHA: Grado de disnea según la clasificación de la *New York Heart Association*.

SIV: Septo interventricular

Tabla 14. RQ (cuantificación relativa) de miR-483-5p frente al pool de controles. Mir-191 se empleó como normalizador del nivel en cada muestra.

MCH	RQ	RQ Min	RQ Max	Ct	SIV	Mutación
247	*523,398	277,64	986,70	20,39	22	SI
263	*27,664	16,87	45,36	28,93	24	SI
264	*13,034	2,61	65,17	34,82	31	SI
219	*490,684	178,07	1352,10	21,36	19	SI
87.1	*591,179	61,46	5686,61	22,32	17	SI
257	*4,243	1,67	10,76	32,62	19	SI
3	*10,854	5,45	21,61	28,28	19	SI
280	*6,774	3,81	12,03	33,33	19	SI
244	*2348,945	70,15	78649,81	20,23	26	SI
243	0,669	0,30	1,49	25,60	14	SI
185	15,34	0,80	295,80	27,18	17	SI
273	*1,575	1,19	2,09	29,44	21	NO
230	*11,492	3,20	41,32	28,11	22	NO
214	2,754	0,02	508,59	26,22	18	NO
227	0,106	0,03	0,33	30,71	17	NO
236	*32,072	16,15	63,69	22,73	19	NO
229	*1,800	1,04	3,12	26,19	18	NO
267	0,073	0,02	0,35	30,15	27	NO
239	0,226	0,01	5,43	32,38	18	NO
250	*411,106	318,48	530,68	27,21	29	NO
266	*8,038	5,08	12,71	33,76	13	NO
242	1,451	0,49	4,31	31,07	21	NO
255	*6,647	5,33	8,29	26,83	18	NO
270	0,305	0,21	0,44	30,32	23	NO

* RQ significativo, $p < 0.05$ (entre RQ mín. y RQ máx.).

SIV: Septo interventricular

Los portadores de mutaciones sarcoméricas ($n=11$) mostraban un RQ medio mayor que aquéllos en los que no hallamos mutaciones ($366,61 \pm 700,32$ vs. $36,74 \pm 112,82$), si bien la diferencia no era significativa ($p=0,06$) (**Figura 16**). La misma tendencia se observó entre los que tenían/no tenían antecedentes familiares de la enfermedad ($263,67 \pm 656,30$ vs. 86 ± 181 ; $p=0,09$). Además, los niveles medios de RQ eran significativamente mayores ($p=0,04$) entre individuos con hipertrofia severa ($SIV > 20\text{mm}$; $n=14$) ($83,29 \pm 1,95$ vs. $334,42 \pm 7,33$). Por otro lado, no se encontró ninguna asociación positiva y significativa entre el RQ medio y el grado funcional (NYHA), ni entre el RQ y la edad.

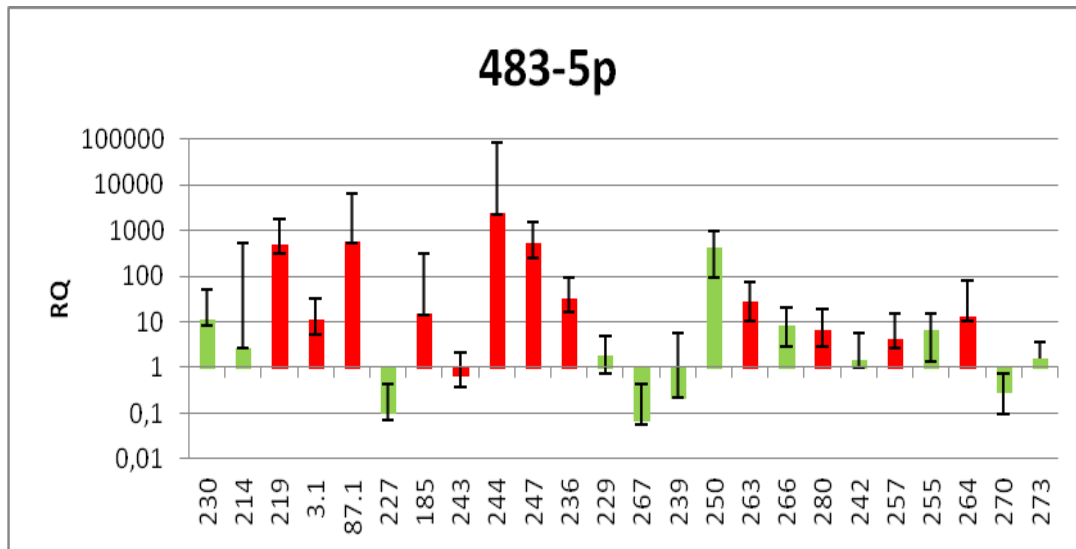


Figura 16. Representación gráfica de los valores de RQ obtenidos en los ensayos del miR-483-5p en plasma de pacientes MCH vs. el *pool* de controles, normalizados frente al miR-191. Las barras rojas representan los individuos portadores de mutaciones sarcoméricas y las verdes los no portadores.

6. MiR-483-5p en leucocitos.

Realizamos una búsqueda análisis online (base de datos www.microRNA.org) de la expresión del miR-483-5p en leucocitos, lo que podría explicar su presencia en el plasma. Además, incluimos miR-92a, miR-451, miR-30b, y miR-199-3p, que se habían encontrado sobreexpresados en el cribado mediante TLDA, y miR-590-5p, sobreexpresado en los tejidos y pero no en el plasma de los pacientes. Los resultados obtenidos se representan en la figura 17. MiR-483-5p es poco abundante en linfocitos, siendo por el contrario abundante en algunas células tumorales. Por el contrario, miR-92a es abundante en tejido linfocitario.

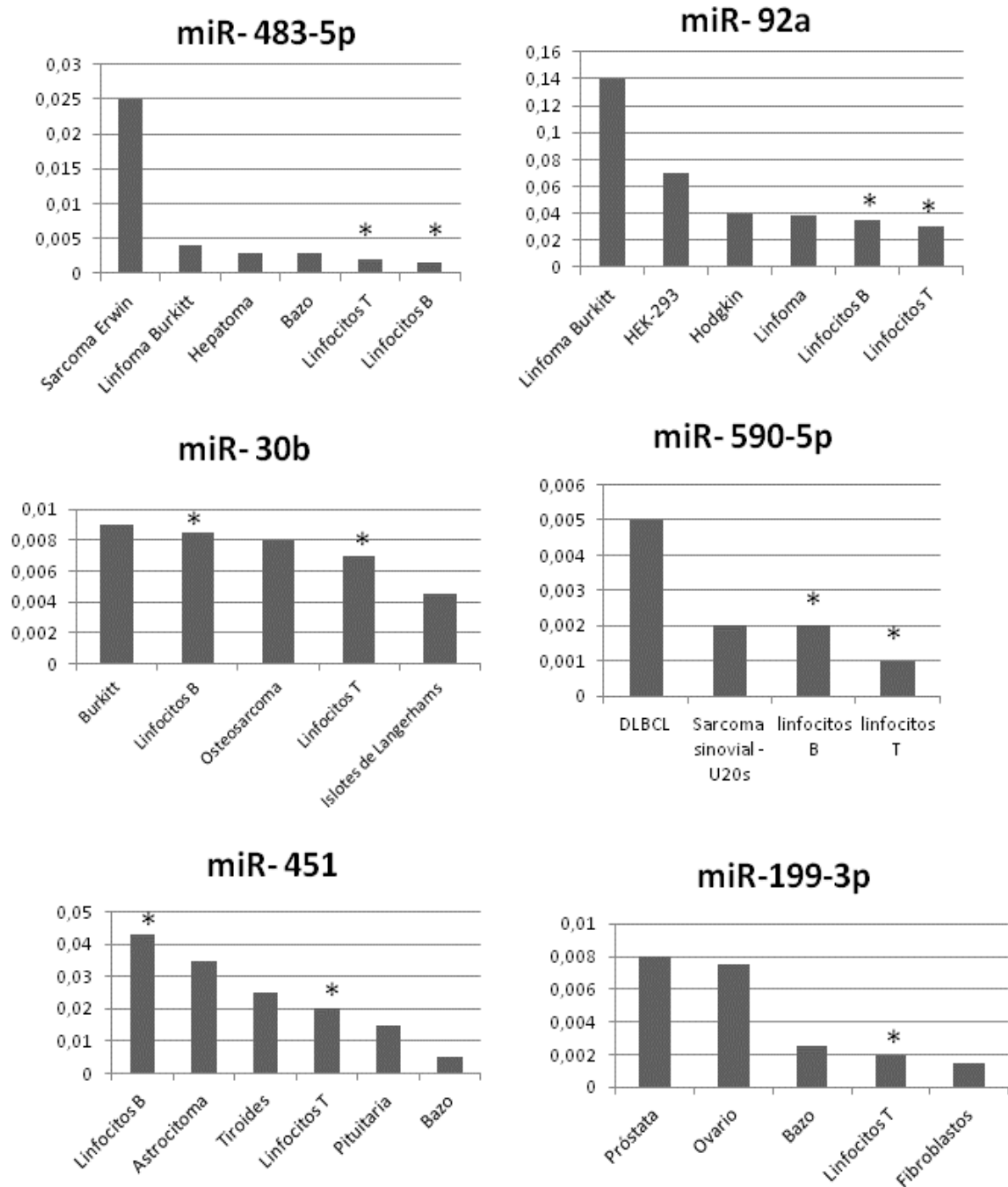


Figura 17. Niveles de miR-483-5p, miR-92a, miR-451, miR-30b, miR-199-3p y miR-590-5p en distintos tejidos. Eje de Ordenadas: Log. Abundancia tisular normalizada. Asteriscos, niveles en linfocitos. Fuente: microRNA.org. DLBCL: Linfoma de Linfocitos B Difuso.

Para confirmar que el miR-483-5p no se expresaba en leucocitos realizamos una cuantificación a partir de ARN de leucocitos de enfermos con MCH (3 pools de 4 casos) y controles (1 pool de 4 individuos). Además de este miRNA, determinamos los niveles leucocitarios de miR-590-5p, miR-92a, miR-451, miR-30b y miR-199-3p (Tabla 15). Sólo una de las muestras de pacientes amplificaba miR-483-5p, aunque con un valor de Ct medio en el límite ($Ct \leq 35$). Esto sugiere que los niveles del miRNA en el plasma no podrían explicarse por su expresión incrementada en las células sanguíneas de los pacientes.

Tabla 15. Ctm obtenidos en los ensayos con ARN de leucocitos.

Sample Name	Ctm U6	Ctm 92a	Ctm 590-5p	Ctm 483-5p	Ctm 30b	Ctm 451	Ctm 199-3P
pool mch1	23,4	32,3	35,7	>40	35,2	>40	>40
pool mch2	20,8	19,3	26,9	35,0	25,8	32,0	27,0
pool mch3	23,8	31,8	38,6	>40	36,5	39,9	38,1
pool ct	23,6	30,2	38,7	>40	36,1	36,6	35,5

7. Predicción de las funciones del mir-483-5p.

Se llevó a cabo una búsqueda informática (programa Miró) de patologías, fenotipos, funciones y procesos biológicos relacionados con miR-483-5p. Los resultados de este análisis se resumen en la **tabla 16**. En cuanto a los genes con dianas 3'UTR para este miRNA destacan: *IGF2* ya que es el gen “hospedador” del miR-483-5p y su co-expresión ha sido demostrada; *MYOM2* por ser un gen sarcomérico recientemente asociado a la MCD y *SRF*, que codifica el *Serum Response Factor* cuya expresión es esencial para el desarrollo cardiaco.

Tabla 16. Procesos patológicos que podrían ser regulados por miR-483-5p y genes candidatos que regularían estos procesos por contener dianas para este miRNA en sus 3'UTR.

	Nombre	Genes diana
Patologías/ Fenotipos asociados	Aterosclerosis coronaria	APOA4, LRP1
	>IMC	IGF2
	Mal-absorción de colesterol	APOA4
	Diabetes tipo I y II	IGF2
	Hipertensión	EDN-2 (Endotelina-2)
Funciones Asociadas	Unión de ATP	MAP2K7
	Unión de myosina y titina	MYOM2 (myomesina)
	Unión de ión Ca^{2+}	DSC2, (desmocolina 2)
Procesos biológicos	Antiapoptosis	BCL2, NOTCH3
	Crecimiento celular	NOTCH 2
	Desarrollo cardíaco	SRF
	Transporte de iones	KCNK6
	Angiogénesis	SRF

8. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos.

El estudio genético se ha basado en 245 pacientes con MCH (**Tabla 17**), que fueron analizados para los 5 genes sarcoméricos más frecuentemente mutados en esta enfermedad: *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, y *TPM1*.

Hallamos 40 pacientes MCH (16%) con al menos una mutación sarcomérica (**Tabla 18**). De estas, 4 eran mutaciones nuevas no descritas (en negrita) en las bases de datos genómicas (www.HGMD.org; www.cardiogenomics.org).

Tabla 17. Principales características de los pacientes con MCH, y con HVI secundaria a hipertensión (incluidos en el estudio de asociación a varios polimorfismos).

	MCH Totales N=245	MCH Familiar N=105 (43%)	MCH esporádico N=140	HVI- Hipertensos N=120
Media edad	46±13	37±18	43±19	58±17
Al diagnóstico				
Rango	8-76	8-72	21-76	35-75
Hombres	144(59%)	68(65%)	76(56%)	71(59%)
IMC				
Mujeres	26±4	25±3	26±3	28±5
Hombres	27±3	26±3	27±4	28±4
SIV	20±5	22±6	18±7	15±5
Pared posterior	13±5	14±5	11±6	10±6
Pared Izquierda	34±6	36±6	30±6	26±6
Disnea	168(69%)	78(74%)	90(64%)	36(30%)
Índice NYHA				
Clase I-II	120(49%)	49(47%)	71(51%)	102(85%)
Clase III-IV	48(20%)	29(28%)	19(14%)	18(15%)
Angina	96(39%)	53(50%)	43(31%)	19(16%)
Síncope	48(20%)	25(24%)	23(16%)	7(6%)
Fibrilación atrial	47(19%)	23(22%)	24(17%)	18(15%)
Arritmias	55(22%)	21(20%)	34(24%)	27(18%)
Gradiente >30mmHg	72(29%)	34(32%)	38(27%)	36(30%)
Mutaciones Sarcoméricas	40(16%)	30(29%)	10(7%)	No Determinadas
MYH7	12(5%)	11(10%)	1(<1%)	
MYBPC3	23(9%)	16(15%)	7(5%)	
TNNT2	4(2%)	2(2%)	2(1%)	
TPM1	1(<1%)	1(1%)	0	

IMC: Índice de Masa corporal

SIV: Septo interventricular

Índice NHYA:

Tabla 18. Mutaciones halladas en los 5 genes sarcoméricos.

Gen	Mutación	Exón	Casos N
MYBPC3	R17Q	3	1
MYBPC3	A216T	6	1
MYBPC3	Y237C	7	1
MYBPC3	G263X	8	3
MYBPC3	A328fs	13	1
MYBPC3	Q404fs	14	1
MYBPC3	R495W	18	1
MYBPC3	G531R	18	1
MYBPC3	G532fs	18	1
MYBPC3	E542Q	18	3
MYBPC3	A627V	24	1
MYBPC3	R726C	24	1
MYBPC3	V771M	25	1
MYBPC3	Q791X	25	1
MYBPC3	M844fs	26	1
MYBPC3	R891fs	27	1
MYBPC3	Q998E	29	1
MYBPC3	R1022S	30	1
MYBPC3	R1080H	30	1
<i>Total MYBPC3 (%)</i>	19 (58%)	-	23 (9%)

Gen	Mutación	Exón	Casos N
MYH7	A100T	4	1
MYH7	F247L	9	1
MYH7	R453C	14	1
MYH7	A583V	16	2
MYH7	R663H	18	1
MYH7	R723G	20	1
MYH7	R787C	21	1
MYH7	A797T	21	1
MYH7	M822V	22	1
MYH7	P828S	22	1
MYH7	R870H	22	1
<i>Total MYH7</i>	11 (33%)	-	12 (5%)
TNNT2	R92Q	9	3
TNNT2	R278C	16	1
<i>Total TNNT2</i>	2(6)	-	4(2%)
TPM1	D175N	5	1
<i>Total TPM1</i>	1(3)	-	1(<1%)

Además de las regiones codificadoras e intrónicas flanqueantes, analizamos las secuencias 3'UTR de los genes *MYH7*, *MYBPC3* y *TNNT2* que podrían regular la expresión génica mediante unión a miRNAs. Cambios nucleotídicos en estas regiones podría tener así un efecto patogénico. El análisis mediante SSCA y secuenciación mostró 7 variantes, tres nuevas (**Figura 18**).

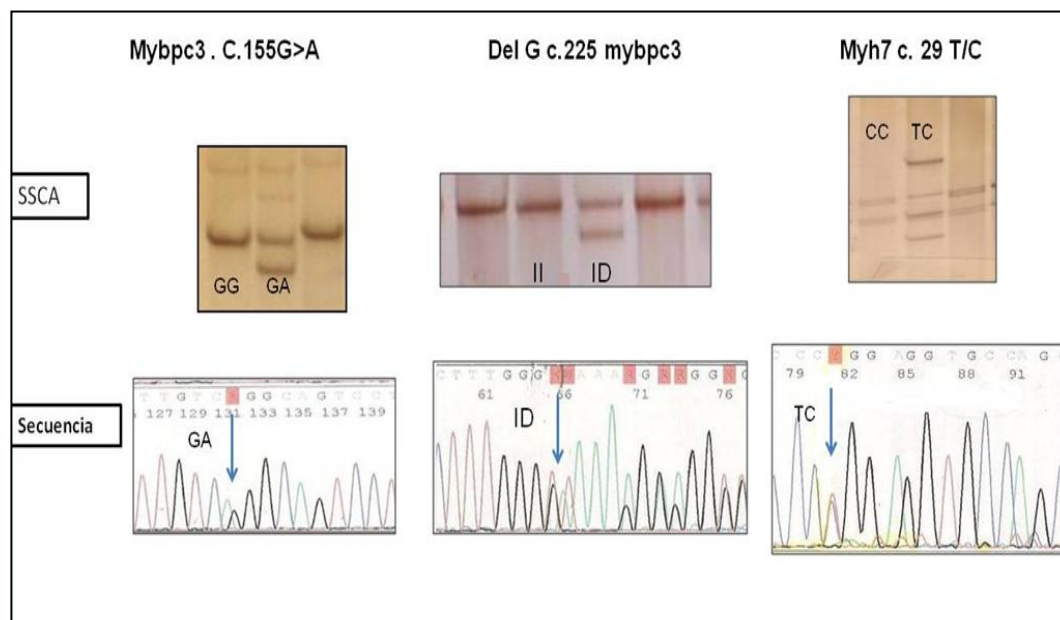


Figura 18. SSCA y electroferograma de los cambios no descritos en la región 3'UTR de los genes sarcoméricos *MYH7* y *MYBPC3*.

Ninguno de estos cambios fue hallado en los controles (**Tabla 19**). De los cambios hallados tanto en pacientes como en controles, los portadores de rs3729998 A (todos heterocigotos) eran significativamente más frecuentes en los pacientes ($p < 0.001$). El análisis online indica que este polimorfismo afectaría a la unión a miR-637. **Figura 19.** Además, está en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo K253R en el exón 14, habiendo sido el alelo R a un mayor riesgo de MCH por algunos autores. Por tanto, cabe la posibilidad de que el efecto de la variante en 3'UTR se deba a su desequilibrio con esta variante exónica. Por otro lado, el polimorfismo rs45548631 sólo fue encontrado en un paciente y no se encontró en ninguno de los controles por lo que no podemos descartar que se trate de un polimorfismo poco frecuente de riesgo para la MCH en nuestra población. En este caso este polimorfismo no se encuentra localizado en ninguna región diana para miRNAs, además no se ha descrito hasta la fecha la existencia de algún haplotipo asociado al riesgo de MCH que incluya este polimorfismo.

Tabla 19. Variación genética en las 3'UTR de los genes *MYBPC3*, *MYH7*, y *TNNT2*.

Gen	Variante	Genotipo	Frecuencia MCH N=245 (tanto por 1)	Frecuencia controles N=250 (tanto por 1)	Frecuencia * 1000 genomes (EU)
<i>MYBPC3</i>	c.*155 G>A	GG	244	250	-
		GA	1	0	
		AA	0	0	
<i>MYBPC3</i>	c.*225 del G (D=delG)	II	244	250	-
		ID	1	0	
		DD	0	0	
<i>MYH7</i>	c.*29 C>T	CC	244	250	-
		TC	1	0	
		TT	0	0	
	rs45548631	GG	244	250	0,99
		GA	1	0	0,01
		AA	0	0	0
	rs17794387	GG	241 (0,98)	245 (0,98)	0,89
		GA	4 (0,02)	5 (0,02)	0,11
		AA	0	0	0
<i>TNNT2</i>	rs3730244	CC	235 (0,96)	250 (0,98)	0,89
		TC	10 (0,04)	4 (0,02)	0,11
		TT	0	0	0
	rs3729998**	GG	233 (0,95)	248 (0,99)	0,94
		GA	12(0,05)	2 (0,01)	0,06
		AA	0	0	0

* Datos obtenidos de www.ensembl.org

** **SNP en desequilibrio con rs3730238** (exón 14, K253R)

p=0,006 OR=6,3 (1,4 -28,8) AA+GA vs. GG; MCH vs. Controles

p=0,0065 OR=6,2 (1,39-28,1) A vs. G; MCH vs. Controles



Figura 19. Localización del polimorfismo rs3729998 de la 3'UTR del gen *TNNT2* y su complementariedad con región semilla del miR-637.

Ninguno de los tres 3 pacientes con variantes nuevas tenía mutación sarcomérica. Los tres eran casos con inicio a edad temprana, septos por debajo de 18 mm, y grados NYHA I-II (Tabla 20). Dado que no tenían antecedentes familiares, no pudimos estudiar la segregación de estas variantes con la enfermedad (**Tabla 20**).

Tabla 20. Características de los pacientes portadores de variantes no descritas en las regiones 3'UTR.

Gen	Variante	Edad inicio	Mutacion Sarcomerica	Antecedentes	SIV (mm)	NYHA	Diana miRNA
MYBPC3	c.*155 G>A	45	No	No	13	I-II	No
MYBPC3	c.*225 del G	44	No	No	17	I-II	miR-186*
MYH7	c.*29 T>C	50	No	No	15	I-II	No

De las variantes nuevas (no descritas), sólo la delección de una G en MYBPC3 afectaría a un sitio de unión para un miRNA conocido, miR-186. Aunque este miRNA se ha encontrado desregulado en el miocardio de enfermos con IAM, no se ha descrito su implicación en la hipertrofia cardiaca (**figura 20**).

	hsa-miR-186*
	16.4636:204:14647
	ggguuuuuuaagUGGAAACCCg
	:
H. Sapiens] CU-----GAAGGAAGCCCCUGGAUCUUUGGGGUAAAAGGAGGGU
M. Mulatta] CU-----GAAGGAAGCUCUGGAUCUUUGGGGUAAAAGGAGgGU
B. Taurus] CA-----UGC GGAAGCUCUCAGACCCU-----GuGU
C. Familiaris] CC-----ACUGGCCGCUCUCUGG-CCUUGGGACAAGAAGUUGuGU
M. Musculus] CC-----UAAGGAUAAUGUUA-AUACUGGGAGCAUAAAAGUGuGU
R. Norvedicus] CC-----AAGGAGUGCUGUUA-ACAUUGGGAGCAUAAAAGUGuGC
M. Domestica] CUCUAAGGACAAGAAGUUGCU-----CUUAGGGAGAAAAGGCCuGA

Figura 20. Conservación de la región 3'UTR del *MYBPC3* y complementariedad con el miR-186. La delección de G (puntos) afectaría a toda la secuencia “semilla” de miR-186.

9. Variación Genética en los myo-miRs.

El análisis de los pacientes MCH mediante SSCA mostró patrones electroforéticos heterogéneos para los fragmentos de miR-208a, miR-208b, miR-133a1, y miR-133b. Identificamos los cambios responsables de los patrones SSCA mediante secuenciación (**Figura 21**).

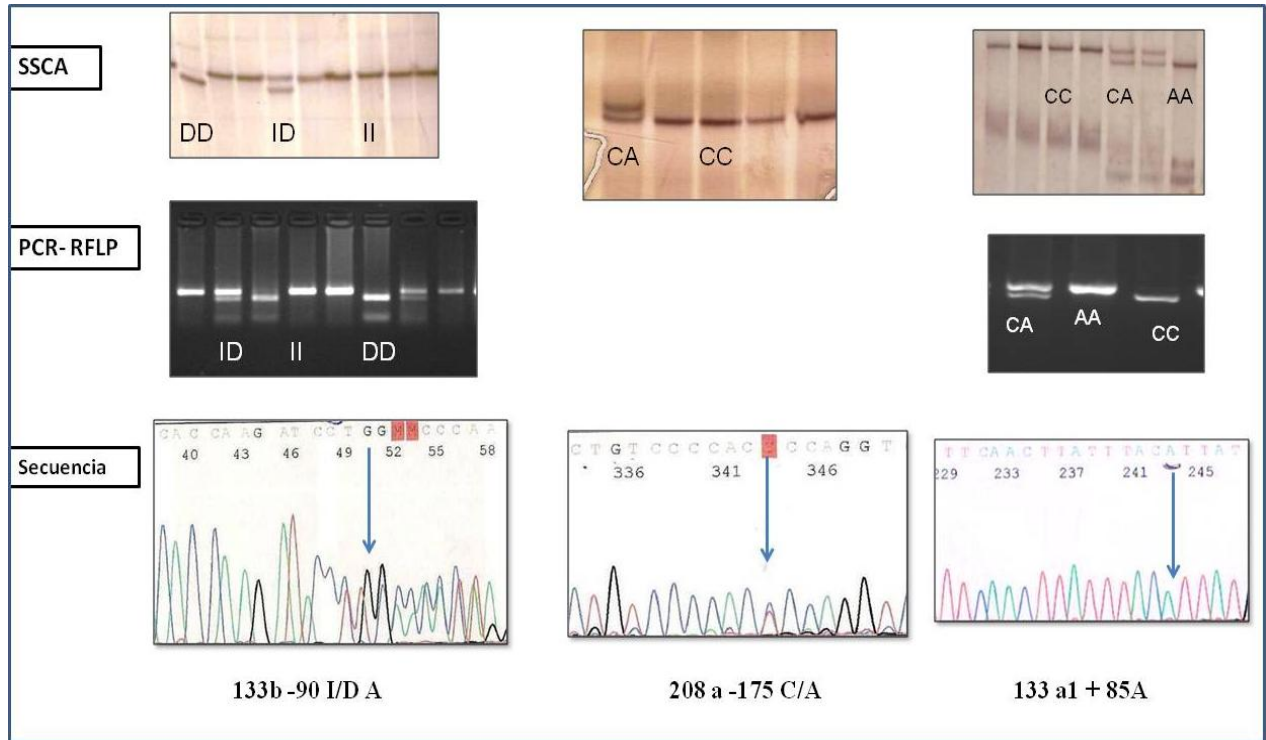


Figura 21. SSCA, PCR-RFLP y electroferogramas de los polimorfismos en miR-133b, 133-a1, y 208a.

Se encontraron en total 7 cambios nucleotídicos, 2 de ellos no descritos en la literatura: +85C en miR-133a1 y -90del en miR-133b (posiciones numeradas a partir del RNA maduro, siendo -1 y + 1 el primer nucleótido 3' y 5' respectivamente). Todas las variantes fueron genotipadas en los pacientes y en 250 controles SSCA o digestión del fragmento de PCR con una enzima de restricción (PCR-RFLP) (**Figura 21**). Las frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes (con y sin mutación sarcomérica identificada), controles, y pacientes con HVI secundaria a hipertensión se recogen en la **tabla 21**.

Tabla 21. Variantes identificadas en los myo-miRs y frecuencias genotípicas y alélicas en los pacientes y controles.

Variante	Genotipo/ Alelos	MCH no mut N=205	MCH mut N=40	HVI N=120	Controles N=250
133 a1 + 85C>A*	CC	182(88%)	38(95%)	116(97%)	237(95%)
	AC	20(10%)	2(5%)	4(3%)	13(5%)
	AA	3(2%)	0	0	0
	C	0,94	0,97	0,98	0,97
	A	0,06	0,03	0,02	0,03
133 a2 -191G>A rs45547937	GG	131(64%)	26(65%)	72(60%)	158(63%)
	AG	66(32%)	12(30%)	41(34%)	82(33%)
	AA	8(4%)	2(5%)	7(6%)	10(4%)
	G	0,80	0,80	0,77	0,82
	A	0,20	0,20	0,23	0,18
133b -90 del A **	Ins/ins	187(91%)	37(92%)	99(83%)	230(92%)
	Ins/del	18(9%)	3(8%)	18(15%)	19(7,6%)
	del/del	0	0	3(2%)	1(0,4%)
	Ins	0,96	0,96	0,90	0,95
	Del	0,04	0,04	0,10	0,05
208a -175C>A rs28730766	CC	204	40	120	250
	CA	1	0	0	0
	AA	0	0	0	0
208b +95C>T rs45489294	CC	200(98%)	38(95%)	116(97%)	244(98%)
	CT	5(9%)	2(5%)	4(15%)	6(2%)
	TT	0	0	0(2%)	0
	C	0,99	0,97	0,98	0,90
	T	0,01	0,03	0,02	0,10

***MCH sin mutación sarcomérica vs. Controles:**

p=0.02, OR=2.30 (1.13-4.67), AA+AC vs. CC.

p= 0.006, OR= 2.53 (1.28-5.01), A vs. C.

**** HVI vs. Controles:**

p=0.03, OR=1.99 (1.06-3.76), del/del + ins/del vs. ins/ins,

p=0.01, OR= 2.11 (1.18-3.78) ins vs.del.

9.1. Variación genética en miR-133-a1:

El análisis del miR-133-a1 reveló 3 patrones electroforéticos que correspondían a cada uno de los genotipos de una variante no descrita previamente, C>A en la posición +85 (a partir del 5' del miRNA maduro). Los portadores del alelo miR-133a1 +85A eran significativamente más frecuentes entre los pacientes MCH sin mutación sarcomérica, respecto a los controles sanos (AA+AC vs. CC; p=0.02; OR=2.30, 95% CI=1.13-4.67). Por tanto, este polimorfismo podría contribuir al riesgo de MCH en nuestra población.

9.2. Variación genética en miR-133b.

En la secuencia flanqueante a miR-133b también se encontraron distintos patrones electroforéticos que correspondían una delección de A en la posición -90. El genotipado de esta variante en pacientes y controles reveló que los portadores de La delección A eran significativamente más frecuentes entre los pacientes con HVI secundaria ($p=0,03$), lo que sugiere un posible efecto sobre el riesgo de hipertrofia entre sujetos hipertensos (**Tabla 21**).

9.3. Variación genética en miR-133a2.

En cuanto a la variación en miR-133a2 hemos encontrado 3 polimorfismos que ya habían sido descritos: -191 G/A (SNP número de referencia rs45547937), -171G/A (rs13040566), -88 G/A (rs13040413), and +78 T/C (rs6062251). La secuenciación de sujetos con patrones electroforéticos diferentes mostró que existen sólo 3 combinaciones de los tres primeros: -191AA/-171AA/-88AA, -191AG/-171AG/-88AG, y -191GG/-171GG/-88G, lo que sugiere un desequilibrio de ligamiento completo para los 3 polimorfismos. El análisis de las frecuencias en pacientes y controles no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles, por lo que estas variantes parecen no contribuir al riesgo de MCH o HVI en nuestra población.

9.4. Variación genética en miR-208a.

En el estudio de miR-208a hemos encontrado una variante genética rara, -175 C>A (rs28730766) en una mujer de 66 años con MCH severa (26 mm; NYHA=III-IV), sin mutación sarcomérica caracterizada, y sin antecedentes familiares por lo que no pudimos determinar la segregación con la enfermedad en su familia.

9.5. Variación genética en miR-208b.

En el cribado de miR-208b mediante SSCA hallamos 2 patrones electroforéticos diferentes, que correspondían a los genotipos CC y CT del polimorfismo rs45489294 (+95 C/T). No hallamos diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas en los pacientes y controles, lo que indica que esta variante no contribuiría al riesgo de MCH ni de HVI en nuestra población.

9.6. Variación genética en miR-1.1 y miR-1.2.

Los patrones electroforéticos para el miR-1.1 y el miR-1.2 en los pacientes y controles fueron idénticos, sugiriendo que no existe variación en estos miRNAs y sus secuencias flanqueantes.

10. Posible efecto funcional de las variantes de los myo-miRs.

El efecto sobre la estructura del ARN de los cambios que mostraron asociación con la enfermedad se analizó mediante el programa *mfold*. Las tres variantes afectarían a la estructura secundaria del pri-miRNA, lo que podría traducirse en diferencias en la eficiencia del procesamiento a pre-miRNA y los niveles de miRNA maduro (**Figura 22**).

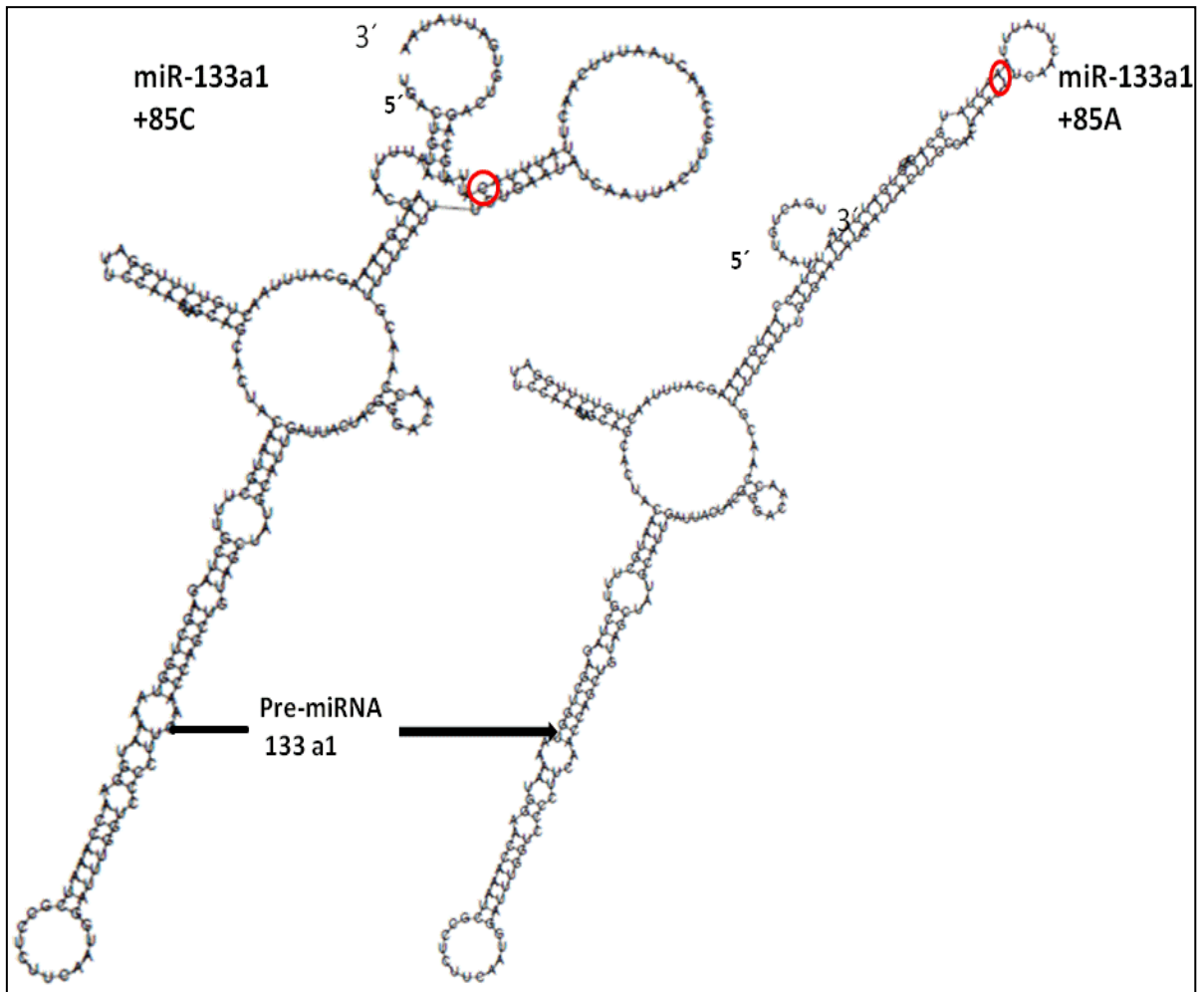
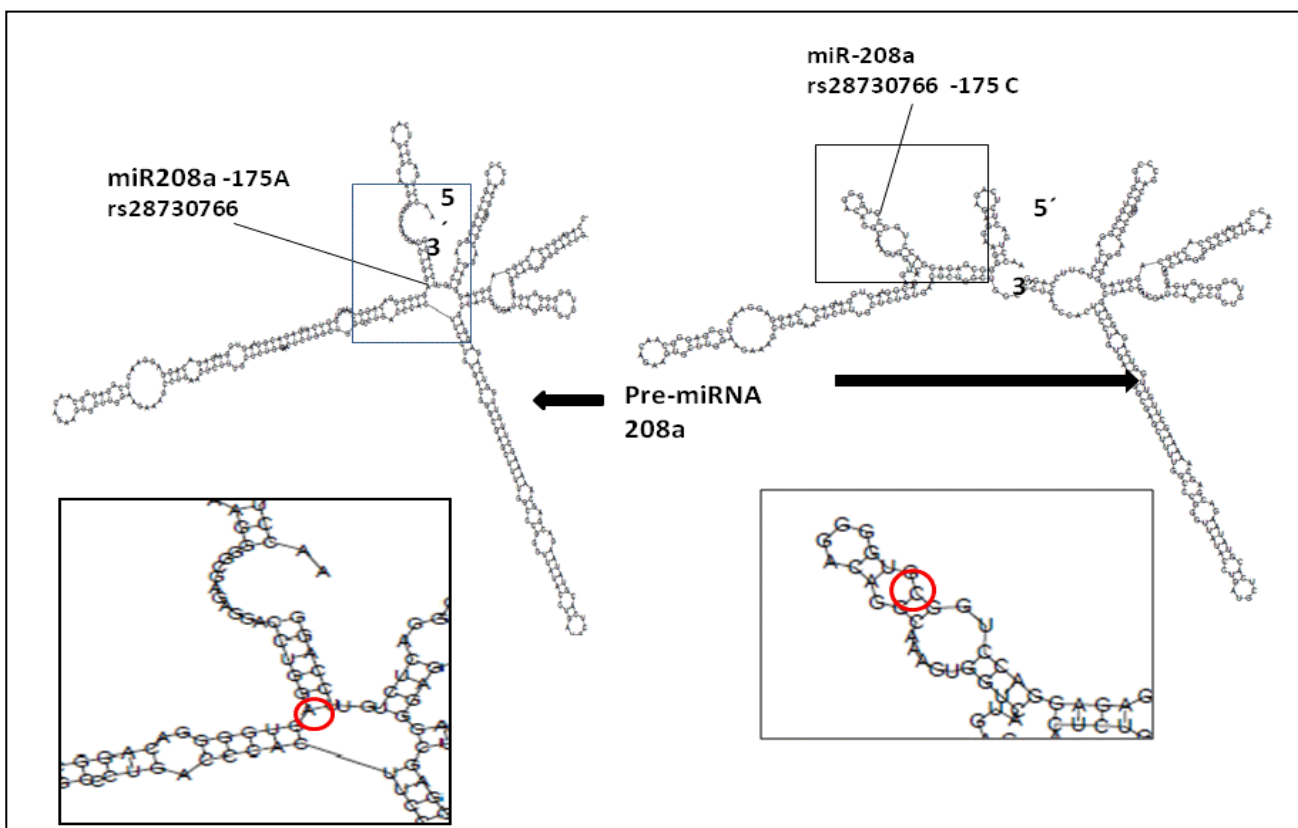
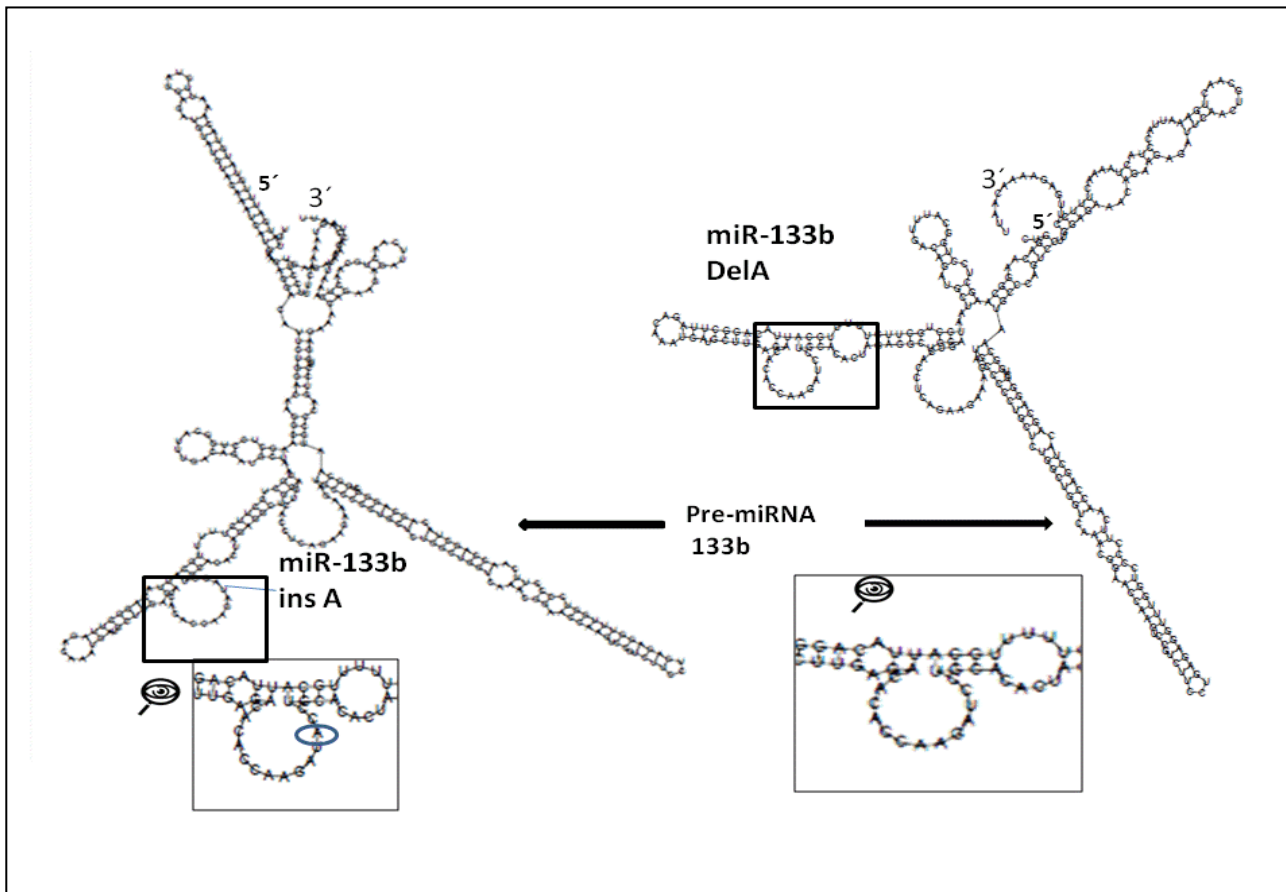


Figura 22. Estructura secundaria de los pri-miRNAs 133a1, 133b, y 208a. Se indican las regiones 5' y 3' y las regiones pre-miRNA.



Continuación figura 22. Estructura secundaria de los pri-miRNAs 133a1, 133b, y 208a. Se indican las regiones 5' y 3' y las regiones pre-miRNA.

Estas variantes podrían también regular la expresión a través de su unión a factores de transcripción, por lo que realizamos un análisis online con el programa *TFsearch*: sólo el cambio -90 ins/del A del miR-133b afectaría a sitios de unión a factores de transcripción (**Figura 23**).

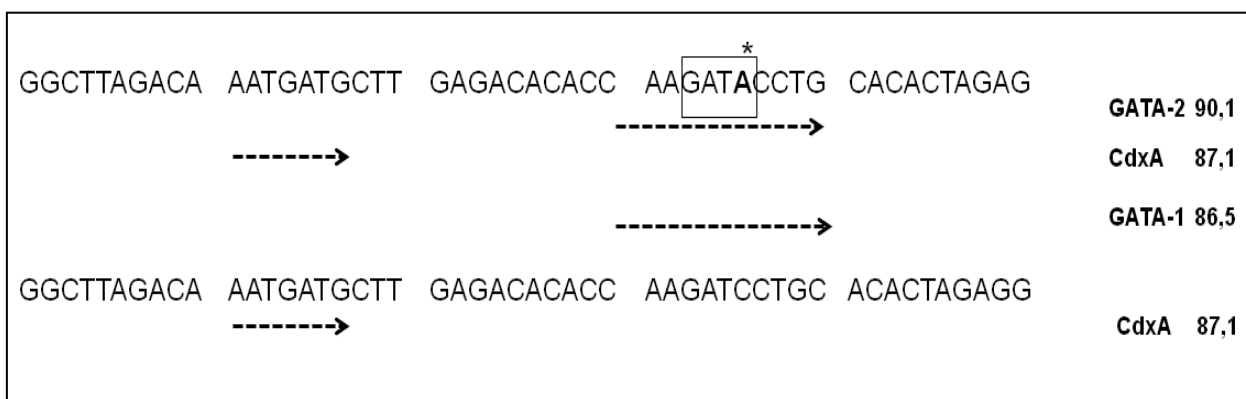


Figura 23. Predicción (*TFsearch*) de los factores de transcripción que reconocerían las dos secuencias del gen miR-133b.

11. Polimorfismo *AGTR1* rs5182.

Los pacientes y controles fueron genotipados mediante PCR-RFLP para el polimorfismo en 3'UTR de *AGTR1* (rs5182) (**Figura 24**).

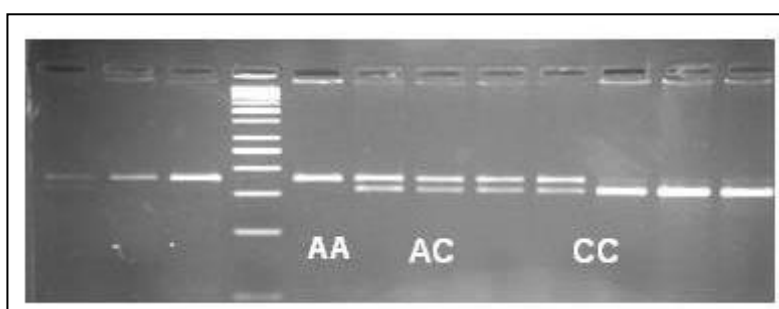


Figura 24. Patrón electroforético del polimorfismo rs5182.

Se trata de un cambio en la región 3'UTR del gen que varios estudios han relacionado con patologías cardiovasculares. Los portadores del alelo C eran más frecuentes entre los pacientes MCH ($p=0,03$), y esta diferencia era mayor entre los pacientes sin mutación sarcomérica y los controles ($p=0,01$) (**Tabla 22**).

Tabla 22. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs5182.

Rs5182	MCH	MCH	HVI	Controles
	Sin mut N=205	Con mut N=40		
AA	84(41%)	21(52,5%)	60(50%)	132(53%)
AC	94(46%)	14(35%)	49(41%)	93(37%)
CC	27(13%)	5(12,5%)	11(9%)	25(10%)
A	0,64	0,70	0,70	0,71
C	0,36	0,30	0,30	0,29

CC+AC vs. AA, MCH-sin mut vs. cont: $p=0,01$; OR= 1,6; 95% CI: 1,109-2.33.

Por otro lado, entre los pacientes MCH los portadores del alelo C tenían un septo interventricular significativamente mayor que los no portadores (**Tabla 23**).

Tabla 23. Características de los pacientes en función del polimorfismo rs5182. SIV=septo interventricular, IMC=índice de masa corporal.

	Antecedentes	SIV*	Pared posterior	Pared ventricular	Edad	IMC
MCH no portadores						
CC (n=27)	10(37%)	21±4	13±3	34±5	49±18	26±5
AC(n=94)	40(43%)	21±5	13±4	33±4	46±18	27±4
AA(n=84)	25(30%)	19±5	13±4	32±4	48±16	27±5
MCH portadores						
CC (n=5)	4(80%)	23±4	16±3	39±4	38±4	21±4
AC(n=14)	12(86%)	22±5	14±5	35±5	36±5	21±5
AA(n=21)	14(67%)	18±5	14±4	31±5	45±5	20±5
HVI- Hipertensiva						
CC(n=11)	ND	16±4	10±5	25±5	60±8	28±2
AC(n =60)	ND	16±3	9±4	25±4	58±7	27±2
AA(n=72)	ND	15±2	10±5	24±4	58±	28±3

*SIV medio, CC+AC vs. AA: $p=0,016$, sin mutación; $p=0,017$, con mutación.

El análisis online de la región 3'UTR reveló que este polimorfismo afectaría a un sitio de unión para miR-155 (**Figura 25**). En concreto, el alelo C reduciría la afinidad del miRNA por su secuencia diana, lo que podría traducirse en menor capacidad para reprimir la expresión del gen.

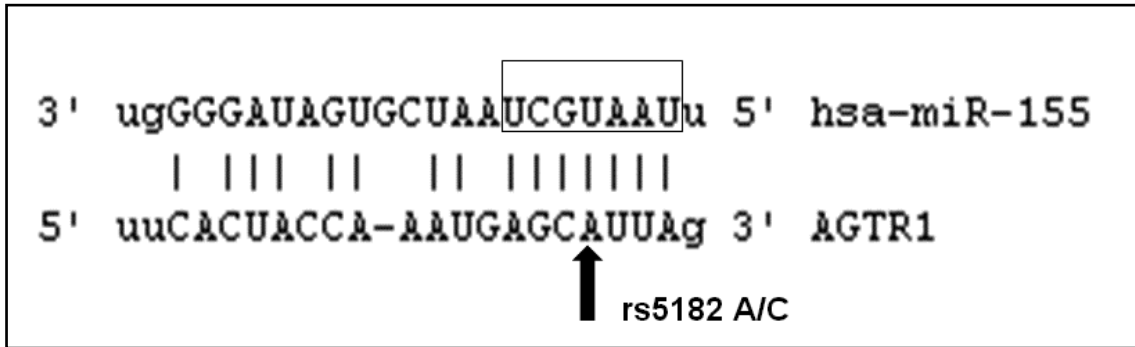


Figura 25. Localización del polimorfismo A/C en la región 3'UTR de *AGTR1* y su complementariedad con región semilla del miR-155.

Discusión

Discusión

MiRNAS en tejido cardiaco.

Para definir el perfil de expresión de miRNAS en un tejido concreto se ha acuñado el término miRNoma. Los estudios más completos se han realizado en el cáncer. Las enfermedades oncológicas tienen la ventaja de poder acceder al tejido patológico y normal del mismo paciente, o al tejido tumoral en distintas fases de la enfermedad. Esto es difícil (cuando no imposible) en otras patologías en las que los tejidos enfermo y sano deben proceder de sujetos diferentes. El miRNoma es dinámico, variando con la etiología, la edad y la progresión de la enfermedad, lo que constituye una limitación adicional en los estudios sobre enfermedades no oncológicas. En nuestro caso, hemos comenzado por comparar el perfil de expresión de miRNAs en el corazón de pacientes con MCH (trasplantados) y mutaciones sarcoméricas respecto a un corazón normal (sano) comercializado. Por tanto, se trata de un tejido control disponible para otros análisis por lo que puede ser tomado como referencia para comparar los resultados obtenidos por otros investigadores. Por otro lado, no hay ningún estudio publicado que haya analizado el miRNoma de pacientes con mutaciones sarcoméricas.

En el análisis de los 384 miRNAs mediante *TLDA-A* la mayoría de los detectados se hallaron con una expresión reducida en el tejido patológico respecto al corazón sano. Nos centramos en 19 miRNAs cuyos niveles diferían significativamente entre los dos tejidos, que fueron analizados individualmente en muestras de pacientes con diferentes enfermedades cardiacas. Todos ellos se hallaron en el tejido control, con valores CT entre 14 y 19 ciclos. A excepción de miR-306, miR-374 y miR-454, se trata de miRNAs cuya expresión es característica del tejido cardiaco.(Luo y cols., 2010)

El perfil de expresión de estos miRNAS difería entre pacientes con fallo cardiaco de origen isquémico y los hipertróficos. En los isquémicos había una sobreexpresión de miR-208a, miR-208b y miR-1, ya relacionados por otros autores con la cardiopatía isquémica.(Ai y cols., 2010)Por otro lado, miR-133a se halló subexpresado en estos pacientes, hecho ya constatado por otros investigadores.(Bostjancic y cols., 2009) Por el contrario, en los pacientes con MCH los miRNAs de las familias -133 y -1 estaban menos expresados. Estos han sido relacionados con en el desarrollo del corazón, con niveles reducidos en fases embrionarias y más elevados en el corazón adulto (Thum y

cols., 2007; Bostjancic y cols., 2009). Como veremos más adelante, la presencia de estos y otros miRNAs cardiacos en el plasma es característica de procesos isquémicos en los que la muerte del cardiomiocito libera sus contenidos a la sangre. Niveles bajos de estos miRNAs, y en particular de los miR-133, son característicos de los procesos de hipertrofia cardiaca originados por diferentes estímulos, y concuerdan con el modelo de regresión a un programa embrionario de expresión génica que caracteriza a esta enfermedad (Dong y cols., 2010). Por otro lado, la sobre-expresión de los miR-133 inhibe la hipertrofia cardiaca, lo que pone en relieve su papel en el origen de esta enfermedad (Care y cols., 2007)

El miR-495 sería particularmente relevante dado que se halló menos expresado en los dos pacientes con MCH, comparado con el resto de tejidos patológicos (incluidos los de HVI secundaria). Este miRNA estaría sobreexpresado en tejido de pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). (Eisenberg y cols., 2007). Se trata de una enfermedad con herencia ligada al cromosoma X, por mutaciones en la distrofina. La mayoría de los pacientes con DMD manifiestan miocardiopatía dilatada (McNally 2007). Además, mutaciones en el gen de la distrofina se han asociado directamente con el riesgo de MCD (Muntoni y cols., 1993; Ortiz-Lopez y cols., 1997). La distrofina es una proteína estructural que une los complejos de actina de la fibra muscular a la matriz extracelular. En el cardiomiocito la ausencia de esta proteína resulta en una fragilidad de la membrana, haciéndola más sensible al daño mecánico durante la contracción muscular. Al igual que sucede con las mutaciones sarcoméricas, en el corazón la distrofina mutada reduciría la capacidad contráctil. Aunque la desregulación de los niveles de miR-495 podría ser característica de deficiencias en la capacidad contráctil por mutaciones en genes sarcoméricos, no hay estudios sobre músculo no cardiaco en pacientes con mutaciones sarcoméricas ni de tejido cardiaco en pacientes con distrofias musculares.

Por otro lado, la reducción de los niveles de miR-495 en el tejido HCM podría contribuir a una expresión de proteínas codificadas por genes regulados por este miRNA. Por ejemplo, la 3'UTR de *EDNI* (endotelina-1) tiene varios sitios de unión, y la sobreexpresión de este vasoconstrictor induce el crecimiento de los cardiomiocitos y el desarrollo de la hipertrofia cardiaca. (Ito y cols., 1991)

En cuanto a miR-208a y miR-208b observamos sobreexpresión en los pacientes con enfermedad isquémica, resultados que coinciden con los publicados en la literatura (Bostjancic y cols., 2009; Corsten y cols., 2010). Sin embargo, en los pacientes con

cardiopatías no isquémicas miR-208b se encontraba infraexpresado, de forma más acusada en los corazones con HVI secundaria. En los ratones se ha descrito que en condiciones de estrés por ausencia de hormona tiroidea estos miRNAs dirigen el cambio de fibras rápidas a fibras lentas, más abundantes en corazones fetales (van Rooij y cols., 2009). Este mecanismo de *encendido/apagado* del programa fetal dirigido por los myoMIRs en respuesta al estrés es importante en la MCH ya que, como se ha comentado anteriormente, la respuesta hipertrófica desencadena la activación de genes fetales en el corazón adulto. Se ha descrito que la sobreexpresión de miR-208a en modelos murinos es suficiente para la inducir hipertrofia, por el contrario la depleción de este miRNA sería un mecanismo protector de la respuesta hipertrófica a corto plazo, aunque a largo plazo producía defectos en la contractilidad.(Callis y cols., 2009). Como se ha comentado en la introducción, los miR-208a, miR-208b y miR-499b están codificados en intrones de los genes *MYH6*, *MYH7*, y *MYH7b* respectivamente, por lo que se encuentran bajo la regulación de sus promotores. Se ha comprobado en modelos murinos, que bajo condiciones de estrés por ausencia de hormona tiroidea estos miRNAs (myo-miRs) dirigen el cambio de fibras rápidas a fibras lentas, más abundantes en corazones fetales. En el corazón murino adulto predominan las fibras rápidas de α miosina, codificadas por el gen *MYH6*, el cual hospeda el gen que codifica para miR-208a. Este miRNA en condiciones normales (ausencia de estrés) es requerido para la activación constitutiva de *MYH7b*, que hospeda al miR-499b. Esta homeostasis del programa adulto se mantiene además por la presencia de unos inhibidores de la expresión de *MYH7*, (inhibidores de genes lentos, como Sp3, Sox 6, Tharp) los cuales presentan dianas para myo-miRs en sus regiones 3'UTR. La inducción de estrés desencadena la activación por el miR-208a del gen *MYH7*. En el gen *MYH7* reside miR-208b, capaz de bloquear a los inhibidores de genes lentos. Esto resultará en una retroalimentación positiva a favor de la reactivación del programa fetal de fibras lentas (más β miosina y menos α miosina), conduciendo a la hipertrofia cardiaca.(van Rooij y cols., 2009). Este mecanismo de *“encendido/apagado”* del programa fetal dirigido por los myo-miRs en respuesta al estrés, es importante en la MCH ya que como se ha comentado anteriormente, la respuesta hipertrófica se desencadena por la activación de genes fetales en el corazón adulto. Estos estudios demuestran el papel principal de los myo-miRS para modular la función cardiaca durante la patología.

A diferencia de otros estudios, hemos analizado el perfil de expresión de miRNAs en tejido patológico de pacientes con MCH y mutación sarcomérica. Aunque se tratan de

resultados novedosos, nos basamos en sólo dos pacientes por lo que sería fundamental analizar series más amplias para confirmar la existencia de diferencias entre los miRNomas de pacientes con y sin mutaciones. Más aún, dado que los dos casos tenían mutaciones en *MYH7* no podemos excluir que haya diferencias en la expresión según el gen mutado. Por otro lado, los tejidos estudiados procedían de pacientes con hipertrofia avanzada y con alto grado de fibrosis, por lo que no podemos obtener conclusiones sobre el miRNoma de las fases iniciales e intermedias del proceso (que por otro lado serían difíciles de analizar ya que no suele disponerse de corazones de pacientes en esas etapas).

MiRNAs en plasma

La detección de miRNAs como marcadores sanguíneos ha sido propuesta en varias patologías, especialmente oncológicas. La presencia de miRNAs específicos de tejidos en la sangre sería una consecuencia de un proceso de excitosis o de muerte celular que liberaría moléculas intracelulares al torrente sanguíneo. En las enfermedades cardíacas serían útiles en procesos isquémicos ya que algunos myo-miRs (miRNAs característicos del tejido cardíaco) como miR-499, -133, y -208a se han detectado en el plasma de pacientes que habían sufrido IAM estando ausentes o menos representados en sujetos sanos. Además, el grado de expresión de estos miRNAs correlacionaba con los niveles de Troponina T circulante, un marcador de diagnóstico de infarto (De Rosa y cols., 2011).

En el caso de la MCH no se han publicado estudios sobre el perfil de miRNAs en sangre de pacientes comparados con sujetos sanos. Por tanto, nuestro estudio sería el primero en abordar este aspecto. Para ello, hemos determinado el perfil de miRNAs plasmáticos en un grupo de pacientes y controles mediante *TLDA-A*. Hallamos 5 sobre-representados en los pacientes, que fueron analizados en una muestra más amplia de pacientes y controles. Finalmente, sólo miR-483-5p estaba significativamente incrementado (valores medios) en los pacientes, y fue detectado ($CT < 35$) en todos ellos y en el 72% (18/25) de los controles. Por tanto, este miRNA podría ser útil como marcador circulante en la MCH. Sin embargo, el hecho de que haya un solapamiento entre los niveles de pacientes y controles cuestiona su utilidad y hace necesario validar el resultado en una muestra más amplia y con grupos de pacientes heterogéneos en términos de origen (mutación si/no), sexo, edad, severidad, etc.

MiR-483-5p se había hallado significativamente sobre-expresado en dos de los cinco tejidos estudiados, con el nivel más alto en uno de los casos con mutación sarcomérica. Resulta llamativo que los pacientes con mutación identificada (n=11) tenían niveles plasmáticos de miR-483-5p más elevados que aquéllos en los que no hallamos mutación (n=14). En principio, cabría suponer que el miR-483-5p plasmático procedería de tejido hipertrófico dañado. Sin embargo, otros miRNAs sobreexpresados en el tejido hipertrófico no se hallaron incrementados o no fueron detectados en absoluto en los plasmas de los pacientes, al contrario de lo que sucede con algunos myo-miRs en los procesos isquémicos. Tenemos que considerar que a diferencia de éstos, en la MCH la muerte celular (y liberación de su contenido al plasma) se produce de forma progresiva.

La mayor parte de la apoptosis de los cardiomiocitos tiene lugar en las fases iniciales de la enfermedad, siendo posteriormente reemplazados por fibroblastos (Kavantzias y cols., 2000). Dado que todos nuestros pacientes se hallaban en una fase avanzada de la enfermedad, con grados funcionales NHYA III- IV, podemos asumir que las fases iniciales de la MCH no están representadas en nuestro estudio y no podemos descartar que otros miRNAs específicos de las etapas iniciales no hayan sido identificados. Además, aunque se han encontrado algunos miRNAs sobre-expresados en la MCH, en general se observan menores niveles de miRNAs en los tejidos hipertróficos respecto a los corazones normales, lo que reduce el número de posibles candidatos a valorar en el plasma (Ikeda y cols., 2007; Sayed y cols., 2007; Small y cols., 2010).

En los pacientes con IAM miocardiocitos dañados liberarían miRNAs característicos, como miR-133a y miR-499 (Kuwabara y cols., 2011). Sin embargo, se ha descrito un gradiente de concentración de estos myo-miRs (de menos a más) desde la aorta al seno venoso coronario, aunque los niveles de miRNAs de origen leucocitario no seguían este gradiente. Esto sugiere que los myo-miRs serían eliminados antes de llegar a la circulación periférica, donde no serían detectados (De Rosa y cols., 2011). El mecanismo por el que estos miRNAs son “aclarados” intracardiamente se desconoce, aunque se han propuesto varios. Uno sería su degradación por proteasas y RNAasas secretadas por los propios cardiomiocitos dañados, pero esto no explicaría por qué unos miRNAs son degradados y otros no. Otro modelo sugiere que estas moléculas son consumidas por los cardiomiocitos de forma específica (Turchinovich y cols., 2011). En cualquier caso, no podemos excluir que un proceso similar acontezca en la MCH y algunos miRNAs que si son liberados por el tejido miocárdico dañado no serían así detectados en el plasma. En tal caso, el origen del miR-483-5p circulante debería ser explicado por un mecanismo “extracardiaco”.

La elevación plasmática de este miRNA se ha asociado a tumores adrenocorticales, aunque ninguno de los pacientes y controles había sido diagnosticado de este tumor (Patterson y cols., 2011; Qiao y cols., 2011). Por otro lado, hemos comprobado que miR-483-5p no se hallaba en leucocitos de pacientes MCH o de controles sanos, por lo que el origen del detectado en el plasma no sería leucocitario. Dado que es producido por células endoteliales (HUVECs), podría ser liberado por el endotelio. En la MCH es característica la existencia de disfunción endotelial, sobre todo en las arteriolas intramurales (Maron y cols., 1986). Recientemente, se ha descrito que marcadores de disfunción endotelial como el factor de von Willebrand, Endotelina-1, o ADMA

(Dimetil arginina) se encuentran sobreexpresados en el plasma de los pacientes MCH respecto a controles sanos, por lo que no podemos descartar que miR-483-5p sea liberado al torrente sanguíneo por las células endoteliales dañadas en los pacientes de MCH. (Hasegawa y cols., 1996; Dimitrow y cols., 2007; Cambroner y cols., 2010). Los mecanismos por los que se produce disfunción microvascular en la MCH son todavía desconocidos, aunque se ha descrito en enfermos de MCH la existencia de activación plaquetaria que induciría esta disfunción. (Dimitrow y cols., 2008). Las plaquetas producen entre otros factores PDGF, *Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas*, el cual induce la proliferación de células musculares, células endoteliales y fibroblastos, en este sentido no podemos descartar que miR-483-5p sea producido las plaquetas o por las propias células cardiacas en respuesta a la disfunción endotelial.

Mutaciones sarcoméricas, incluyendo las regiones 3'UTR.

La búsqueda de mutaciones en los genes implicados en la MCH (y en general en los genes de las enfermedades mendelianas) se ha limitado a regiones en las que el efecto de los cambios nucleotídicos podía ser fácilmente interpretable. Es decir, cambios de aminoácido (exones) o que afectaban al procesamiento y ajuste del pre-mRNA (bases intrónicas adyacentes). En todo caso, además del posible efecto funcional se tiene en cuenta la ausencia de esas variantes en sujetos sanos (controles) y a ser posible la segregación con la enfermedad en la familia del caso índice. El papel de los cambios en las regiones 3'UTR (no traducidas) fue considerado de relevancia nula o limitada hasta el descubrimiento de los miRNAs. En este sentido, en 2005 se publicó el primer trabajo que relacionaba variantes en la región 3'UTR de *SLITRK1* con el síndrome de Tourette's a través de la unión del miR-189: una variante en la región 3'UTR asociada a la enfermedad modificaba la unión mRNA-miRNA y la expresión génica (Abelson y cols., 2005). Otro ejemplo lo hallamos en la 3'UTR del gen *REEP1* en la que algunas variantes se han asociado a la *Paraparesia Espástica Hereditaria Dominante*. Estas se encuentran en la región diana para el miR-140, por lo que la pérdida de complementariedad miR-140 / *REEP1* podría estar en el origen de la enfermedad, si bien no se han realizado estudios funcionales que puedan demostrarlo (Beetz y cols., 2008).

En las enfermedades oncológicas hay varios ejemplos de polimorfismos en las 3'UTR relacionados con la susceptibilidad al desarrollo de tumores, como el SNP rs61764370 en *KRAS* y el cáncer de pulmón a través de la unión a miR-*let-7b*: la reducción de la complementariedad de *let-7b* con el gen *KRAS* conduciría a un aumento de la expresión del oncogén y desarrollo tumoral en respuesta a varios estímulos (Chin y cols., 2008; Nelson y cols., 2010).

En general, podríamos asumir que la pérdida de sitios de unión para miRNAs conllevaría una sobreexpresión de la proteína, lo que promovería el proceso patológico. Por el contrario, la ganancia de sitios para miRNAs resultaría en el silenciamiento del gen, un efecto similar al que tendrían algunas mutaciones que conllevan reducción de la dosis génica (como la delección del gen completo). Un aspecto a tener en cuenta en el mecanismo mutacional de la MCH es el efecto de la dosis de los genes sarcoméricos (cantidad de mRNA y por ende cantidad de proteína). Los dos alelos se expresan de forma codominante y en una muestra de tejido de un paciente portador de una mutación sarcomérica en heterocigosis, se esperaría que las proteínas normal y mutada coexistiesen en cantidades equimoleculares. Sin embargo, un estudio reciente ha descrito una reducción significativa de la beta-miosina mutada (mutaciones en *MYH7*) tanto a nivel del ARNm como de la proteína (Tripathi y cols., 2011). En este contexto, un mecanismo de regulación post-transcripcional mediante miRNAs podría resultar en una reducción de los niveles proteicos contribuyendo al fenotipo.

En nuestro estudio, además de caracterizar el espectro mutacional (exones y bases intrónicas flanqueantes) de los genes *MYH7*, *MYBPC3* y *TNNT2* hemos analizado la variación en sus secuencias 3'UTR. Para ello secuenciamos 245 pacientes MCH y los cambios relevantes se determinaron también en 250 controles sanos. Hallamos 33 mutaciones, 4 nuevas (no descritas). El 16 % de los pacientes tenían una mutación en alguno de los genes sarcoméricos estudiados, un porcentaje similar al descrito por otros grupos y menor al hallado en series con un porcentaje mayor de casos con antecedentes familiares (Brito y cols., 2012). En cuanto a las 3'UTR hemos encontrado 3 variantes no descritas en *MYH7* (c.*29T>C) y *MYBPC3* (c.*155G>A, c.*225delG), en pacientes sin mutación sarcomérica. Ninguna de estas fue hallada en los controles, ni figura en la base de datos de variación del genoma (www.ensembl.org, consultada en enero de 2013). Aunque no podemos descartar que estas variantes contribuyan a la MCH, no pudimos analizar su segregación familiar por tratarse de tres pacientes sin historia familiar de la enfermedad. Por otro lado, sólo la variante c.*225 del G de *MYBPC3* afectaría a un sitio

de unión para un miRNA conocido, miR-186, que regula la apoptosis vía caspasa-10 y está siendo estudiado como posible diana terapéutica para diversos cánceres (Zhang y cols., 2010).

De los polimorfismos que habían sido previamente descritos (rs455548631 C/T y rs17794387 G/A, en 3'UTR de MYH7 y rs3730244 C/T, y rs3729998 G/A en 3'UTR de TNNT2). Destacaremos en primer lugar el rs45548631, ya que sólo hemos encontrado un heterocigoto CT entre los enfermos de MCH. El análisis bioinformático reveló que este polimorfismo no se encontraba en ninguna región diana para miRNAs y no se ha descrito la existencia de un haplotipo de riesgo que incluya este polimorfismo en nuestra población, por lo que aunque no podemos descartar que este polimorfismo sea un polimorfismo poco frecuente que contribuya al riesgo de la enfermedad. Por otro lado, cabe destacar el polimorfismo rs3729998 G/A en la región 3'UTR de TNNT2, ya que los portadores rs372998A eran significativamente más frecuentes en los MCH respecto a los controles sanos ($p=0,06$ OR: 6,2). El análisis online mediante la base de datos microRNA.org indica que este polimorfismo se encuentra localizado en la región diana de miR-637. Además este SNP, se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo rs3730238 K253R, localizado en el exón 14 de TNNT2, habiéndose asociado la variante R, que conformaría un haplotipo con la variante A del rs372998, con un mayor riesgo de MCH, en nuestra población ($p=0,04$; OR: 5,7). (Garcia-Castro y cols., 2007) El efecto funcional de este haplotipo podría deberse a la pérdida de complementariedad de la 3'UTR de TNNT2 con el miR-637 para el alelo A. En este sentido se ha descrito que este miRNA contribuye a la hipertensión esencial, debido a la complementariedad de este miRNA con un polimorfismo en la región 3'UTR del ATP6V0A1. Este gen codifica la subunidad α de la ATPasa vacuolar transportadora de protones. Se ha observado que la complementariedad miRNA-mRNA para el alelo 3246C en la región 3'UTR conllevaba una reducción de la expresión del gen, y finalmente contribuía a la alcalinización del medio, contribuyendo al desbalance "graninas" que se había asociado previamente con la hipertensión esencial. (Wei y cols., 2011). Existiría la posibilidad de que la contribución al riesgo de MCH conferido por este haplotipo (253R, rs37998A) fuese a través la pérdida de complementariedad del alelo A con el miR-637 que contribuiría a una menor represión de mRNA de TNNT2. Debido a que este miRNA se encuentra sólo conservado en primates y que la expresión del mismo en corazón no ha sido confirmada, podría tratarse de una asociación espuria y el efecto del polimorfismo observado en la región 3'UTR, sería únicamente a

consecuencia de su desequilibrio con de ligamiento con el SNP exónico rs3730238, que ha sido descrito como asociado a la MCH. (www.HGMD.org)

Por tanto, podemos asumir que la variación en las 3'UTR tendría una contribución muy limitada o nula a la patogénesis de la MCH. En este sentido, se ha descrito que el grado de represión en los genes con 3'UTR más cortas es más fuerte que en las regiones más largas, y aunque 3'UTR largas pueden contener más de un *binding site* para un mismo miRNA, la magnitud del represión dependería también del número de *binding sites* para ese miRNA y de la distancia entre éstos (Hon y cols., 2007). A nivel tisular, el cerebro es el órgano que expresa genes con las 3'UTR más largas; por ejemplo, el gen *ATXN1* (ataxina-1) tiene una 3'UTR de 7 Kb, con sitios de unión para miRNAs (Hon y cols., 2007). Por el contrario, los genes característicos de la oogénesis suelen tener 3'UTR más cortas (Doran 2008). El pequeño tamaño de estas regiones en los tres genes *MYH7* (115pb), *MYBPC3* (336pb), y *TNNT2* (195pb) sugiere que tendrían menos sitios de unión para miRNAs, lo que podría significar una menor complejidad en la regulación a través de este mecanismo. En un análisis bioinformático identificamos 13, 30 y 9 sitios de unión a miRNAs en las 3'UTR de *MYH7*, *MYBPC3* y *TNNT2*, respectivamente. Limitándonos a los más conservados entre especies, tendríamos sólo 5(miR-122, miR-28-5p, miR-708, miR-544), 6(miR-377, miR370, miR-19b, miR-19a, miR-7, miR-134) y 1(miR-9) sitios de unión. De estos sólo miR-9 se ha relacionado directamente con la patogénesis de la MCH, probablemente a través de la regulación de la miocardina, un factor de transcripción importante para el desarrollo de la hipertrofia (Wang y cols., 2010).

En contraste con la ausencia de relación entre la enfermedad y la variación en las 3'UTR de los tres genes sarcoméricos, tenemos el caso del polimorfismo rs5182 presente en la región 3'UTR del gen *AGTR1*, que codifica el receptor tipo 1 de angiotensina. Este polimorfismo ha sido ampliamente relacionado con el riesgo de hipertensión, enfermedad coronaria, IAM, aneurismas abdominales aórticos, e hipertrofia cardiaca (Lucarini y cols., 2009; Ceolotto y cols., 2011). Se trata de un efecto “plausible” sobre el riesgo, dado el papel relevante de este gen (y otros del sistema renina-angiotensina-aldosterona, RAAS) en la fisiopatología cardiovascular. Hemos genotipado este polimorfismo en 245 pacientes MCH, 250 controles sanos, y 120 pacientes con HVI secundaria a hipertensión. Hallamos una frecuencia significativamente mayor de portadores del alelo C entre los pacientes de MCH ($p=0,03$ OR=1,5). Esta asociación era más evidente entre los pacientes mutación sarcomérica

identificada ($p=0,01$ OR=1,6). Otros estudios han sugerido que este polimorfismo actuaría como modificador del fenotipo en pacientes de MCH. Así, Perkins y col. hallaron una asociación significativa con la edad de inicio (menor en los portadores del alelo C) (Perkins y cols., 2005). En nuestro caso la relación con la edad sólo se observó entre los portadores de alguna mutación, aunque sin diferencias significativas. Por otro lado, nuestros resultados apuntan a que el alelo C se relacionaría con un mayor grado de hipertrofia entre los pacientes con MCH.

La asociación entre rs5182 y la MCH podría explicarse por un efecto directo (a través de la unión a miRNAs) o indirecto, como marcador en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo. Este polimorfismo se sitúa en la secuencia de unión del miR-155, y el alelo C conllevaría una pérdida de la complementariedad miRNA-mRNA. Además, varios tejidos/tipos celulares relacionados con la fisiopatología cardiovascular (como endotelio y VSMCS) coexpresan miR-155 y *AGTRI*. Esto, unido al hecho de que los niveles de mRNA de *AGTRI* serían mayores en los homocigotos CC con una correlación negativa con los de miR-155 apoya la existencia de una interacción entre miR-155 y *AGTRI* (Ceolotto y cols., 2011). Un efecto directo del polimorfismo sobre la expresión del receptor mediada por miR-155 explicaría no sólo su asociación con la MCH y otras manifestaciones cardiovasculares, sino también con la una dosis efectiva de mineralo-corticoides significativamente menor en los portadores del alelo C. (Lim y cols., 2007) Con todo, la regulación del *AGTRI* por miR-155 y el efecto del polimorfismo sobre los niveles del receptor deben demostrarse mediante estudios funcionales.

Variación genética en los myo-miRs:

La variación en la secuencia codificadora de los miRNAs podría contribuir al riesgo de desarrollar enfermedades. El grado de variación en estas regiones guarda relación con su papel en la función del miRNA y/o en su procesamiento. En un análisis de 227 miRNAs, de un total de 323 polimorfismos 12 se encontraban en el pre-miRNA y sólo uno en la secuencia madura (miR-125a) (Duan y cols., 2007). Es decir, los cambios en el miRNA maduro serían muy poco frecuentes por afectar directamente a la unión al ARNm, y cómo tales se han hallado en muy pocos casos y generalmente asociados a enfermedades mendelianas como el Queratocono (miR-184) y la sordera familiar (miR-96) (Mencia y cols., 2009; Hughes y cols., 2011).

Por su papel en la patogénesis de la hipertrofia cardiaca, nuestro estudio se ha centrado en los myo-miRs de las familias 1, 208, y 133. Hallamos un total de 7 variantes, tanto en pacientes como en controles por lo que se trataría de polimorfismos. Ninguno de estos cambios se localizaba en las secuencias miRNA maduras, por lo que no tendrían efecto directo sobre la unión a regiones 3'UTR. Tampoco hallamos ninguno en el pre-miRNA, por lo que no afectarían a la estructura de los apareamientos entre bases y formación de los bucles que caracterizan a los pre-miRNAs y podrían condicionar su procesamiento a miRNA maduro (Duan y cols., 2007). Por tanto, todos los cambios estaban en secuencias pri-miRNA, en las que también se han descrito polimorfismos que podrían afectar a la síntesis de los miRNAs (Calin y cols., 2005; Wu y cols., 2008). Estos cambios en los pri-miRNAs, aunque existan como polimorfismos pueden determinar una reducción de los niveles de miRNAs maduros y afectar a la regulación de varios genes en condiciones particulares. Es el caso del pri-miR-16 en el que una variante relacionada con menores niveles del miRNA maduro sería un factor de riesgo para la Leucemia Linfocítica Crónica (Calin y cols., 2005; Wu y cols., 2008) Otros ejemplos relacionados con el cáncer, en los que no se ha demostrado un efecto funcional, son las variantes en las secuencias pri-miR-219 y -214, relacionadas con el riesgo de cáncer esofágico y de vejiga (Yang y cols., 2008; Ye y cols., 2008).

En el campo de las enfermedades cardiacas sólo hay un estudio publicado sobre el efecto de los polimorfismos en las secuencias de los miRNAs: los SNPs C/T (rs11614913) en las secuencias miR-196-a2 y A/G (rs3746444) en miR-499 han sido relacionados con el riesgo de desarrollar miocardiopatía dilatada en China (Zhou y cols., 2010). Los dos alelos de riesgo se localizan en la región madura de ambos miRNAs, y en el caso del rs11614913 los homocigotos CC tendrían unos niveles mayores de miR-196a comparados con los TT. La pérdida de la complementariedad de la doble hebra precursora afectaría al procesamiento hacia miRNA maduro, justificando menores niveles de este y la asociación del polimorfismo no sólo con la MCD, sino también con diversos tipos de cáncer presencia de estos polimorfismos alteraría el procesamiento del pre-miRNA dando lugar a una menor cantidad de miRNA maduro. En el caso del miR-196 este proceso ha sido demostrado funcionalmente, ya que este polimorfismo se ha asociado al riesgo de distintos tipos de Cáncer (Figura 25) (Ryan y cols., 2010).

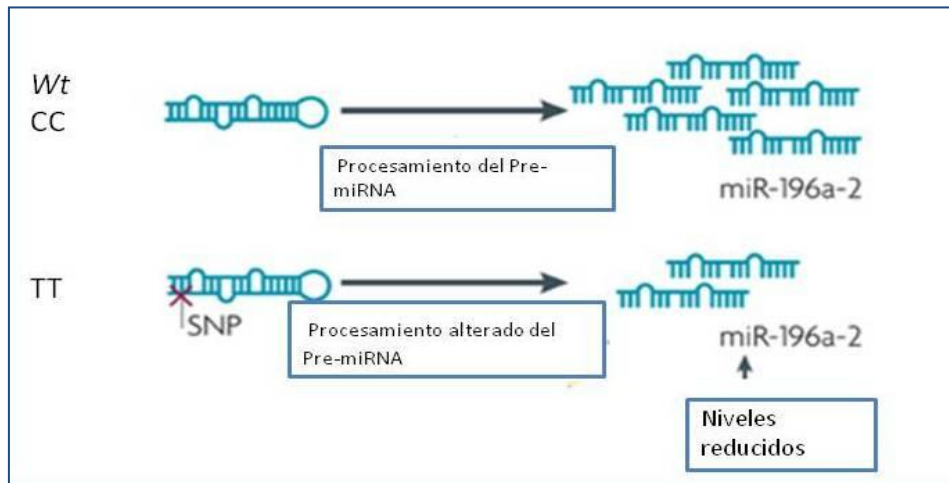


Figura 25. Alteración del procesamiento del pre-miRNA-196 por el alelo T del rs11614913 (modificado de Ryan y cols. 2010).

En nuestro estudio hemos encontrado una asociación significativa con la MCH para el polimorfismo +85 A/C del pri-miR-133a1, y con la HVI secundaria a hipertensión para el -90 del A del pri-miR-133b. Basándonos en los modelos teóricos de RNA que se describen en los resultados, las dos variantes podrían modificar la estructura secundaria del pri-miRNA afectando de esta forma al procesamiento del miRNA maduro. Por otro lado, las variaciones en la secuencia que flanquean al miRNA maduro pueden afectar también a la unión de elementos reguladores de la expresión, como los factores de transcripción. En los ratones la pérdida del factor de transcripción *MEF2* es suficiente para que disminuyan los niveles de miR-1.1, -133a2, -1.2, y -133a1 (Zhao y cols., 2005; Liu y cols., 2007). *MEF2* es un regulador fundamental del crecimiento de los cardiomiocitos vía señalización Ca^{++} -Calmodulina. La sobre-expresión de este factor en ratones transgénicos conlleva la expresión de genes de remodelado de matriz y da lugar a un fenotipo de Miocardiopatía Dilatada (Xu y cols., 2006). En conjunción con otros factores de transcripción como NFAT y GATA4; *MEF2* regula la expresión génica cardíaca, siendo fundamental tanto en la embriogénesis como para la respuesta hipertrófica (Molkentin y cols., 1998). Además, tanto GATA4 como *MEF2* son factores cruciales para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca en respuesta al incremento de la presión sanguínea, probablemente a través de la activación de *AGTR1* y *CK* (*Creatina kinasa*), entre otros. Por otro lado, otros genes importantes para el desarrollo de la hipertrofia cardíaca como son *MYH6*, *MYL1*, *MYL2*, *TNNT2*, *TNNTI3*, *TNNC* contienen elementos reguladores tipo GATA y/o tipo *MEF2* en sus promotores (Ip y cols., 1994; McGrew y cols., 1996; Montgomery y cols., 1997; Murphy y cols., 1997).

En relación a los miRNAs, se ha comprobado que miR-1 inhibe la expresión de MEF2A y GATA4 constituyendo así un mecanismo de retroalimentación que afectaría a los miocardiocitos en el caso de que el miRNA estuviese desregulado (Ikeda y cols., 2009). Por su parte, el polimorfismo -90 delA en miR-133b podría afectar a un sitio de unión para los factores de transcripción tipo GATA. La pérdida del lugar de unión a estos factores podría contribuir a una menor expresión del miR-133b en los portadores del alelo del A. Estudios *in vitro* han demostrado que la supresión del 133b induce hipertrofia cardíaca (Care y cols., 2007). Por tanto, no podemos descartar que el efecto de esta variante sobre el riesgo de HVI hipertensiva tuviese que ver con cambios en los niveles de expresión del miRNA maduro mediado por su efecto sobre la unión de GATA. Con todo, es necesario confirmar el efecto de las variantes de miR-1 y miR-133 sobre la enfermedad mediante estudios funcionales.

Conclusiones

Conclusiones.

1. Existe un perfil diferencial de expresión de miRNAs entre tejidos de pacientes de MCH, de HVI secundaria y con cardiopatía isquémica. Sólo miR-92a, miR-590-5p y miR-483-5p se encontraban sobreexpresados en VI de pacientes de MCH analizados. La expresión cardíaca de miR-495 parece diferenciar el tejido de MCH del HVI secundaria.
2. MiR-483-5p es más abundante en el plasma de los pacientes de MCH frente a los controles sanos. Aunque, con nuestros estudios, no podemos proponerlo como un biomarcador de MCH, no podemos descartar su contribución de forma indirecta a la MCH.
3. El estudio de secuenciación de las regiones exónicas e intrónicas flanqueantes de los genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TPM1* y *TNNI3*, en nuestra cohorte de 245 enfermos de MCH reveló un total de 33 mutaciones en estos genes, siendo 4 de ellas, mutaciones nuevas no descritas previamente, a saber: R17Q, Q791X, R1080H, en *MYBPC3* y P828S en *MYH7*.
4. La variación genética presente en las regiones 3'UTR de los genes sarcoméricos tendría una contribución limitada a la patogénesis de MCH. El alelo A del polimorfismo descrito rs3729998 en la región 3'UTR de *TNNT2*, en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo exónico K253R, parece contribuir al riesgo de MCH en nuestra población.
5. Hemos encontrado un total de 7 polimorfismos en los genes que codifican para los myoMIRS 133a1, 133a2 133b 208a, 208b. Todas estas variantes se localizaron en las regiones pri-miRNAs. De estas variantes, el polimorfismo no descrito + 85A/C del 133 a1 parece contribuir al riesgo de MCH mientras que

el polimorfismo -90De1A del 133b parece contribuir al riesgo de HVI secundaria a hipertensión.

6. El polimorfismo 1166C del ATR-1, rs5182, parece asociarse al riesgo de MCH en nuestra población. Los portadores del alelo C presentan una mayor SIV, por lo que podemos proponer este polimorfismo como un modificador del fenotipo.

Bibliografía

Bibliografía:

- Abelson, J. F., Kwan, K. Y., O'Roak, B. J., Baek, D. Y., Stillman, A. A., Morgan, T. M., Mathews, C. A., Pauls, D. L., Rasin, M. R., Gunel, M., Davis, N. R., Ercan-Sencicek, A. G., Guez, D. H., Spertus, J. A., Leckman, J. F., Dure, L. S. th, Kurlan, R., Singer, H. S., Gilbert, D. L., Farhi, A., Louvi, A., Lifton, R. P., Sestan, N. and State, M. W. (2005). Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* 310(5746): 317-320.
- Adachi, T., Nakanishi, M., Otsuka, Y., Nishimura, K., Hirokawa, G., Goto, Y., Nonogi, H. and Iwai, N. (2010). Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 56(7): 1183-1185.
- Ai, J., Zhang, R., Li, Y., Pu, J., Lu, Y., Jiao, J., Li, K., Yu, B., Li, Z., Wang, R., Wang, L., Li, Q., Wang, N., Shan, H. and Yang, B. (2010). Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1): 73-77.
- Akazawa, H. and Komuro, I. (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 92(10): 1079-1088.
- Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57(1): 49-57.
- Arad, M., Seidman, J. G. and Seidman, C. E. (2002). Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 11(20): 2499-2506.
- Beetz, C., Schule, R., Deconinck, T., Tran-Viet, K. N., Zhu, H., Kremer, B. P., Frints, S. G., van Zelst-Stams, W. A., Byrne, P., Otto, S., Nygren, A. O., Baets, J., Smets, K., Ceulemans, B., Dan, B., Nagan, N., Kassubek, J., Klimpe, S., Klopstock, T., Stolze, H., Smeets, H. J., Schrandt-Stumpel, C. T., Hutchinson, M., van de Warrenburg, B. P., Braastad, C., Deufel, T., Pericak-Vance, M., Schols, L., de Jonghe, P. and Zuchner, S. (2008). REEP1 mutation spectrum and genotype/phenotype correlation in hereditary spastic paraplegia type 31. *Brain* 131(Pt 4): 1078-1086.
- Belenkov, Y. N., Privalova, E. V., Kaplunova, V. Y., Stambol'skii, D. V. and Fomin, A. A. (2010). [Analysis of morpho-functional parameters of the heart and polymorphisms of Renin-Angiotensin-aldosterone system genes in patients with different variants of the course of hypertrophic cardiomyopathy]. *Kardiologiia* 50(6): 27-34.
- Bick, A. G., Flannick, J., Ito, K., Cheng, S., Vasan, R. S., Parfenov, M. G., Herman, D. S., Depalma, S. R., Gupta, N., Gabriel, S. B., Funke, B. H., Rehm, H. L., Benjamin, E. J., Aragam, J., Taylor, H. A., Jr., Fox, E. R., Newton-Cheh, C., Kathiresan, S., O'Donnell, C. J., Wilson, J. G., Altshuler, D. M., Hirschhorn, J. N., Seidman, J. G. and Seidman, C. (2012). Burden of rare sarcomere gene variants in the framingham and jackson heart study cohorts. *Am J Hum Genet* 91(3): 513-519.
- Bostjancic, E., Zidar, N. and Glavac, D. (2009). MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Dis Markers* 27(6): 255-268.

- Bostjancic, E., Zidar, N., Stajer, D. and Glavac, D. (2009). MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 Are Dysregulated in Human Myocardial Infarction. *Cardiology* 115(3): 163-169.
- Brito, D., Miltenberger-Miltenyi, G., Vale Pereira, S., Silva, D., Diogo, A. N. and Madeira, H. (2012). Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: Genetic profile in a Portuguese population. *Rev Port Cardiol* 31(9): 577-587.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15524-15529.
- Calin, G. A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Iorio, M. V., Visone, R., Sever, N. I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M. and Croce, C. M. (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353(17): 1793-1801.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2999-3004.
- Callis, T. E., Pandya, K., Seok, H. Y., Tang, R. H., Tatsuguchi, M., Huang, Z. P., Chen, J. F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., Willis, M. S., Selzman, C. H. and Wang, D. Z. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 119(9): 2772-2786.
- Cambroner, F., Vilchez, J. A., Garcia-Honrubia, A., Ruiz-Espejo, F., Moreno, V., Hernandez-Romero, D., Bonacasa, B., Gonzalez-Conejero, R., de la Morena, G., Martinez, P., Climent, V., Valdes, M. and Marin, F. (2010). Plasma levels of von Willebrand factor are increased in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Thromb Res* 126(1): e46-50.
- Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M. L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D., Elia, L., Latronico, M. V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M. A., Dorn, G. W., 2nd, Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K. L., Croce, C. M., Peschle, C. and Condorelli, G. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13(5): 613-618.
- Castro, M. G., Huerta, C., Reguero, J. R., Soto, M. I., Domenech, E., Alvarez, V., Gomez-Zaera, M., Nunes, V., Gonzalez, P., Corao, A. and Coto, E. (2006). Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 112(2): 202-206.
- Castro, M. G., Rodriguez-Pascual, F., Magan-Marchal, N., Reguero, J. R., Alonso-Montes, C., Moris, C., Alvarez, V., Lamas, S. and Coto, E. (2007). Screening of the endothelin1 gene (EDN1) in a cohort of patients with essential left ventricular hypertrophy. *Ann Hum Genet* 71(Pt 5): 601-610.
- Ceolotto, G., Papparella, I., Bortoluzzi, A., Strapazzon, G., Ragazzo, F., Bratti, P., Fabricio, A. S., Squarcina, E., Gion, M., Palatini, P. and Semplicini, A. (2011). Interplay between miR-

- 155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *Am J Hypertens* 24(2): 241-246.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C. G., Kipps, T. J., Negrini, M. and Croce, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 13944-13949.
- Corney, D. C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A. K., Wang, W. and Nikitin, A. Y. (2007). MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 67(18): 8433-8438.
- Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D. R., Staessen, J. A., Heymans, S. and Schroen, B. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 3(6): 499-506.
- Coto, E., Palacin, M., Martin, M., Castro, M. G., Reguero, J. R., Garcia, C., Berrazueta, J. R., Moris, C., Morales, B., Ortega, F., Corao, A. I., Diaz, M., Tavera, B. and Alvarez, V. (2010). Functional polymorphisms in genes of the Angiotensin and Serotonin systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: AT1R as a potential modifier. *J Transl Med* 8: 64.
- Coto, E., Reguero, J. R., Palacin, M., Gomez, J., Alonso, B., Iglesias, S., Martin, M., Tavera, B., Diaz-Molina, B., Morales, C., Moris, C., Rodriguez-Lambert, J. L., Corao, A. I., Diaz, M. and Alvarez, V. (2012). Resequencing the whole MYH7 gene (including the intronic, promoter, and 3' UTR sequences) in hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Diagn* 14(5): 518-524.
- Chen, J. F., Murchison, E. P., Tang, R., Callis, T. E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., Rojas, M., Hammond, S. M., Schneider, M. D., Selzman, C. H., Meissner, G., Patterson, C., Hannon, G. J. and Wang, D. Z. (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 2111-2116.
- Cheng, H., Zhang, L., Cogdell, D. E., Zheng, H., Schetter, A. J., Nykter, M., Harris, C. C., Chen, K., Hamilton, S. R. and Zhang, W. (2011). Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 6(3): e17745.
- Chin, L. J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R. U., Straka, E., Su, L., Burki, E. A., Crowell, R. E., Patel, R., Kulkarni, T., Homer, R., Zelterman, D., Kidd, K. K., Zhu, Y., Christiani, D. C., Belinsky, S. A., Slack, F. J. and Weidhaas, J. B. (2008). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 68(20): 8535-8540.
- Chung, M. W., Tsoutsman, T. and Semsarian, C. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: from gene defect to clinical disease. *Cell Res* 13(1): 9-20.
- De Rosa, S., Fichtlscherer, S., Lehmann, R., Assmus, B., Dimmeler, S. and Zeiher, A. M. (2011). Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation* 124(18): 1936-1944.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E. E., Lee, W. M., Enders, G. H., Mendell, J. T. and Thomas-Tikhonenko, A. (2006). Augmentation of

- tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38(9): 1060-1065.
- Dimitrow, P. P., Undas, A., Bober, M., Tracz, W. and Dubiel, J. S. (2007). Plasma biomarkers of endothelial dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep* 59(6): 715-720.
- Dimitrow, P. P., Undas, A., Bober, M., Tracz, W. and Dubiel, J. S. (2008). Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with enhanced thrombin generation and platelet activation. *Heart* 94(6): e21.
- Dong, D. L., Chen, C., Huo, R., Wang, N., Li, Z., Tu, Y. J., Hu, J. T., Chu, X., Huang, W. and Yang, B. F. (2010). Reciprocal repression between microRNA-133 and calcineurin regulates cardiac hypertrophy: a novel mechanism for progressive cardiac hypertrophy. *Hypertension* 55(4): 946-952.
- Doran, G. (2008). The short and the long of UTRs. *J RNAi Gene Silencing* 4(1): 264-265.
- Duan, R., Pak, C. and Jin, P. (2007). Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet* 16(9): 1124-1131.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A. A., Lidov, H. G., Kang, P. B., North, K. N., Mitrani-Rosenbaum, S., Flanigan, K. M., Neely, L. A., Whitney, D., Beggs, A. H., Kohane, I. S. and Kunkel, L. M. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(43): 17016-17021.
- Elliott, P. M., Gimeno, J. R., Thaman, R., Shah, J., Ward, D., Dickie, S., Tome Esteban, M. T. and McKenna, W. J. (2006). Historical trends in reported survival rates in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 92(6): 785-791.
- Flynt, A. S. and Lai, E. C. (2008). Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet* 9(11): 831-842.
- Frey, N., Luedde, M. and Katus, H. A. (2012). Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 9(2): 91-100.
- Garcia-Castro, M., Coto, E., Reguero, J. R., Berrazueta, J. R., Alvarez, V., Alonso, B., Sainz, R., Martin, M. and Moris, C. (2009). [Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol* 62(1): 48-56.
- Garcia-Castro, M., Reguero, J. R., Batalla, A., Diaz-Molina, B., Gonzalez, P., Alvarez, V., Cortina, A., Cubero, G. I. and Coto, E. (2003). Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the beta-myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2) genes among Spanish patients. *Clin Chem* 49(8): 1279-1285.
- Garcia-Castro, M., Reguero, J. R., Moris, C., Alonso-Montes, C., Berrazueta, J. R., Sainz, R., Alvarez, V. and Coto, E. (2007). Prevalence and spectrum of mutations in the sarcomeric troponin T and I genes in a cohort of Spanish cardiac hypertrophy patients. *Int J Cardiol* 121(1): 115-116.
- Gersh, B. J., Maron, B. J., Bonow, R. O., Dearani, J. A., Fifer, M. A., Link, M. S., Naidu, S. S., Nishimura, R. A., Ommen, S. R., Rakowski, H., Seidman, C. E., Towbin, J. A., Udelson, J.

- E. and Yancy, C. W. (2011). 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 124(24): e783-831.
- Gersh, B. J., Maron, B. J., Bonow, R. O., Dearani, J. A., Fifer, M. A., Link, M. S., Naidu, S. S., Nishimura, R. A., Ommen, S. R., Rakowski, H., Seidman, C. E., Towbin, J. A., Udelson, J. E. and Yancy, C. W. (2011). 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 124(24): 2761-2796.
- Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholakh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y. and Chajut, A. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3(9): e3148.
- Harvey, P. A. and Leinwand, L. A. (2011). The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J Cell Biol* 194(3): 355-365.
- Hasegawa, K., Fujiwara, H., Koshiji, M., Inada, T., Ohtani, S., Doyama, K., Tanaka, M., Matsumori, A., Fujiwara, T., Shirakami, G., Hosoda, K., Nakao, K. and Sasayama, S. (1996). Endothelin-1 and its receptor in hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 27(2): 259-264.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y. and Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65(21): 9628-9632.
- He, L. and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5(7): 522-531.
- Hermeking, H. (2007). p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 12(5): 414-418.
- Hoffman, A. E., Zheng, T., Yi, C., Leaderer, D., Weidhaas, J., Slack, F., Zhang, Y., Paranjape, T. and Zhu, Y. (2009). microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res* 69(14): 5970-5977.
- Hon, L. S. and Zhang, Z. (2007). The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol* 8(8): R166.
- Hughes, A. E., Bradley, D. T., Campbell, M., Lechner, J., Dash, D. P., Simpson, D. A. and Willoughby, C. E. (2011). Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. *Am J Hum Genet* 89(5): 628-633.
- Ikeda, S., He, A., Kong, S. W., Lu, J., Bejar, R., Bodyak, N., Lee, K. H., Ma, Q., Kang, P. M., Golub, T. R. and Pu, W. T. (2009). MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol* 29(8): 2193-2204.
- Ikeda, S., Kong, S. W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P. D., Golub, T. R., Pieske, B. and Pu, W. T. (2007). Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 31(3): 367-373.

- Ingles, J., Doolan, A., Chiu, C., Seidman, J., Seidman, C. and Semsarian, C. (2005). Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet* 42(10): e59.
- Ip, H. S., Wilson, D. B., Heikinheimo, M., Tang, Z., Ting, C. N., Simon, M. C., Leiden, J. M. and Parmacek, M. S. (1994). The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol Cell Biol* 14(11): 7517-7526.
- Ishanov, A., Okamoto, H., Yoneya, K., Watanabe, M., Nakagawa, I., Machida, M., Onozuka, H., Mikami, T., Kawaguchi, H., Hata, A., Kondo, K. and Kitabatake, A. (1997). Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am Heart J* 133(2): 184-189.
- Ito, H., Hirata, Y., Hiroe, M., Tsujino, M., Adachi, S., Takamoto, T., Nitta, M., Taniguchi, K. and Marumo, F. (1991). Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69(1): 209-215.
- Jazdzewski, K., Liyanarachchi, S., Swierniak, M., Pachucki, J., Ringel, M. D., Jarzab, B. and de la Chapelle, A. (2009). Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(5): 1502-1505.
- Ji, R., Cheng, Y., Yue, J., Yang, J., Liu, X., Chen, H., Dean, D. B. and Zhang, C. (2007). MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 100(11): 1579-1588.
- Ji, X., Takahashi, R., Hiura, Y., Hirokawa, G., Fukushima, Y. and Iwai, N. (2009). Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 55(11): 1944-1949.
- Kavantzias, N. G., Lazaris, A. C., Agapitos, E. V., Nanas, J. and Davaris, P. S. (2000). Histological assessment of apoptotic cell death in cardiomyopathies. *Pathology* 32(3): 176-180.
- Kawahara, C., Tsutamoto, T., Nishiyama, K., Yamaji, M., Sakai, H., Fujii, M., Yamamoto, T. and Horie, M. (2011). Prognostic role of high-sensitivity cardiac troponin T in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ J* 75(3): 656-661.
- Kuwabara, Y., Ono, K., Horie, T., Nishi, H., Nagao, K., Kinoshita, M., Watanabe, S., Baba, O., Kojima, Y., Shizuta, S., Imai, M., Tamura, T., Kita, T. and Kimura, T. (2011). Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet* 4(4): 446-454.
- Lever, H. M., Karam, R. F., Currie, P. J. and Healy, B. P. (1989). Hypertrophic cardiomyopathy in the elderly. Distinctions from the young based on cardiac shape. *Circulation* 79(3): 580-589.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L. and Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8: 166.
- Lim, D. S., Roberts, R. and Marian, A. J. (2001). Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *J Am Coll Cardiol* 38(4): 1175-1180.

- Lim, H. S., Cho, J. Y., Oh, D. S., Chung, J. Y., Hong, K. S., Bae, K. S., Yu, K. S., Lee, K. H., Jang, I. J. and Shin, S. G. (2007). Angiotensin II type 1 receptor 1166A/C polymorphism in association with blood pressure response to exogenous angiotensin II. *Eur J Clin Pharmacol* 63(1): 17-26.
- Lin, Z., Murtaza, I., Wang, K., Jiao, J., Gao, J. and Li, P. F. (2009). miR-23a functions downstream of NFATc3 to regulate cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29): 12103-12108.
- Lind, J. M., Chiu, C., Ingles, J., Yeates, L., Humphries, S. E., Heather, A. K. and Semsarian, C. (2008). Sex hormone receptor gene variation associated with phenotype in male hypertrophic cardiomyopathy patients. *J Mol Cell Cardiol* 45(2): 217-222.
- Liu, N., Williams, A. H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L. B., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(52): 20844-20849.
- Lucarini, L., Sticchi, E., Sofi, F., Pratesi, G., Pratesi, C., Pulli, R., Gensini, G. F., Abbate, R., Pepe, G. and Fatini, C. (2009). ACE and TGFBR1 genes interact in influencing the susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 202(1): 205-210.
- Luo, X., Zhang, H., Xiao, J. and Wang, Z. (2010). Regulation of human cardiac ion channel genes by microRNAs: theoretical perspective and pathophysiological implications. *Cell Physiol Biochem* 25(6): 571-586.
- Marian, A. J. (2009). Experimental therapies in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res* 2(4): 483-492.
- Maron, B. J., Gardin, J. M., Flack, J. M., Gidding, S. S., Kurosaki, T. T. and Bild, D. E. (1995). Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults*. *Circulation* 92(4): 785-789.
- Maron, B. J., Wolfson, J. K., Epstein, S. E. and Roberts, W. C. (1986). Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 8(3): 545-557.
- Maron, M. S., Olivotto, I., Maron, B. J., Prasad, S. K., Cecchi, F., Udelson, J. E. and Camici, P. G. (2009). The case for myocardial ischemia in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 54(9): 866-875.
- Matkovich, S. J., Hu, Y., Eschenbacher, W. H., Dorn, L. E. and Dorn, G. W., 2nd (2012). Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy. *Circ Res* 111(5): 521-531.
- McGrew, M. J., Bogdanova, N., Hasegawa, K., Hughes, S. H., Kitsis, R. N. and Rosenthal, N. (1996). Distinct gene expression patterns in skeletal and cardiac muscle are dependent on common regulatory sequences in the MLC1/3 locus. *Mol Cell Biol* 16(8): 4524-4534.
- McNally, E. M. (2007). New approaches in the therapy of cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Annu Rev Med* 58: 75-88.

- Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Redshaw, N., Morin, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, L. A., del Castillo, I., Steel, K. P., Dalmay, T., Moreno, F. and Moreno-Pelayo, M. A. (2009). Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet* 41(5): 609-613.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.
- Moak, J. P. and Kaski, J. P. (2012). Hypertrophic cardiomyopathy in children. *Heart* 98(14): 1044-1054.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. and Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93(2): 215-228.
- Monserrat, L., Lopez, B., Gonzalez, A., Hermida, M., Fernandez, X., Ortiz, M., Barriales-Villa, R., Castro-Beiras, A. and Diez, J. (2011). Cardiotrophin-1 plasma levels are associated with the severity of hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 32(2): 177-183.
- Montgomery, M. O. and Litvin, J. (1997). The cardiac-muscle specific enhancer-promoter of slow/cardiac troponin C binds HMG-2. *Gene* 187(2): 159-164.
- Montgomery, R. L., Hullinger, T. G., Semus, H. M., Dickinson, B. A., Seto, A. G., Lynch, J. M., Stack, C., Latimer, P. A., Olson, E. N. and van Rooij, E. (2011). Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation* 124(14): 1537-1547.
- Moreno, V., Hernandez-Romero, D., Vilchez, J. A., Garcia-Honrubia, A., Cambronero, F., Casas, T., Gonzalez, J., Martinez, P., Climent, V., de la Morena, G., Valdes, M. and Marin, F. (2010). Serum levels of high-sensitivity troponin T: a novel marker for cardiac remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail* 16(12): 950-956.
- Muntoni, F., Cau, M., Ganau, A., Congiu, R., Arvedi, G., Mateddu, A., Marrosu, M. G., Cianchetti, C., Realdi, G., Cao, A. and et al. (1993). Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 329(13): 921-925.
- Murphy, A. M., Thompson, W. R., Peng, L. F. and Jones, L., 2nd (1997). Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem J* 322 (Pt 2): 393-401.
- Nelson, H. H., Christensen, B. C., Plaza, S. L., Wiencke, J. K., Marsit, C. J. and Kelsey, K. T. (2010). KRAS mutation, KRAS-LCS6 polymorphism, and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 69(1): 51-53.
- Olivotto, I., Cecchi, F., Gistri, R., Lorenzoni, R., Chiriatti, G., Girolami, F., Torricelli, F. and Camici, P. G. (2006). Relevance of coronary microvascular flow impairment to long-term remodeling and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 47(5): 1043-1048.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2766-2770.

- Ortiz-Lopez, R., Li, H., Su, J., Goytia, V. and Towbin, J. A. (1997). Evidence for a dystrophin missense mutation as a cause of X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation* 95(10): 2434-2440.
- Patterson, E. E., Holloway, A. K., Weng, J., Fojo, T. and Kebebew, E. (2011). MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer* 117(8): 1630-1639.
- Perkins, M. J., Van Driest, S. L., Ellsworth, E. G., Will, M. L., Gersh, B. J., Ommen, S. R. and Ackerman, M. J. (2005). Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 26(22): 2457-2462.
- Qiao, Y., Ma, N., Wang, X., Hui, Y., Li, F., Xiang, Y., Zhou, J., Zou, C., Jin, J., Lv, G., Jin, H. and Gao, X. (2011). MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Lett*.
- Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 38 Suppl: S8-13.
- Rao, P. K., Toyama, Y., Chiang, H. R., Gupta, S., Bauer, M., Medvid, R., Reinhardt, F., Liao, R., Krieger, M., Jaenisch, R., Lodish, H. F. and Blulloch, R. (2009). Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 105(6): 585-594.
- Rust, E. M., Albayya, F. P. and Metzger, J. M. (1999). Identification of a contractile deficit in adult cardiac myocytes expressing hypertrophic cardiomyopathy-associated mutant troponin T proteins. *J Clin Invest* 103(10): 1459-1467.
- Satoh, M., Minami, Y., Takahashi, Y., Tabuchi, T. and Nakamura, M. (2010). Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 16(5): 404-410.
- Sayed, D., Hong, C., Chen, I. Y., Lypowy, J. and Abdellatif, M. (2007). MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 100(3): 416-424.
- Schroen, B. and Heymans, S. (2009). MicroRNAs and beyond: the heart reveals its treasures. *Hypertension* 54(6): 1189-1194.
- Schunkert, H., Hense, H. W., Holmer, S. R., Stender, M., Perz, S., Keil, U., Lorell, B. H. and Riegger, G. A. (1994). Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 330(23): 1634-1638.
- Shan, Z. X., Lin, Q. X., Deng, C. Y., Zhu, J. N., Mai, L. P., Liu, J. L., Fu, Y. H., Liu, X. Y., Li, Y. X., Zhang, Y. Y., Lin, S. G. and Yu, X. Y. (2010). miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS Lett* 584(16): 3592-3600.
- Shen, J., Ambrosone, C. B., DiCioccio, R. A., Odunsi, K., Lele, S. B. and Zhao, H. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 29(10): 1963-1966.
- Small, E. M., Frost, R. J. and Olson, E. N. (2010). MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 121(8): 1022-1032.

- Suarez-Mier, M. P. and Aguilera, B. (2002). [Causes of sudden death during sports activities in Spain]. *Rev Esp Cardiol* 55(4): 347-358.
- Sucharov, C., Bristow, M. R. and Port, J. D. (2008). miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol* 45(2): 185-192.
- Sweeney, H. L., Straceski, A. J., Leinwand, L. A., Tikunov, B. A. and Faust, L. (1994). Heterologous expression of a cardiomyopathic myosin that is defective in its actin interaction. *J Biol Chem* 269(3): 1603-1605.
- Tavazoie, S. F., Alarcon, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P. D., Gerald, W. L. and Massague, J. (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451(7175): 147-152.
- Teare, D. (1958). Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J* 20(1): 1-8.
- Teekakirikul, P., Eminaga, S., Toka, O., Alcalai, R., Wang, L., Wakimoto, H., Naylor, M., Konno, T., Gorham, J. M., Wolf, C. M., Kim, J. B., Schmitt, J. P., Molkenkin, J. D., Norris, R. A., Tager, A. M., Hoffman, S. R., Markwald, R. R., Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (2010). Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf-beta. *J Clin Invest* 120(10): 3520-3529.
- Thum, T., Galuppo, P., Wolf, C., Fiedler, J., Kneitz, S., van Laake, L. W., Doevendans, P. A., Mummery, C. L., Borlak, J., Haverich, A., Gross, C., Engelhardt, S., Ertl, G. and Bauersachs, J. (2007). MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 116(3): 258-267.
- Tian, T., Shu, Y., Chen, J., Hu, Z., Xu, L., Jin, G., Liang, J., Liu, P., Zhou, X., Miao, R., Ma, H., Chen, Y. and Shen, H. (2009). A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(4): 1183-1187.
- Tripathi, S., Schultz, I., Becker, E., Montag, J., Borchert, B., Francino, A., Navarro-Lopez, F., Perrot, A., Ozcelik, C., Osterziel, K. J., McKenna, W. J., Brenner, B. and Kraft, T. (2011). Unequal allelic expression of wild-type and mutated beta-myosin in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 106(6): 1041-1055.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39(16): 7223-7233.
- van Rooij, E., Quiat, D., Johnson, B. A., Sutherland, L. B., Qi, X., Richardson, J. A., Kelm, R. J., Jr. and Olson, E. N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17(5): 662-673.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Liu, N., Williams, A. H., McAnally, J., Gerard, R. D., Richardson, J. A. and Olson, E. N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48): 18255-18260.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., DiMaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S., Hill, J. A. and Olson, E. N. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 13027-13032.

- Vasan, R. S., Larson, M. G., Aragam, J., Wang, T. J., Mitchell, G. F., Kathiresan, S., Newton-Cheh, C., Vita, J. A., Keyes, M. J., O'Donnell, C. J., Levy, D. and Benjamin, E. J. (2007). Genome-wide association of echocardiographic dimensions, brachial artery endothelial function and treadmill exercise responses in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet* 8 Suppl 1: S2.
- Villar, A. V., Garcia, R., Merino, D., Llano, M., Cobo, M., Montalvo, C., Martin-Duran, R., Hurle, M. A. and Nistal, J. F. (2012). Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. *Int J Cardiol*.
- Vo, N. K., Dalton, R. P., Liu, N., Olson, E. N. and Goodman, R. H. (2010). Affinity purification of microRNA-133a with the cardiac transcription factor, Hand2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45): 19231-19236.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C. and Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2257-2261.
- Wang, G. K., Zhu, J. Q., Zhang, J. T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y. W. and Jing, Q. (2010). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31(6): 659-666.
- Wang, K., Long, B., Zhou, J. and Li, P. F. (2010). miR-9 and NFATc3 regulate myocardin in cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 285(16): 11903-11912.
- Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 15(2): 261-271.
- Wei, J., Gao, W., Zhu, C. J., Liu, Y. Q., Mei, Z., Cheng, T. and Shu, Y. Q. (2011). Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer* 30(6): 407-414.
- Wei, Z., Biswas, N., Wang, L., Courel, M., Zhang, K., Soler-Jover, A., Taupenot, L. and O'Connor, D. T. (2011). A common genetic variant in the 3'-UTR of vacuolar H⁺-ATPase ATP6V0A1 creates a micro-RNA motif to alter chromogranin A processing and hypertension risk. *Circ Cardiovasc Genet* 4(4): 381-389.
- Wu, M., Jolicoeur, N., Li, Z., Zhang, L., Fortin, Y., L'Abbe, D., Yu, Z. and Shen, S. H. (2008). Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis* 29(9): 1710-1716.
- Xu, B., Feng, N. H., Li, P. C., Tao, J., Wu, D., Zhang, Z. D., Tong, N., Wang, J. F., Song, N. H., Zhang, W., Hua, L. X. and Wu, H. F. (2010). A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 70(5): 467-472.
- Xu, C., Lu, Y., Pan, Z., Chu, W., Luo, X., Lin, H., Xiao, J., Shan, H., Wang, Z. and Yang, B. (2007). The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci* 120(Pt 17): 3045-3052.

- Xu, J., Gong, N. L., Bodi, I., Aronow, B. J., Backx, P. H. and Molkenin, J. D. (2006). Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice. *J Biol Chem* 281(14): 9152-9162.
- Yang, H., Dinney, C. P., Ye, Y., Zhu, Y., Grossman, H. B. and Wu, X. (2008). Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res* 68(7): 2530-2537.
- Ye, Y., Wang, K. K., Gu, J., Yang, H., Lin, J., Ajani, J. A. and Wu, X. (2008). Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 1(6): 460-469.
- Zhang, H. L., Yang, L. F., Zhu, Y., Yao, X. D., Zhang, S. L., Dai, B., Zhu, Y. P., Shen, Y. J., Shi, G. H. and Ye, D. W. (2011). Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* 71(3): 326-331.
- Zhang, J., Du, Y., Wu, C., Ren, X., Ti, X., Shi, J., Zhao, F. and Yin, H. (2010). Curcumin promotes apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through miR-186* signaling pathway. *Oncol Rep* 24(5): 1217-1223.
- Zhao, Y., Samal, E. and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436(7048): 214-220.
- Zhou, B., Rao, L., Peng, Y., Wang, Y., Chen, Y., Song, Y. and Zhang, L. (2010). Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 411(17-18): 1287-1290.
- Zou, Y., Song, L., Wang, Z., Ma, A., Liu, T., Gu, H., Lu, S., Wu, P., Zhang dagger, Y., Shen dagger, L., Cai, Y., Zhen double dagger, Y., Liu, Y. and Hui, R. (2004). Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in China: a population-based echocardiographic analysis of 8080 adults. *Am J Med* 116(1): 14-18.

Anexo: Publicaciones

**Profile of MicroRNAs
Differentially Produced in
Hearts from Patients with
Hypertrophic Cardiomyopathy
and Sarcomeric Mutations**

To the Editor:

MicroRNAs (miRNAs)¹ regulate cardiac growth and conduction and play an important role in cardiac diseases (1). Several miRNAs are differentially produced in cardiac hypertrophic tissue, compared with normal tissue, and may contribute to the development of cardiomyocyte hypertrophy (2, 3). Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is frequently familial and caused by mutations in sarcomeric genes. To our knowledge, no study has reported the miRNA production profile in HCM tissues with sarcomeric gene mutations. To better define the molecular changes in HCM, we defined the production of well-characterized miRNAs in left ventricular (LV) heart tissue from 5 patients who underwent a cardiac transplantation and a control heart tissue (human LV tissue, Ambion/Applied Biosystems), and we compared their production profiles. Two of the patients were familial HCM patients who were carriers of missense mutations in the *MYH7*² (myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta) gene (Val822Met and Arg453Cys). Three patients were cases of sporadic LV hypertrophy secondary to heart valve disease.

The study was approved by the Ethical Committee of Hospital Universitario Central Asturias

(HUCA), and all of the patients provided written informed consent. We isolated total RNA with TRIzol (Invitrogen) and used the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Megaplex RT Human Pool A primers, and TaqMan human MicroRNA TLDA plate A (all from Applied Biosystems) to determine the production profile of 377 human miRNAs in the healthy LV tissues and in a pool of the 2 tissues with *MYH7* mutations. Each sample was analyzed in triplicate, and the mean threshold cycle (C_T) value for each miRNA was normalized by using mammalian *U6* as the reference gene. A *P* value <0.05 with respect to the -fold difference in miRNA production (HCM pool vs healthy LV tissue) was considered statistically significant. The detailed experimental procedure is available upon request to the corresponding author.

Compared with the healthy LV tissue, the HCM tissue showed an overall downregulation of miRNAs. Although the 2 tissues were not significantly different with respect to most of the miRNAs, with a C_T difference between the 2 tissues of <4 (data not shown), the 2 tissues were significantly different with respect to the production of 19 of the miRNAs (Table 1). These miRNAs were individually assayed in triplicate in the LV control and the 5 pathologic tissues via real-time TaqMan miRNA assays (Applied Biosystems). Ten miRNAs were underproduced (miR-1, miR-133b, miR-191, miR-208b, miR-218, miR-30b, miR-374, miR-454, and miR-495) in the 5 pathologic tissues, and 2 miRNAs were overproduced (miR-590–5p and miR-92a). miR-495 was the only miRNA that differentiated hearts with and without sarcomeric mutations. Compared with the healthy tissue, miR-495 was underproduced in the 2 samples with *MYH7* mutations and overproduced in the 3 samples without sarcomeric muta-

tions. This miRNA is deregulated in primary muscular disorders but not in cardiac diseases. miR-590–5p and miR-92a were overproduced in all of the pathologic tissues. Neither of these 2 miRNAs had previously been reported as deregulated in cardiac hypertrophy and other heart diseases.

miR-1 and miR-133 were underproduced in the hypertrophic tissues and have previously been implicated in cardiac development. They are significantly downregulated in hearts from patients with idiopathic and ischemic cardiomyopathies (4, 5). miR-208a and miR-208b are encoded by introns in the *MYH6* (myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha) and *MYH7* genes, respectively. In mice, the reexpression of *Myh7* {myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta [*Mus musculus*]} and the production of miR-208b is a characteristic of cardiac hypertrophy in response to pressure overload. In agreement with a role for these miRNAs in the development of HCM, miR-208a was also overproduced in the 2 patients with *MYH7* mutations. Interestingly, the -fold change in miR-208a in one of the HCM patients was the highest among all the miRNAs analyzed in our study (Table 1). The downregulation of miR-208b was lower in the 3 patients with cardiac hypertrophy secondary to valve disease, suggesting that the changes in production of this miRNA could differ between hypertrophic hearts with and without sarcomeric gene mutations.

Compared with other studies of samples from patients with heart failure, we analyzed pathologic tissues with a recognized sarcomeric mutation that would be the primary cause of the hypertrophy in these patients. Changes in miRNA production might differ between hypertrophic hearts with sarcomeric mu-

¹ Nonstandard abbreviations: miRNA, microRNA; HCM, hypertrophic cardiomyopathy; LV, left ventricular; HUCA, Hospital Universitario Central Asturias; C_T , threshold cycle.

² Genes: *MYH7*, myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta; *MYH6*, myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha; *Myh7*, myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta [*Mus musculus*].

Table 1. -Fold change of relative-quantification values compared with healthy LV tissue (*P* values in parentheses) for the 19 miRNAs selected after the TLDA array screening.

miRNA	HC, mean C _T	Heart tissue from cardiomyopathy patients ^a				
		H1	H9	H2	H3	H5
1	15	0.13 (0.003)	0.13 (0.004)	0.34 (0.006)	0.004 (0.002)	0.15 (0.004)
133a	15	0.67 (0.04)	0.23 (0.007)	0.28 (0.02)	0.36 (0.006)	1.00 (0.9)
133b	19	0.50 (0.05)	0.30 (0.02)	0.55 (0.12)	0.11 (0.002)	0.04 (0.4)
191	14	0.37 (0.006)	0.13 (0.003)	0.40 (0.01)	0.84 (0.08)	0.21 (0.07)
218	22	0.77 (0.32)	0.26 (0.02)	0.62 (0.03)	0.39 (0.005)	0.49 (0.05)
30b	16	0.59 (0.01)	0.58 (0.03)	0.48 (0.01)	0.04 (0.002)	0.29 (0.004)
374	22	0.46 (0.008)	0.4 (0.01)	0.90 (0.93)	0.19 (0.005)	0.53 (0.14)
454	25	0.12 (0.003)	0.001 (0.05)	0.19 (0.004)	0.10 (0.002)	0.58 (0.04)
495	25	0.68 (0.05)	0.42 (0.007)	1.30 (0.03)	8.32 (0.29)	4.40 (0.04)
93	19	0.79 (0.09)	0.45 (0.02)	0.82 (0.28)	16.51 (0.12)	1.29 (0.58)
199a-3p	29	3.48 (0.04)	1.86 (0.05)	1.73 (0.07)	0.12 (0.047)	1.96 (0.40)
590-5p	17	7.90 (0.003)	3.33 (0.01)	10.13 (0.002)	1.31 (0.05)	2.62 (0.04)
92a	23	5.31 (0.006)	1.65 (0.04)	5.05 (0.007)	1.26 (0.25)	6.68 (0.04)
125a-3p	26	1.37 (0.06)	0.003 (0.002)	0.65 (0.01)	0.75 (0.03)	8.26 (0.003)
208a	26	1.17 (0.82)	15.40 (0.002)	7.21 (0.04)	0.93 (0.87)	0.47 (0.008)
223	17	1.59 (0.06)	0.18 (0.006)	0.22 (0.004)	0.14 (0.002)	0.67 (0.11)
483-5p	23	1.05 (0.08)	4.46 (0.007)	0.04 (0.04)	0.872 (0.45)	2.02 (0.10)
451	19	2.65 (0.01)	0.07 (<0.001)	1.33 (0.11)	0.02 (<0.001)	1.09 (0.5)
208b	24	0.79 (0.76)	0.81 (0.66)	0.53 (0.05)	0.06 (0.02)	0.18 (0.04)

^a H1 and H9 correspond to the patients with MYH7 mutations, and H2, H3, and H5 correspond to the patients with disease secondary to cardiac valvular disease. The mean C_T values for the healthy tissue are also indicated. HC, healthy control.

tations and hearts in which the disease was secondary to another condition causing the hypertrophy. The difference between these cases and those without sarcomeric mutations should be replicated with other patients, including cases with mutations in different sarcomeric genes. We also studied failing explanted hearts that represented advanced stages of the disease; thus, we cannot exclude the possibility that some of the deregulated miRNAs were not representative of the changes at the initial stages of the disease.

Author Contributions: All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, ac-

quisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest: Upon manuscript submission, all authors completed the Disclosures of Potential Conflict of Interest form. Potential conflicts of interest:

Employment or Leadership: None declared.

Consultant or Advisory Role: None declared.

Stock Ownership: None declared.

Honoraria: None declared.

Research Funding: Grant Spanish Fondo Investigaciones Sanitarias-Fondos Feder (FIS 09/0172).

Expert Testimony: None declared.

References

- Liu N, Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell* 2010; 18:510–25.
- Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif

M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007;100:416–24.

- van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 18255–60.
- Sucharov C, Bristow MR, Port JD. miRNA expression in the failing human heart: functional correlates. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:185–92.
- Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, et al. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009;119: 1263–71.

María Palacín³
 Julián R. Reguero⁴
 María Martín⁴
 Beatriz Díaz Molina⁴
 César Morís^{4,5}

Victoria Alvarez²
Elicer Coto^{2,5*}

³ *Genética Molecular-Laboratorio de Medicina and*

⁴ *Cardiología-Fundación Asturcor Hospital Universitario Central Asturias Oviedo, Spain*

⁵ *Departamento de Medicina Universidad de Oviedo Oviedo, Spain*

* Address correspondence to this author at:
 Genética Molecular
 HUCA-Maternidad
 33006 Oviedo, Spain
 Fax +34-985-107968
 E-mail eliecer.coto@sespa.princast.es

Previously published online at
 DOI: 10.1373/clinchem.2011.168005

Long-Term Stability of Clinical Laboratory Data—Sodium as Benchmark

To the Editor:

For adequate longitudinal investigation of individual patients, clinicians rely on long-term stability of laboratory data. This requirement is also essential to maximize the

benefits and outcome of clinical trials and epidemiologic studies extended over several years. The long-term stability of laboratory measurements has scarcely been documented, however, and quality criteria are lacking. We selected sodium measurement in serum/plasma to serve as a benchmark for achievable stability, because this analyte receives the most attention by the in vitro diagnostics industry in terms of restricting lot-to-lot variation. Moreover, we believe that with these data as a benchmark, industry can establish specifications for the realistic stability of assays used for the measurement of other analytes.

For this purpose, we investigated the sodium results from Ghent University Hospital (in serum and in lithium heparin-treated plasma) and Brussels University Hospital (in lithium heparin-treated plasma) covering the period from December 2001 to August 2010 and from January 1997 to October 2010, respectively. We calculated the daily 10th, 50th, and 90th percentiles, with exclusion of the measurements made on weekends and holidays. The number of results per weekday for Ghent and

Brussels gradually increased from 495 to 640 and from 279 to 420, respectively. Moving means ($n = 5$) were calculated to visualize shifts of >1 mmol/L. For all data, we calculated the percentages of results <135 mmol/L, a cutoff typically used as an indicator for hyponatremia (1).

The Ghent laboratory measured sodium with an indirect ion-selective electrode (ISE) method on a Modular P Analytics and Hitachi 917 analyzer, which was replaced in November 2006 by a Cobas 6000 c501 analyzer (all Roche Diagnostics). In the Brussels laboratory, the Vitros 950IRC was gradually replaced by 3 Vitros Fusion 5,1 FS analyzers (Ortho Clinical Diagnostics).

Fig. 1 shows the 5-day moving means of the 50th percentile for the sodium results from the Ghent and Brussels laboratories. The long-term mean was 140.0 mmol/L (CV, 0.9%) for Ghent and 140.5 mmol/L (CV, 0.6%) for Brussels. Inspection of the 50th percentile documented 7 shifts for the Ghent laboratory and 10 for the Brussels laboratory. For Ghent, major shifts coincided with annual changes in ISE compensator lots. Reassign-

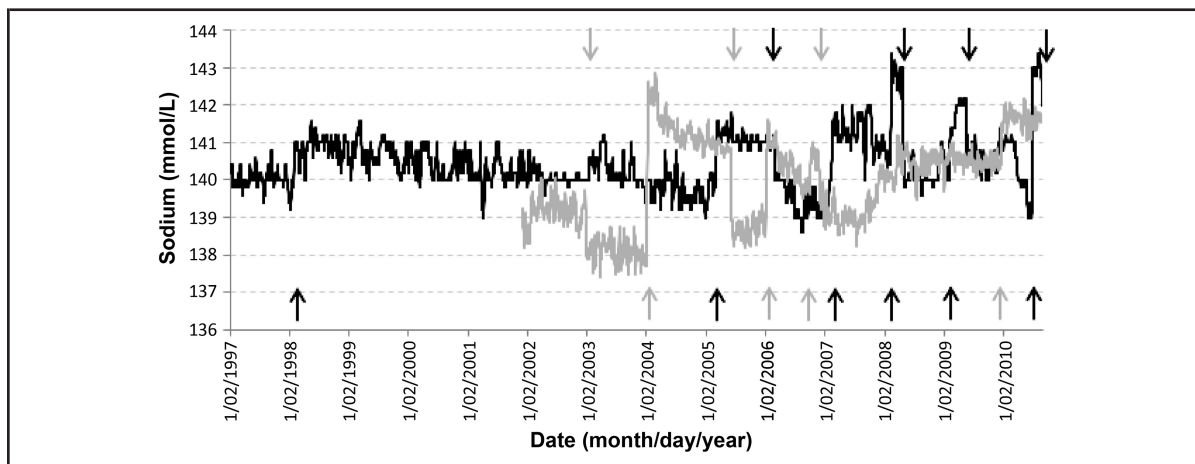


Fig. 1. Fiftieth percentile for serum sodium with a 5-day moving mean for Ghent University Hospital (gray line) and Brussels University Hospital (black line).

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Cardiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Profile of micro RNAs in the plasma of hypertrophic cardiomyopathy patients compared to healthy controls.

Article Type: Letter to the Editor

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy; sarcomeric mutations; micro RNAs

Corresponding Author: Dr. Eliecer Coto, PhD

Corresponding Author's Institution: Genetica-Maternidad-Hospital Central

First Author: MARÍA PALACIN

Order of Authors: MARÍA PALACIN; Eliecer Coto, PhD; JULIAN R REGUERO; CÉSAR MORÍS; VICTORIA ALVAREZ

Manuscript Region of Origin: SPAIN

Suggested Reviewers: María A Hurlé
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain
hurlem@unican.es

Editor Int J Cardiol

Oviedo, 23-ag-2012

Dear Editor

We submit a letter entitled **Profile of micro RNAs in the plasma of hypertrophic cardiomyopathy patients compared to healthy controls**, by María Palacín, Eliecer Coto, Julián R. Reguero, César Morís, Victoria Alvarez.

This work was not submitted elsewhere.

All the authors have seen and approved the final version of the ms.

Sincerely yours

Eliecer Coto
Genética Molecular
HUCA-Maternidad
33006-Oviedo-SPAIN
eliecer.coto@sespa.princast.es

International Journal of Cardiology

AUTHOR AGREEMENT FORM

Manuscript Title: Profile of micro RNAs in the plasma of hypertrophic cardiomyopathy patients compared to healthy controls.

List of All Authors: María Palacín, Eliecer Coto, Julián R. Reguero, César Morís, Victoria Alvarez,

Corresponding Author:

This statement is to certify that all Authors have seen and approved the manuscript being submitted. We warrant that the article is the Authors' original work. We warrant that the article has not received prior publication and is not under consideration for publication elsewhere. On behalf of all Co-Authors, the corresponding Author shall bear full responsibility for the submission.

This research has not been submitted for publication nor has it been published in whole or in part elsewhere. We attest to the fact that all Authors listed on the title page have contributed significantly to the work, have read the manuscript, attest to the validity and legitimacy of the data and its interpretation, and agree to its submission to the *International Journal of Cardiology*.

The Authors of this manuscript have also certified that they comply with the Principles of Ethical Publishing in the *International Journal of Cardiology* and will cite a reference that includes this statement in their reference list. All authors agree that author list is correct in its content and order and that no modification to the author list can be made without the formal approval of the Editor-in-Chief, and all authors accept that the Editor-in-Chief's decisions over acceptance or rejection or in the event of any breach of the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology being discovered of retraction are final.

Profile of micro RNAs in the plasma of hypertrophic cardiomyopathy patients compared to healthy controls.

María Palacín, Eliecer Coto, Julián R. Reguero, César Morís, Victoria Alvarez,

Genética Molecular-Laboratorio de Medicina-Fundación Renal (IRSIN-FRIAT), Hospital Universitario Central Asturias, Oviedo, Spain (MP, EC, VA).

Cardiología-Fundación Asturcor, Hospital Universitario Central Asturias, Oviedo, Spain (JRR, CM).

Departamento de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain (EC, CM).

Red de Investigación Renal-REDINREN, Spain (EC).

Correspondence to:

Eliecer Coto

Genética Molecular

HUCA-Maternidad

33006-Oviedo-SPAIN

eliecer.coto@sespa.princast.es

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy; sarcomeric mutations; micro RNAs.

Micro RNAs (miRNAs) are small RNAs that negatively regulate gene expression by complementary binding to the 3' untranslated regions (UTR) of mRNAs [1]. Several miRNAs have been found deregulated in pathological processes, including hypertrophic cardiomyopathy (HCM) [2-4]. For instance, miR-23a, -9, and -199 were detected in HCM hearts, while miRNAs of the -1, -133, and -208 families were significantly underrepresented in pathological compared to normal heart tissue [5]. Serum miRNAs are promising new markers for several diseases [6]. The presence of some cardiac-specific miRNAs in the blood of patients with acute myocardial infarction (AMI) that were absent among healthy subjects has been recently reported [7, 8]. These miRNAs would be released from death cardiomyocytes, and their presence in the blood could reflect ischemic episodes. Moreover, the level of these miRNAs in blood correlated with infarct size estimated by cardiac Troponin T (cTnT) release with the all-cause mortality at 6 months [8]. Our aim was to determine whether some miRNAs could be also used as specific circulating biomarkers in HCM.

This research was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Central Asturias and complies with the Principles of Ethical Publishing in the International Journal of Cardiology [9]. All the patients and controls signed an informed consent to participate in the study. Blood from HCM patients (n=24; **table 1**) and healthy controls (n=25) was collected in EDTA-tubes and centrifuged. Plasma samples were processed with the TRI Reagent LS (SIGMA chemicals). The final precipitate was resuspended in 50 μ l of RNase free water and 5 μ l were retrotranscribed with the Megaplex RT primers human pool A and the Taqman microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, ABI). A total of 5 μ l were preamplified with the Megaplex Preamp primers human pool A and the Taqman Universal PCR master mix no AmpErase UNG (ABI). The amount of 10 HCM or AMI-candidate

miRNAs (miR-483-5p, 92a, 199-3p, 30b, 451, 1, 133a, 133b, 208a, 208b) was determined with specific individual miRNA Taqman assays [10]. MiR 191 and miR 223, constitutively amplified in blood were amplified as normalization controls. Each sample was assayed by triplicate, and the mean CT value for each miRNA was calculated (details about the experimental procedure and results available upon request to the corresponding author).

Overall, only miR-483-5p was overrepresented among the patients (mean CT =28 vs. 33, $p=0.03$) (**figure 1**). This miRNA was detected in all the HCM patients and in 18 of the 24 controls and could thus not be useful as a specific plasma HCM marker. Members of the miR-1, 133, and 208 families that have been found in the blood of patients with AMI were marginally or not detected in the patients and controls.

Hearts from HCM patients were characterized by the overexpression of some miRNAs, compared to healthy cardiac tissue [2]. Several facts could explain the absence in plasma of some miRNAs overrepresented in HCM hearts. First, cardiomyocyte death would release tissue enriched miRNAs to the bloodstream but in HCM myocytes die in a staggered manner, in opposition to the abrupt and massive death observed in ischemic cardiac disease. In addition, plasma levels of miRNAs could reflect the disease stage or severity, or any other patients characteristic. All the patients in our study had marked limitations in activity due to symptoms, and were classified as NYHA III-IV classes. MiRNAs characteristic of less advanced stages would thus not be characterized in our study.

In summary, we found an overexpression of miR-483-5p in blood plasma from HCM patients compared to healthy controls. However, the overlap in plasma levels between the two groups make necessary to perform additional studies with larger cohorts of patients and controls to define its usefulness as a plasma marker for HCM.

Acknowledgments

MPF was the recipient of predoctoral fellowship from FICYT-Principado de Asturias. This work was supported by a grant from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER European Union (FIS-09/0172)

Competing interests: None.

References.

1. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215–233
2. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007; 100: 416–24
3. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18255–60
4. Sucharov C, Bristow MR, Port JD. miRNA Expression in the Failing Human Heart: Functional Correlates. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 45: 185–92.
5. Latronico MV, Condorelli G. microRNAs in hypertrophy and heart failure. *Exp Biol Med* 2011; 236: 125-131.
6. Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. . Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE* 2008; 3(9): e3148.
7. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2010; 31: 2765-2773.
8. Widera C, Gupta SK, Lorenzen JM, Bang C, Bauersachs J, Bethmann K, Kempf T, Wollert KC, Thum T. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 51: 872-875

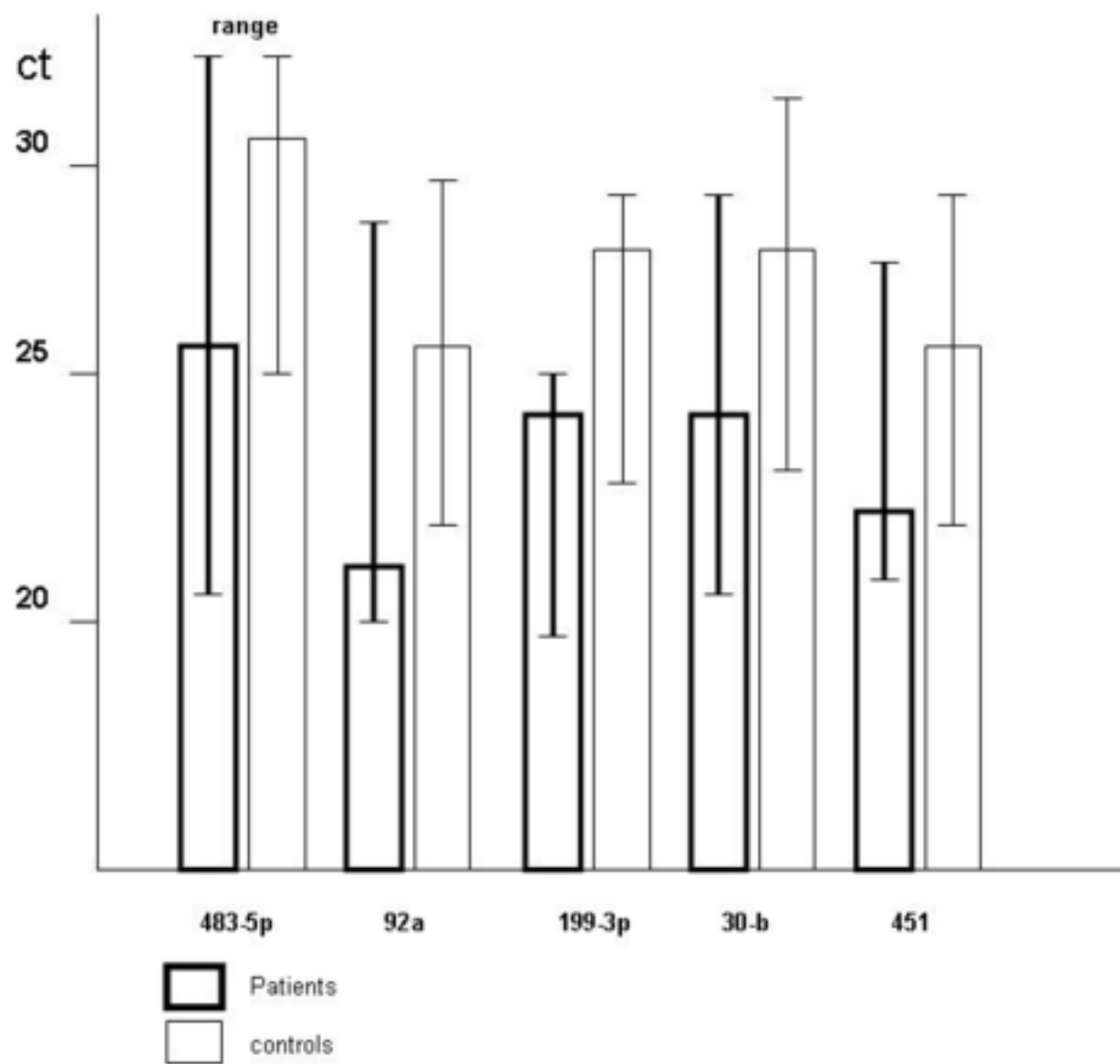
9. Coats AJS and Shewan LG. Statement on Authorship and Publishing Ethics in the International Journal of Cardiology. *Int J Cardiol* 2011; 153: 239-40 (DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.10.119).
10. Palacín M, Reguero JR, Martín M, Díaz Molina B, Morís C, Alvarez V, Coto E. Profile of MicroRNAs Differentially Produced in Hearts from Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy and Sarcomeric Mutations. *Clin Chem*. 2011; 57: 1614-1616.

Table 1. Main characteristics of the 24 patients.

Patient ID	Age onset	Sex	Family history	NYHA	Septum (mm)
3	51	M	yes	IV	19
87	57	F	yes	IV	17
185	58	M	yes	III	17
214	30	M	yes	III	18
219	34	F	No	III	19
227	14	F	No	III	17
229	75	M	No	III	18
230	72	M	yes	IV	22
236	59	M	No	III	19
239	42	M	No	IV	18
243	26	M	yes	III	14
244	25	F	yes	III	26
247	38	M	yes	III	22
250	64	M	No	III	29
266	49	F	No	III	13
267	57	M	No	III	27
280	55	M	No	III	25
263	49	M	yes	III	24
242	29	F	No	III	21
257	49	F	yes	III	19
264	65	M	yes	IV	31
270	45	M	No	III	23
273	47	F	yes	III	21
280	25	M	yes	III	19
255	45	M	yes	III	18

NYHA= New York Heart association functional grade; Sex, M=male, F=female.

Figure 1. Mean plasma CT value and range for five miRNAs in patients (thick boxes) and controls.



DNA variation in myoMIRs of the 1, 133, and 208 families in hypertrophic cardiomyopathy

María Palacín,¹ Eliecer Coto,^{1,3,4}
Julián R. Reguero,² María Martín,²
César Moris,^{2,3} Belén Alonso,¹
Marta Díaz,¹ Ana I. Corao,¹
Victoria Alvarez¹

¹Genética Molecular, Hospital Central Asturias; ²Cardiología-Fundación Asturcor, Hospital Universitario Central Asturias; ³Departamento Medicina, Universidad Oviedo, Oviedo; ⁴Red de Investigación Renal-REDINREN; ⁴Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Spain

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that bind to mRNAs and regulate gene expression. MyoMirs are miRNAs implicated in cardiogenesis. Some MyoMirs have been found deregulated in hearts from patients with left ventricular hypertrophy (LVH). DNA variants at these miRNAs could contribute to the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy (HCM). To test this hypothesis we used single strand conformation analysis and direct sequencing to search for DNA variants in the miR-208a, miR-208b, miR-133a-1, miR-133a-2, miR-133b, miR-1-1, and miR-1-2 genes in patients with HCM (n=245), LVH secondary to hypertension (n=120), and healthy controls (n=250). We found several nucleotide variants. Genotyping of patients and healthy controls showed significant associations between a 133a-1 polymorphism and HCM and a 133b polymorphism and hypertensive-LVH. We concluded that rare variants in these mature miRNAs would be rarely found among HCM patients, but miR-133a-1 and 133b polymorphisms could contribute to the risk of developing cardiac hypertrophy.

Introduction

Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the posttranscriptional level. By base pairing to the 3' untranslated regions (3'UTRs) of messenger RNAs (mRNAs), miRNAs repress the expression of many genes and regulate physiological processes such as cell differentiation, growth, proliferation, and apoptosis.¹ Several miRNAs play an important role in myo-

genesis and heart development and function, and are designated as MyoMIRS.

The biogenesis of miRNAs involves several steps: first a pri-miRNA is synthesized by the action of RNA polymerase II; in a second step, the pri-miRNA is processed by the enzyme Drosha to give an approximately 90 nucleotides long pre-miRNA.² Pre-miRNAs form several stem-loop secondary structures that are necessary for a correct cleavage that renders a double stranded miRNA, that is then processed to the single-strand mature miRNA and incorporated into the RNA induced silencing complex (RISC; a ribonucleoprotein complex that regulates mRNA expression).³ The genes encoding miRNAs are mono- or polycistronic (*i.e.* the miR-1-1/miR-133a-2 and miR-1-2/miR-133a-1 clusters), and either inserted in introns (*i.e.* miR208a and 208b) or in intergenic regions. A genome-wide survey of human single nucleotide polymorphisms (SNPs) suggested that <1% of the miRNAs have SNPs in their mature sequences, while ~10% of the pre-miRNA sequences are polymorphic.⁴ These pre-miRNA polymorphisms could affect the processing of miRNAs, being thus of relevance for the susceptibility to diseases.⁵

Left ventricular hypertrophy (LVH) is a pathological response to some cardiovascular diseases, such as valvular disease, ischemic heart disease, and hypertension. Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the left ventricular wall thickening in the absence of cardiac or systemic disease capable of producing the hypertrophy. HCM is frequently familial and transmitted as an autosomal-dominant trait, and the genes primarily involved in HCM encode proteins of the sarcomere.⁶ However, in all the large reported cohorts a significant number of patients did not have sarcomeric mutations, suggesting that other not yet identified genes could be implicated in this disease.⁷ Recent reports have elucidated the role of several miRNAs in cardiac hypertrophy.⁸ The overexpression of some miRNAs (*i.e.* miR-208) has been linked to hypertrophy in mice.⁹ In contrast, *in vitro* overexpression of miR-133 and miR-1 inhibited cardiac hypertrophy, while suppression of the miR-133 pathway induced hypertrophy.¹⁰ These miRNAs enhanced myoblast proliferation by repressing the expression of serum response factor, an essential activator of myogenesis, and several genes that have been implicated in cardiogenesis and hypertrophy are targets of miR-133.^{8,11} The expression of miR-133 has been assessed in murine models of cardiac hypertrophy. The transverse aortic archconstricted mice developed pressure overload and cardiac myocyte hypertrophy and showed a reduced expression of miR-133, indicating that this miRNA family could be involved in the development of cardiac hypertrophy in response to hypertension.¹¹

Correspondence: Eliecer Coto, Genética Molecular, HUCA-Maternidad 33006-Oviedo-Spain.

E-mail: eliecer.coto@sespa.princast.es

Key words: microRNAs, myoMIRs, cardiac hypertrophy, DNA polymorphisms, genetic association.

Received for publication: 1 September 2011.

Revision received: 25 October 2011.

Accepted for publication: 26 October 2011.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright M. Palacín et al., 2011
Licensee PAGEPress, Italy
Cardiogenetics 2011; 1:e12
doi:10.4081/cardiogenetics.2011.e12

Based on the role of several miRNAs in the pathogenesis of HCM and the association between miRNA gene variants and some diseases, we hypothesised that myoMIR variants could also act as HCM-risk factors. To test this hypothesis we defined the DNA variation at several miRNAs in a group of HCM-patients and healthy controls.

Materials and Methods

Patients and controls

The study was based on a total of 245 HCM patients recruited through the Cardiology Department of HUCA.

The inclusion criteria and main characteristics of these patients had been previously reported.^{12,13} HCM was diagnosed based on the echocardiographic finding of a left ventricular septum >15 mm in the absence of any other disease that could explain the hypertrophy. All the HCM patients were screened for mutations in the most frequently mutated sarcomeric genes: beta myosin heavy chain (*MYH7*), cardiac troponin T (*TNNT2*), alpha-tropomyosin (*TPM1*), cardiac troponin I (*TNNI3*), and myosin binding protein C3 (*MYBPC3*).¹² We also studied 120 patients with LVH secondary to hypertension. The control group consisted on 250 healthy individuals who did not have symptoms of cardiac hypertrophy. However, they were not echocardiographically examined to exclude the existence of asymptomatic LVH. Patients and controls were Caucasians from the same region (Asturias, Northern Spain, total population 1 million), and gave their informed consent to participate in the study, approved by the Ethical Committee of Hospital Central Asturias.

Identification of myoMIR variants

All the experimental procedures are available upon request to the corresponding author. Genomic DNA was obtained from 10 mL of blood, and 350 to 450 nucleotides of the mir-208a, -208b, -133a-1, -133a-2, -133b, -1-1, and -1-2 genes were polymerase chain reaction (PCR)-amplified. To search for sequence variants, the PCR fragments were amplified from all the HCM patients and analysed through single strand conformation analysis (SSCA). PCR-fragments from individuals who showed heterogeneous SSCA patterns were sequenced using BigDye chemistry in an automated ABI3130 capillary system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to identify the nucleotide changes. The nucleotide variants were numbered according to the mature miRNA sequences, with -1 and +1 as the first 5' upstream and 3' downstream nucleotide, respectively.

Genotyping of myoMIR variants

All the patients and controls were genotyped for the myoMIR variants based on their SSCA patterns (208a, 208b, 133a2) or through digestion with a restriction enzyme (PCR-RFLP; 133b and 133a1) as reported.¹⁴ To validate the accuracy of these methods we confirmed the genotype from several individuals by sequencing the PCR-fragments (Figure 1).

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies in patients and controls were compared through a chi-squared test. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were obtained to calculate the relative risk associated with the genotypes. Because sarcomeric mutations can explain the development of HCM in some patients, in order to maximize the chance of detecting any effect MyoMIR polymorphisms on HCM-risk we also compared the allele/genotype frequencies between patients with and without sarcomeric mutations and controls. The chi-squared was also used to analyse the deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium of the genotype frequencies. All statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (v.11.0).

Results

Table 1 summarizes the main characteristics of patients and controls. SSCA of the 10 myoMIRs in the HCM patients showed heterogeneous electrophoretic patterns for the PCR fragments of 208a, 208b, 133a-1, 133a-2, and 133b. A total of seven nucleotide changes were identified, and two were new changes (no reported as polymorphisms in the ensembl

database; www.ensembl.org). Allele and genotype frequencies for these variants in patients and controls are summarised in Table 2.

We found two nucleotide variants in the miR-133a-1 and 133b sequences. Carriers of the miR-133a-1 +85A were significantly more frequent in HCM patients without sarcomeric mutations (12%) compared to controls (5%; $P=0.02$, $OR=2.30$, $95\%CI=1.13-4.67$), HCM

patients with sarcomeric mutations, and LVH-hypertensives. Carriers of the -90A-deletion in miR-133b were significantly more frequent among the LVH-hypertensives (17%) compared to controls (8%; $P=0.03$, $OR=1.99$, $95\%CI=1.06-3.76$), and HCM patients (Table 2). Moreover, two LVH-hypertensives were delA homozygotes compared to none in the control and HCM groups. This suggested that the -90

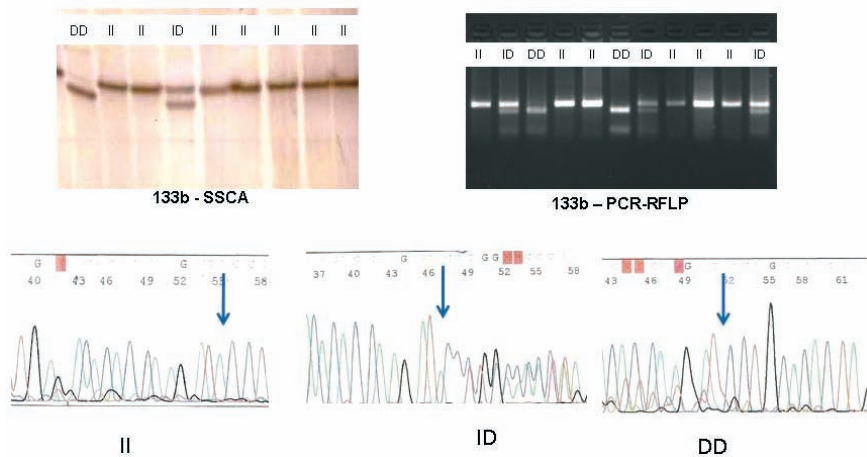


Figure 1. Single strand conformation analysis (SSCA) and polymerase chain reaction (PCR)-RFLP patterns and sequence for the three 133b ins/del A genotypes.

Table 1. Main characteristics of the patients with HCM and LVH secondary to hypertension.

	HCM (n=245)	Hypertensive LVH (n=120)
Mean age at diagnosis (years)	45±13	58±17
Rang	18-75	35-75
Male	144 (59%)	71 (59%)
Family history (HCM or sudden death)	105 (43%)	-
Mean BMI		
Male	27±3	28±4
Female	26±4	28±5
Mean IVS (mm)	20±5	15±5
Mean PWT (mm)	13±5	10±6
Mean LVWT	34±6	26±6
Dyspnea	168 (69%)	36 (30%)
NYHA index		
Class I-II	120 (48%)	28 (23%)
Class III-IV	48 (20%)	8 (7%)
Angina	96 (39%)	19 (16%)
Syncope	48 (20%)	7 (6%)
Atrial fibrillation	47 (19%)	18 (15%)
Arrhythmia (Holter monitoring)	55 (22%)	20 (17%)
LVOT >30 mm Hg	72 (29%)	32 (27%)
Sarcomeric mutations		
MYH7	12 (5%)	-
MYBPC3	22 (9%)	-
TNNT2	4 (2%)	-
TPM1	1 (<1%)	-
TNNI3	1 (>1%)	-

HCM, hypertrophic cardiomyopathy; LVH, left ventricular hypertrophy; IVS, interventricular septum; PWT, posterior wall thickness; LVWT, left ventricular wall thickness; NYHA, New York Heart Association functional class; LVOT, left ventricular outflow tract gradient.

del A could be a risk factor for LVH secondary to hypertension. An online analysis (MFold, <http://mfold.rna.albany.edu>) showed that the miR-133a-1 and miR-133b polymorphisms altered the secondary structure of the two pri-miRNAs (Figure 2).

We found three previously reported 133a-2 SNPs: -191 G/A (SNP reference number rs45547937), 171G/A (rs13040566), and -88 G/A (rs13040413). Sequencing of several cases with different SSCA patterns showed three different allele combinations: -191AA/-171AA/-88AA, -191GG/-171GG/-88GG, and -191AG/-171AG/-88AG. This suggested that the three 133a-2 SNPs were in complete linkage disequilibrium, defining two haplotypes: -191A/-171A/-88A and -191G/-171G/-88G. No significant difference was found between patients and controls for these polymorphisms.

We found a rare miR-208a variant (-175 C>A) in one HCM patient, a 66 years old female with a septum of 26 mm and no mutations in the sarcomeric genes. No relatives were available for the genetic study to determine whether this variant segregated with the disease.

Discussion

The variation at the mature miRNA sequences could affect the binding of their target mRNAs (the seed region) and affect the capacity to regulate gene expression. Naturally occurring changes in these critical miRNA nucleotides are very rare. In a search for nucleotide variants in 227 human miRNAs, Duan *et al.* only found one SNP in the mature miR-125a.⁵ Nucleotide changes in mature miRNAs are commonly found in tumor tissues as acquired mutations associated with the development of several cancer types.¹⁵⁻¹⁷ None of the myoMIR variants found in our study was in the mature miRNA sequences. We thus concluded that nucleotide changes in these critical regions would not contribute to the risk of developing cardiac hypertrophy.

We found a significant association between common variants in the 133a-1 and 133b miRNA genes and HCM without sarcomeric mutations and LVH secondary to hypertension, respectively. Nucleotide variants in miRNA genes could disrupt the normal RNA secondary structure and could have an effect on disease risk through the processing and expression of the pre-miRNA and mature miRNA.¹⁵ All the myoMIR variants found in our study were out of the pre-miRNA sequence and a direct effect on the secondary structure of the double-stranded stem of the pre-miRNA hairpin could thus be excluded. Although the 133a-1 and 133b nucleotide polymorphisms would alter the pri-miRNAs secondary structure, struc-

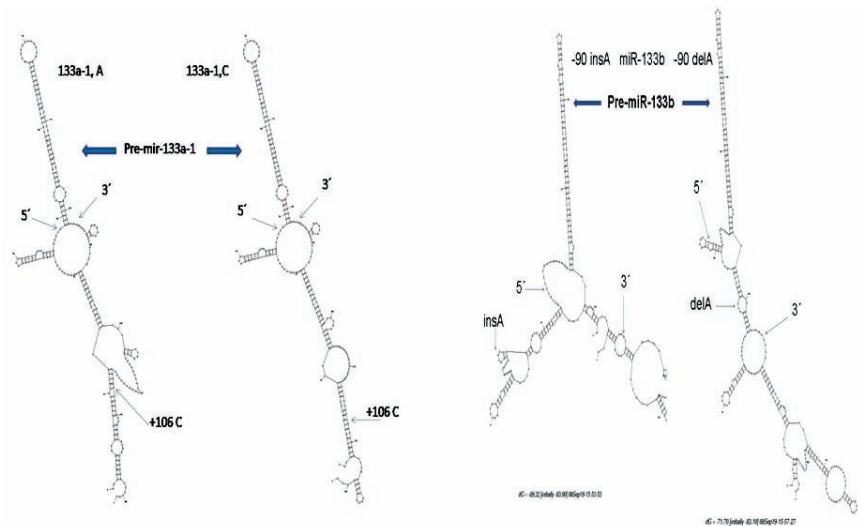


Figure 2. Secondary structure of the 133a-1 and 133b pri-miRNAs containing the two alleles. The 5' and 3' ends of the pre-miRNAs are also indicated.

Table 2. Genotype and allele frequencies for the myoMIR polymorphisms.

	HCM No mutation (n=205)	HCM Mutation (n=40)	LVH- Hypertensives (n=120)	Controls (n=250)
<i>miR-133a-1</i> *				
+85 A/C				
AA	3 (2%)	0	0	0
AC	20 (10%)	2 (5%)	4 (3%)	13 (5%)
CC	182 (88%)	38 (95%)	116 (97%)	237 (95%)
A	0.06	0.03	0.02	0.03
C	0.94	0.97	0.98	0.97
<i>miR-133a-2</i>				
-191G/A -171G/A -88G/A (rs45547937/rs13040566/rs13040413)				
AA/AA/AA	8 (4%)	2 (5%)	7 (6%)	10 (4%)
AG/AG/AG	55 (32%)	12 (30%)	41 (34%)	82 (33%)
GG/GG/GG	131 (64%)	26 (65%)	72 (60%)	158 (63%)
AAA	0.18	0.20	0.23	0.18
GGG	0.82	0.80	0.77	0.82
<i>miR-133b</i> **				
-90 ins/delA				
ins/ins	187 (91%)	37 (92%)	99 (83%)	230 (92%)
ins/del	18 (9%)	3 (8%)	18 (15%)	23 (8%)
del/del	0	0	3 (2%)	1
insA	0.96	0.96	0.90	0.95
delA	0.04	0.04	0.10	0.05
<i>miR-208 a</i>				
-175 C/A (rs28730766)				
CC	203 (99%)	40	120	250
CA	2 (1%)	0	0	0
AA	0	0	0	0
<i>miR-208 b</i>				
+95 C/T (rs45489294)				
CC	200 (98%)	38 (95%)	116 (97%)	244 (98%)
CT	5 (2%)	2 (5%)	4 (3%)	6 (2%)
TT	0	0	0	0
C	0.99	0.97	0.98	0.90
T	0.01	0.03	0.02	0.10

HCM, hypertrophic cardiomyopathy; LV, left ventricular; LVH, left ventricular hypertrophy. *P=0.02, OR=2.30 (1.13-4.67), AA+AC vs. CC, HCM no mutation vs. controls, P=0.006, OR=2.53 (1.28-5.01) A vs. C, HCM no mutation vs. controls; **P=0.03, OR=1.99 (1.06-3.76, del/del + ins/del vs. ins/ins, LVH vs. controls, P=0.01, OR=2.11 (1.18-3.78) ins vs. del, LVH vs. controls.

turally relevant changes in pri-miRNAs would not affect processing.¹⁸

These nucleotide changes could modify the binding of transcription factors (TFs) and enhancers, regulating miRNA gene expression. Mice lacking the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) exhibited a down-regulation of the miR-1-1/miR-133a-2 and miR-1-2/miR-133a-1 transcripts, and a MEF2 enhancer sequence located between miR-1-1 and 133a-2 has been identified.¹ The mutation of this MEF2 enhancer abolished miR-1-1/133a-2 expression on cardiac and skeletal muscle cells of transgenic mice. A MEF2-like site was also identified in the region between miR-1-1 and miR-133a-2, suggesting that the two miR-1/miR-133a clusters contain similar regulatory elements.¹⁹ We searched for putative TFs binding sites in the polymorphic sites found in our study. According to the TFSEARCH database (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.htm>), the 133a-1 SNP would not create/destroy binding sites for known TFs. However, the -90 ins/del A in 133b affected a binding site for TFs of the GATA family, that have been implicated in cardiogenesis and cardiac hypertrophy.^{20,21} The -90 del A should destroy a binding site for these TFs, and could thus reduce the expression of miR-133b, that in turn could have a pro-hypertrophic effect. Functional studies are necessary to confirm this putative effect of the 133b ins/del on gene expression.

The absence of a significant effect of these miRNA variants on HCM with sarcomeric mutations likely reflects the fact that in these patients the disease was caused by these mutations. However, we cannot exclude an effect of these polymorphisms as modifiers of disease severity and adverse events among HCM patients with sarcomeric mutations. The higher frequency of the 133b polymorphism among the LVH hypertensives could be explained by a role of this miRNA in the regulation of physiological pathways that lead to the development of LVH in response to hypertension.²² Alternatively, this polymorphism could be related with the risk of developing hypertension itself. A comparison between -90 delA frequencies in large cohorts of hypertensives vs. normotensives should be necessary to clarify this.

We are well aware that our work has several limitations. First, SSCA is an indirect technique for detecting nucleotide changes in PCR-fragments. Although the rate for false negatives is very low (<5%) we can not exclude that some nucleotide variants in the myoMIRs were not identified in our study. Second, the association of the genotypes with the risk of cardiac hypertrophy was based on a

limited number of patients and from a single population. The replication of our study with larger series of patients/controls and from different populations is necessary to confirm / refute our results. In addition, functional studies should be necessary to determine the effect of the nucleotide variants on miRNAs maturation and expression.

Conclusions

We reported nucleotide variants in the sequences of miR-1, 133, and 208 genes. A miR-133a-1 SNP could be a risk factor for HCM, while a miR-133b polymorphism was associated with cardiac hypertrophy secondary to hypertension. To our knowledge, this is the first report that described the association between microRNA gene variants and cardiac hypertrophy.

References

1. Valencia-Sánchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20:515-24.
2. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 2004;23:4051-60.
3. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.
4. Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3300-5.
5. Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet* 2007;16:1124-31.
6. Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002;11:2499-506.
7. Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, Bristow J. Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6745-50.
8. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18255-60.
9. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al.

Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316:575-9.

10. Liu N, Williams AH, Kim Y, et al. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20844-9.
11. Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 2007;13:613-8.
12. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, et al. Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNT3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:48-56.
13. Coto E, Palacín M, Martín M, et al. Functional polymorphisms in genes of the Angiotensin and Serotonin systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: AT1R as a potential modifier. *J Trans Med* 2010;8:e64.
14. de Mena L, Coto E, Cardo LF, et al. Analysis of the Micro-RNA-133 and PITX3 genes in Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B:1234-9.
15. Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008;118:2600-8.
16. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, et al. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:7269-74.
17. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis* 2008;29:1963-6.
18. Diederichs S, Haber DA. Sequence variations of MicroRNAs in human cancer: alterations in predicted Secondary Structure do not Affect processing. *Cancer Res* 2006;66:6097-104.
19. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005;436:214-20.
20. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2003;92:1079-88.
21. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res* 2004;63:196-207.
22. Arnett DK, de las Fuentes L, Broeckel U. Genes for left ventricular hypertrophy. *Curr Hypertens Rep* 2004;6:36-41.



RESEARCH

Open Access

Functional polymorphisms in genes of the *Angiotensin* and *Serotonin* systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: *AT1R* as a potential modifier

Eliecer Coto*^{1,5}, María Palacín¹, María Martín², Mónica G Castro¹, Julián R Reguero², Cristina García¹, José R Berrazueta³, César Moris², Blanca Morales¹, Francisco Ortega⁴, Ana I Corao¹, Marta Díaz¹, Beatriz Tavira¹ and Victoria Alvarez¹

Abstract

Background: Angiotensin and serotonin have been identified as inducers of cardiac hypertrophy. DNA polymorphisms at the genes encoding components of the angiotensin and serotonin systems have been associated with the risk of developing cardiovascular diseases, including left ventricular hypertrophy (LVH).

Methods: We genotyped five polymorphisms of the *AGT*, *ACE*, *AT1R*, *5-HT2A*, and *5-HTT* genes in 245 patients with Hypertrophic Cardiomyopathy (HCM; 205 without an identified sarcomeric gene mutation), in 145 patients with LVH secondary to hypertension, and 300 healthy controls.

Results: We found a significantly higher frequency of *AT1R* 1166 C carriers (CC+AC) among the HCM patients without sarcomeric mutations compared to controls ($p = 0.015$; OR = 1.56; 95%CI = 1.09-2.23). The *AT1R* 1166 C was also more frequent among patients who had at least one affected relative, compared to sporadic cases. This allele was also associated with higher left ventricular wall thickness in both, HCM patients with and without sarcomeric mutations.

Conclusions: The 1166 C *AT1R* allele could be a risk factor for cardiac hypertrophy in patients without sarcomeric mutations. Other variants at the *AGT*, *ACE*, *5-HT2A* and *5-HTT* did not contribute to the risk of cardiac hypertrophy.

Introduction

Left-ventricular hypertrophy (LVH) is a physiological adaptation of the heart to increased workload. LVH is frequently secondary to clinical conditions such as hypertension, valvular disease, and myocardial infarction [1,2]. However, some patients develop the cardiac hypertrophy in the absence of these conditions that impose overwork to the heart. This primary/essential form of LVH is frequently familial and caused by mutations in sarcomeric genes, and is designated as hypertrophic cardiomyopathy (HCM) [3]. Some patients with HCM lack a family history of the disease, and are thus regarded as sporadic cases. Several gene polymorphisms have been associated

with the risk of developing LVH, and could also modify the clinical phenotype in HCM patients [4-6]. Neurohumoral factors such as angiotensin II (Ang) and serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) have been identified as inducers of cardiac hypertrophy [7,8]. These molecules bind to G protein-coupled receptors on cardiac fibroblasts, and stimulate the production and release of growth factors and cytokines that would induce cardiomyocyte hypertrophy [9,10]. The interactions between the angiotensin and serotonin systems in cardiac cells could play a major role in the development of cardiac hypertrophy [8].

Serotonin is a molecule produced by several cell types, such as serotonergic neurons and renal proximal tubular cells. A large amount of serotonin is stored in blood platelets, bounded to the serotonin transporter (5-HTT). This serotonin is released during platelet activation and binds

* Correspondence: eliecer.coto@sespa.princast.es

¹ Genética Molecular, Red de Investigación Renal (REDINREN), and Fundación Renal; Hospital Universitario Central de Asturias; Oviedo; Spain
Full list of author information is available at the end of the article

to specific receptors on target cells stimulating a wide array of physiological changes, such as platelet aggregation, vascular contraction, and hyperplasia of the smooth muscle cells [11,12]. In the heart, serotonin stimulates sympathetic afferent nerves and causes contraction of the coronaries during ischemia. Studies with mice genetically modified for 5-HT receptors implicated the serotonin pathway in ventricular hypertrophy [13,14]. This prohypertrophic effect would require the uptake of serotonin into cardiomyocytes, and could be partly mediated by a mitochondrial dysfunction [14]. Polymorphisms in the 5-HT_{2A} receptor gene have been linked to receptor function [15]. A 5-HTT gene polymorphism located in the promoter region has been associated with gene expression and an increased uptake of 5-HT in platelets [16]. Due to the central role of serotonin in brain function these gene variants have been extensively studied in neurological and psychiatric traits, but little is known about their role in cardiac hypertrophy [17].

Angiotensin II is formed from angiotensin I by the action of the angiotensin-II converting enzyme (ACE). Ang is a potent vasoconstrictor, but also modulates cardiac hypertrophy [18]. The pharmacological blockade of ACE reduced the hypertrophy secondary to myocardial infarction and hypertension [19]. Polymorphisms in the genes encoding angiotensinogen (*AGT*), angiotensin-II converting enzyme (*ACE*), and angiotensin II type 1 receptor (*AT1R*) have been extensively studied in cardiovascular diseases, including LVH [4,20,21]. The *ACE* insertion/deletion (I/D) variant was related with the extent of HCM in patients with sarcomeric mutations [22,23]. A common single nucleotide polymorphism (SNP) in the 3' untranslated region (UTR) of *AT1R* (1166 A/C) was associated with hypertension and coronary artery stenosis and vasoconstriction [24-26]. This SNP could also modulate the phenotype in patients with HCM [27].

Considering the role of the serotonin and angiotensin systems in cardiac hypertrophy, we hypothesized that DNA variants in the 5-HT_{2A}, 5-HTT, *AGT*, *ACE*, and *AT1R* genes could influence the risk for LVH. To investigate this association, we genotyped patients with LVH and healthy controls for DNA polymorphisms at these genes. We also determined the effect of these gene polymorphisms on onset age and the extent of the hypertrophy.

Methods

Patients and controls

This study was part of a research project designated to analyse the association of DNA-variants to HCM-risk. In the period 1999-2009, a total of 245 non-related patients were recruited through the Cardiology Departments of Hospital Universitario Central Asturias (HUCA) and

Hospital Universitario Valdecilla-Santander. The existence of cardiac hypertrophy was suspected on the basis of clinical manifestations (exertional dyspnea, palpitations, angina, or syncope). In all the patients, we used two-dimensional echocardiography to determine the interventricular septal thickness (IVS) by measuring in diastole at the level of the left ventricle minor axis [28]. The posterior wall thickness (PWT) was also measured, and the left ventricular wall thickness (LVWT) calculated as the sum of IVS and PWT.

Table 1 summarizes the main characteristics of patients. All them fulfilled the next inclusion criteria: they had an interventricular septum (IVS) > 13 mm, and the hypertrophy was not secondary to other cardiac diseases capable of producing LVH (such as hypertension, valvular disease, and myocardial infarction). Patients with relatives who had also been diagnosed with HCM and/or sudden cardiac death (SCD) were classified as familial cases. In apparently sporadic cases, we performed electro and echocardiographic examination to their parents when they were available for the study.

A second group of patients was composed by 145 non-related hypertensives with LVH (59% male; mean age at diagnosis, 58 ± 17 years; mean IVS = 15 ± 5 mm). The controls were a total of 300 healthy individuals aged 20 to 75 years (mean age 51 ± 17; 54% male), recruited through the Blood Bank and the Cardiology Department of HUCA. They did not have symptoms of cardiovascular diseases, but none was echocardiographically evaluated to exclude the presence of asymptomatic LVH. A total of 150 of these controls were examined through electrocardiography to exclude the existence of cardiac diseases. All the patients and controls were Caucasians from the Northern Spain regions of Asturias and Cantabria, and gave their informed consent to participate in the study, approved by the Ethical Committee of Hospital Central Asturias.

Sarcomeric gene mutations

Because HCM is commonly linked to mutations in cardiac sarcomeric genes, we determined the presence of mutations in the most frequently mutated genes in the 245 HCM-patients. The beta-myosin heavy chain (*MYH7*), cardiac troponin T (*TNNT2*), alpha-tropomyosin (*TPM1*), cardiac troponin I (*TNNI3*), and myosin binding protein C3 (*MYBPC3*) genes were sequenced as reported [29,30].

Genotyping of the serotonin and angiotensin system polymorphisms

Two types of polymorphisms were analysed: insertion/deletion (*ACE* and 5-HTT), and SNPs (*AGT*, *AT1R*, and 5-HT_{2A}). The genomic DNA of patients and controls was polymerase chain reaction (PCR) amplified (32 cycles)

Table 1: Main characteristics of the patients with HCM and hypertensive LVH

	Total HCM (n = 245)	Familial HCM (n = 105; 43%)	Sporadic HCM* (n = 140; 57%)	Hypertensive LVH (n = 145)
Mean age at Diagnosis (years)	46 ± 13	37 ± 18	43 ± 19	58 ± 17
Range	8-76	8-72	21-76	35-75
Male	144 (59%)	68 (65%)	76 (56%)	(59%)
Mean BMI				
Male	27 ± 3	26 ± 3	27 ± 4	28 ± 4
Female	26 ± 4	25 ± 3	26 ± 3	28 ± 5
Mean IVS#	20 ± 5	22 ± 6	18 ± 7	15 ± 5
Mean PWT#	13 ± 5	14 ± 5	11 ± 6	10 ± 6
Mean LVWT#	34 ± 6	36 ± 6	30 ± 6	26 ± 6
Dyspnea	168 (69%)	78 (74%)	90 (64%)	30%
NYHA index#				
Class I-II	120 (49%)	49 (47%)	71 (51%)	85%
Class III-IV	48 (20%)	29 (28%)	19 (14%)	15%
Angina	96 (39%)	53 (50%)	43 (31%)	16%
Syncope	48 (20%)	25 (24%)	23 (16%)	6%
Atrial fibrillation	47 (19%)	23 (22%)	24 (17%)	15%
Arrhythmia (Holter monitoring)	55 (22%)	21 (20%)	34 (24%)	18%
LVOT > 30 mm Hg#	72 (29%)	34 (32%)	38 (27%)	30%
Sarcomeric mutations	40 (16%)	30 (29%)	10 (7%)	ND
<i>MYH7</i>	12 (5%)	11 (10%)	1 (< 1%)	
<i>MYBPC3</i>	23 (9%)	16 (15%)	7 (5%)	
<i>TNNT2</i>	4 (2%)	2 (2%)	2 (1%)	
<i>TPM1</i>	1 (< 1%)	1 (1%)	0	

* In 45 patients none of the parents were studied to exclude the presence of asymptomatic LVH.

IVS: interventricular septum; PWT: posterior wall thickness; LVWT: left ventricular wall thickness; NYHA: New York Heart Association functional class; LVOT: left ventricular outflow tract gradient.

The presence of sarcomeric mutations was not determined (ND) in the hypertensive-LVH patients.

with specific primers, and the reactions were directly electrophoresed on 3% agarose gels (insertion/deletion alleles) or after digestion with a restriction enzyme (SNPs), as reported [31-33]. Alleles in the coding region were numbered following the standard nomenclature [34]. The reference numbers for the five polymorphisms were: rs699 (*AGT*, c.803 T/C); rs6313 (*5-HT2A*, c.102 T/C); rs5186 (*AT1R*, c.1166 A/C); rs4646994 (*ACE*, intron 16 I/D); rs4795541 (*5-HTT*, promoter I/s) (see the *Ensembl* database for the definition of these gene variants; <http://www.ensembl.org>). In the additional table 1 we summarized the primer sequences and genotyping conditions for the five polymorphisms.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov was used to determine whether the continuous variables followed a normal distribution. The mean values for variables that were normally distributed were compared between the different groups through the ANOVA. Allele and genotype frequencies between patients and controls were compared through a χ^2 test. Odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (CIs) were also calculated. The SPSS package (v. 11.0) was used for all the statistical analysis. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. Power calculation at $p = 0.05$ and $p = 0.01$ was performed for all the significant genetic associations with an online program <http://statpages.org/proppowr.html>.

Results

Table 1 summarizes the main characteristics of the patients. A total of 75 of the HCM patients had at least one relative who was also affected by HCM or had suffered SCD. The remaining 170 patients did not have a family history of the disease, but the existence of asymptomatic relatives with HCM could not be excluded. In 90 of these patients we performed electro and echocardiographic examination to both parents, and to only one parent in 35 cases. HCM was also found in the father or the mother of 30 of these 125 HCM-patients, that could thus be regarded as familial cases. In 45 patients, none of the parents were available for study.

A total of 40 of the 245 HCM-patients had a mutation in the *MYH7*, *MYBPC3*, *TPM1*, *TNNI3*, or *TNNT2* genes (Additional table 2). Sarcomeric mutations were more frequent in patients with familial HCM compared to apparently sporadic cases (30% vs. 7%). The genotyping of the *5-HT2A*, *5-HTT*, *AGT*, *ACE*, and *AT1R* polymorphisms showed a significantly higher frequency of carriers of the *AT1R* C allele (AC+CC genotypes) in the HCM patients without sarcomeric gene mutations compared to the healthy controls ($p = 0.015$; OR = 1.56; 95% CI = 1.09-2.23) (Table 2). The difference was no significant when the Bonferroni's correction was applied $p < 0.01$. The

sample size (205 patients and 300 controls) was enough to reach a power of 75% at a $p = 0.05$ (for a power of 80%, a total of 225 patients and 338 controls should be required at a $p = 0.05$, and 336 patients and 504 controls at a $p = 0.01$). The frequency of *AT1R* C-carriers did not differ between hypertensives with LVH and controls (50% vs. 47%).

We examined the difference for the main characteristics between the *5-HT2A*, *5-HTT*, *AGT*, *ACE*, and *AT1R* genotypes in the 205 patients without sarcomeric mutations. We found a higher frequency of familial cases among *AT1R* C-carriers ($p = 0.02$), and this could reflect a predisposition to develop familial cardiac hypertrophy linked to these genes. We also found a higher mean IVS and LVWT among patients who were *AT1R* CC/AC compared to AA in both HCM groups, with and without sarcomeric mutations (Table 3). The *AT1R* genotype did not modify the mean IVS and LVWT among the hypertensive patients.

Several DNA polymorphisms in the angiotensin system genes have been proposed as modifiers of the phenotype in families with sarcomeric mutations. In our study, patients with a sarcomere mutation ($n = 40$) who were *AT1R* CC/AC had higher mean IVS and LVWT, and lower mean onset age compared to *AT1R* AA. In addition, *AT1R* C-carriers had a higher frequency of familial cases (table 3). However, these differences did not reach statistical significance, probably because they were based on only 40 index patients with a sarcomeric mutation. Because *MYH7* mutations have been associated with more severe forms of HCM compared to *MYBPC3*, we also compared the effect of the *AT1R* SNP according to the mutated gene. We studied 19 mutation carriers from the 12 families with a *MYH7*-mutation, and 64 mutation carriers from the 23 families with a *MYBPC3*-mutation (Additional table 2). We found a total of 48 *AT1R* C carriers, 9 in the *MYH7* and 39 in the *MYBPC3* groups, and the mean LVWT was higher among these *AT1R* C carriers compared to *AT1R* AA in the two groups, although the difference did not reach statistical significance ($p = 0.053$).

Discussion

In this study we genotyped 245 HCM-patients and 300 healthy controls for 5 polymorphisms in five candidate genes of the angiotensin and serotonin systems. We identified an HCM-causative mutation in one of the five most commonly mutated sarcomeric genes (*MYH7*, *MYBPC3*, *TPM1*, *TNNI3*, or *TNNT2*) in 40 cases, but we cannot exclude that other patients harbour mutations in any of the other genes that have been linked to HCM. However, we think this would affect a reduced number of cases because the five sarcomeric genes represent > 90% of the mutations found in HCM-patients (see the cardiogenom-

Table 2: Genotype and allele frequencies for the five polymorphisms in patients and healthy controls

Polymorphism	HCM* N=205	Hypertensive LVH N = 145	Controls N = 300
<i>5-HT2A</i> (c.102 T/C) Rs6313			
TT	45 (22%)	24 (17%)	60 (20%)
TC	105 (51%)	79 (54%)	149 (50%)
CC	55 (27%)	42 (29%)	91 (30%)
T	0.47	0.43	0.45
C	0.53	0.57	0.55
<i>5-HTT</i> (I/s) Rs4795541			
II	72 (35%)	48 (33%)	91 (30%)
Is	102 (50%)	71 (49%)	147 (49%)
ss	31 (15%)	26 (18%)	62 (21%)
I	0.60	0.58	0.55
s	0.40	0.42	0.45
<i>ACE</i> (I/D) Rs4646994			
DD	72 (35%)	54 (37%)	119 (40%)
ID	100 (48%)	68 (45%)	135 (45%)
II	35 (17%)	23 (15%)	46 (15%)
D	0.59	0.61	0.62
I	0.41	0.39	0.38

Table 2: Genotype and allele frequencies for the five polymorphisms in patients and healthy controls (Continued)

AGT (c.803 T/C) Rs699			
MM	64 (31%)	54 (37%)	95 (32%)
MT	100 (49%)	68 (48%)	145 (48%)
TT	41 (19%)	22 (15%)	60 (20%)
M	0.55	0.61	0.56
T	0.45	0.39	0.44
AT1R (c.1166 A/C)# Rs5182			
AA	84 (41%)	72 (50%)	156 (53%)
AC	94 (46%)	60 (41%)	114 (37%)
CC	27 (13%)	13 (9%)	30 (10%)
A	0.64	0.70	0.71
C	0.36	0.30	0.29

*Patients without sarcomeric mutations.

HCM vs. controls: $p = 0.015$; OR = 1.56 (95%CI = 1.09-2.23); AC + CC HCM patients vs. controls.

ics database; <http://www.cardiogenomics.org>). The frequency of patients with a sarcomeric mutation (16.3%) was lower than the frequency previously reported in our population (27%). This could be partly attributed to a lower frequency of cases with affected relatives and a mean higher onset age for the patients in this study, compared to previous reports [29,30].

We found a significantly higher frequency of *AT1R* C-carriers among patients negative for sarcomeric mutations, compared to healthy controls. This could represent a predisposition to develop HCM among individuals with this *AT1R* allele, although the OR was relatively low (1.56) in this group of patients and 41% of the 205 patients without a myofilament mutation were non-carriers of this allele. The *AT1R* 1166 C has been associated with the risk for several cardiovascular traits, including hypertension, coronary artery vasoconstriction, and coronary artery disease. Some authors did not find a significant association between this allele and the risk for HCM [35]. How-

ever, in these studies the patients were not selected by the presence/absence of sarcomeric gene mutations, and this could result in a non-significant association if patients with a causative HCM mutation were included in the study. In fact, the *AT1R* frequencies did not differ between our patients with sarcomeric mutations and controls. Moreover, if we compared the *AT1R* genotype frequencies between all the HCM patients ($n = 245$) and the controls ($n = 300$), no significant difference was found for 1166 C carriers ($p = 0.06$). A total of 30 patients without sarcomeric mutations had a positive family history of HCM. It is possible that the frequency of *AT1R* C carriers was also significantly higher among these affected relatives. However, this information was not available because these individuals were not genotyped for the *AT1R* polymorphism.

The *AT1R* SNP has also been proposed as a modifier of the clinical phenotype in HCM [4-6]. In their analysis of 389 HCM-patients (45% with a family history of HCM

Table 3: Mean (\pm Standard deviation) interventricular septum, posterior wall thickness, left ventricular wall thickness, age at the diagnosis and body mass index values, and frequency of cases with affected relatives, according to the *AT1R* genotype in the 205 HCM-patients without sarcomeric mutations, the 40 patients with a sarcomeric mutation, and the 145 patients with hypertensive LVH

	IVS (mm)	PWT (mm)	LVWT (mm)	Age (years)	BMI	Familial HCM#
HCM-No mutation¹						
CC (n = 27)	21 \pm 4	13 \pm 3	34 \pm 5	49 \pm 18	26 \pm 5	10 (37%)
AC (n = 94)	21 \pm 5	13 \pm 4	33 \pm 4	46 \pm 18	27 \pm 4	40 (43%)
AA (n = 84)	19 \pm 5	13 \pm 4	32 \pm 4	48 \pm 16	27 \pm 5	25 (30%)
HCM-Mutation²						
CC (n = 5)	23 \pm 4	16 \pm 3	39 \pm 4	38 \pm 4	21 \pm 4	4 (80%)
AC (n = 14)	22 \pm 5	14 \pm 5	35 \pm 5	36 \pm 5	21 \pm 5	12 (86%)
AA (n = 21)	18 \pm 5	14 \pm 4	31 \pm 5	45 \pm 5	20 \pm 5	14 (67%)
Hypertensive -LVH						
CC (n = 13)	16 \pm 4	10 \pm 5	25 \pm 5	60 \pm 8	28 \pm 2	ND
AC (n = 60)	16 \pm 3	9 \pm 4	25 \pm 4	58 \pm 7	27 \pm 2	ND
AA (n = 72)	15 \pm 2	10 \pm 5	24 \pm 4	59 \pm 9	28 \pm 3	ND

We did not determine (ND) the existence of a family history of LVH in the hypertensive-LVH group.

¹ P = 0.016, IVS CC + AC vs. AA.

² P = 0.017, IVS CC + AC vs. AA.

and/or SCD), Perkins et al. reported a lower mean age at diagnosis among *AT1R* CC compared to *AT1R* AA (37.9 vs. 43.2 years, respectively). We did not find significantly different mean onset ages between the *AT1R* genotypes, although patients with a sarcomeric mutation and *AT1R* C-carriers had a lower mean onset age. This suggested that the *AT1R* genotype could be a modifier of the onset age among patients with a causative sarcomeric mutation. Perkins et al. also reported higher mean left ventricular wall thickness and a higher frequency of severe hypertrophy (> 30 mm) among *AT1R* CC patients. This association with the extent of LVH was also reported by others [27]. We also found a higher mean LVWT among *AT1R* C-carriers in both, patients with and without sarcomeric mutation. Moreover, this allele was associated with higher LVWT in patients with *MYH7* and *MYBPC3* mutations. This suggested that the *AT1R* genotype could be a modifier of the extent of the hypertrophy in our population, in patients with and without sarcomeric mutations. The role of the *AT1R* SNP as a modifier of the phenotype was also supported by the finding of a higher frequency of familial HCM among patients with sarcomeric mutations and 1166 C-carriers. This could be the consequence of a more severe phenotype among *AT1R* C-

carriers, resulting in a higher penetrance of the sarcomeric mutation among carriers of this *AT1R* allele. However, our definition of familial HCM was incomplete because in 19% of our patients who did not have a family history of the disease we could not exclude the presence of asymptomatic LVH in their parents. It is thus possible that the frequency of familial cases was higher than estimated in our patients, and this could affect the results.

The *AT1R* 1166A/C (SNP rs5186) is in the 3' UTR region, in a sequence that binds microRNA (miRNA) -155. MiRNAs are small (approximately 22 nucleotides long) non-coding RNAs that bind to sequences in the 3' UTRs of mRNAs by complementary base-pairing, and repress mRNA post-transcriptionally. The + 1166 C-allele determines the interruption of the base-pairing complementarity with miR-155, and this resulted in the increased translation of *AT1R* compared to the mRNA containing 1166 A [36]. Both, *AT1R* and miR-155, are abundantly expressed in the same cell types (e.g. VSMCs and endothelial). The regulation of *AT1R* by miR-155 and the differential binding of this miRNA to mRNAs with 1166 A or C provided a mechanism by which this SNP could lead to a heterogeneous *AT1R* expression and cardiovascular risk. Although a direct effect of this SNP on

AT1R expression could explain its association to cardiac hypertrophy and other cardiovascular disorders, we cannot exclude that this association was a consequence to its linkage disequilibrium with other *AT1R* variants. For this gene two main haplotype blocks have been identified, one defined by markers in the promoter region and the other by SNPs rs5182 and rs5186 in the 3' region [37,38]. A resequencing of the *AT1R* in patients carrying the C-allele should be necessary to identify other variants that could be linked to the risk for cardiac hypertrophy. In addition, the pharmacological blockade of angiotensin II receptors has been shown to reduce LVH, and could be useful to treat this disease [39]. A significant association between the *AT1R* 1166 A/C SNP and LVH change during antihypertensive treatment with *AT1R* antagonists has been reported [40]. In this context, it should be interesting to evaluate the effect of the *AT1R* genotypes on the response to *AT1R* antagonists in patients with HCM.

Finally, our study has some limitations that could affect the results. The association between the *AT1R* SNP and HCM was significant ($p = 0.015$), but the OR for allele C-carriers was 1.56 and the lower limit of CI (1.09) was close to 1. Although the association was plausible considering the statistical power, it should be replicated in larger cohorts and from different populations. As discussed above, the five sarcomeric genes analysed in our patients would represent > 90% of the mutated genes in HCM patients. However, mutations in more than 12 genes have been found in HCM cases and some of the 205 patients could be included as carriers of a myofibrillar mutation if all these genes were studied. Third, we found a significant association between the *AT1R* and familial HCM in patients without sarcomeric gene mutations, but our classification of familial/sporadic cases was incomplete because we did not perform ECG or echocardiographic examination to all the first degree relatives of our patients. It is thus possible that some patients had relatives with asymptomatic LVH, and could thus be classified as familial cases.

Conclusions

The *AT1R* 1166 A/C polymorphism was associated with HCM in patients without sarcomeric gene mutations. In addition, the frequency of familial hypertrophy was higher among carriers of this allele, and we also found a trend toward higher left ventricular thickness among these 1166 C-carriers. Our work suggested that the *AT1R* gene variation could contribute to the risk of developing cardiac hypertrophy, being also a modifier of the phenotype.

Conflict of interests Disclosure

The authors declare that they have no competing interests.

Additional material

Additional file 1 Additional table 1. Primers used to amplify the five polymorphic sites, annealing temperature, restriction enzymes to digest the PCR-products, and size of the alleles. Primers were derived from the reference sequences for the five genes in the Ensembl database <http://www.ensembl.org>: *ACE*, ENSG00000159640; *5-HTT*, ENSG00000108576; *AGT*, ENST00000366667; *5-HT2A*, ENST00000378688; *AT1R*, ENST00000349243.

Additional file 2 Additional table 2. Summary of the 40 HCM cases with sarcomeric gene mutations. In each family, we indicated the mutation, the number of mutation carriers in the family who were *AT1R* CC/AC or AA, and the mean onset age and mean LVWT according to the *AT1R* genotype.

Authors' contributions

EC designated the study, performed the statistical analysis, and wrote the manuscript. JRR, MM, JRB, FO and CM, recruited the patients/controls and obtained the clinical and anthropometric data. EC, MP, CG, MGC, BT, AIC, MD, BM, and VA performed all the genetic studies. All the authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER European Union (FIS-06/0214), and Red de Investigación Renal-REDINREN (RD06/0016). M.P is a predoctoral fellow from FICYT-Principado de Asturias.

Author Details

¹Genética Molecular, Red de Investigación Renal (REDINREN), and Fundación Renal; Hospital Universitario Central de Asturias; Oviedo; Spain, ²Servicio de Cardiología, Fundación ASTURCOR; Hospital Universitario Central de Asturias; Oviedo; Spain, ³Servicio de Cardiología, Hospital Universitario M. Valdecilla; Santander; Spain, ⁴Servicio de Nefrología, Red de Investigación Renal (REDINREN), and Fundación Renal; Hospital Universitario Central de Asturias; Oviedo; Spain and ⁵Departamento de Medicina, Universidad Oviedo; Oviedo; Spain

Received: 10 February 2010 Accepted: 1 July 2010

Published: 1 July 2010

References

1. Sadoshima J, Izumo S: **The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.** *Annu Rev Physiol* 1997, **59**:551-571.
2. Lorell BH, Carabello BA: **Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis.** *Circulation* 2000, **102**:470-479.
3. Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ: **Diagnostic prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **54**:201-211.
4. Bleumink GS, Schut AF, Sturkenboom MC, Deckers JW, van Duijn CM, Stricker BH: **Genetic polymorphisms and heart failure.** *Genet Med* 2004, **6**:465-474.
5. Keren A, Syrris P, McKenna WJ: **Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008, **5**:158-168.
6. Perkins MJ, Van Driest SL, Ellsworth EG, Will ML, Gersh BJ, Ommen SR, Ackerman MJ: **Gene-specific modifying effects of pro-LVH polymorphisms involving the renin-angiotensin-aldosterone system among 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *Eur Heart J* 2005, **26**:2457-2462.
7. Heineke J, Molkentin JD: **Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, **7**:589-600.
8. Jaffré F, Bonnin P, Callebert J, Debbabi H, Setola V, Doly S, Monassier L, Mettauer B, Blaxall BC, Launay JM, Maroteaux L: **Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy.** *Circ Res* 2009, **104**:113-123.
9. Jaffré F, Callebert J, Sarre A, Etienne N, Nebigil CG, Launay JM, Maroteaux L, Monassier L: **Involvement of the serotonin 5-HT2B receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor-alpha cytokine production by ventricular fibroblasts.** *Circulation* 2004, **110**:969-974.

10. Sano M, Fukuda K, Kodama H, Pan J, Saito M, Matsuzaki J, Takahashi T, Makino S, Kato T, Ogawa S: **Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes.** *J Biol Chem* 2000, **275**:29717-29723.
11. Cerrito F, Lazzaro MP, Gaudio E, Arminio P, Aloisi G: **5HT₂-receptors and serotonin release their role in human platelet aggregation.** *Life Sci* 1993, **53**:209-215.
12. Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S: **Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin.** *Circ Res* 1999, **84**:329-336.
13. Dorn GW, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, Liggett SB: **Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:6400-6405.
14. Nebigil CG, Maroteaux L: **Functional consequence of serotonin/5-HT_{2B} receptor signaling in heart: role of mitochondria in transition between hypertrophy and heart failure?** *Circulation* 2003, **108**:902-908.
15. Arranz M, Collier D, Sodhi M, Ball D, Roberts G, Price J, Sham P, Kerwin R: **Association between clozapine response and allelic variation in 5-HT_{2A} receptor gene.** *Lancet* 1995, **346**:281-282.
16. Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang S-H, Li Q, Bengel D, Murphy DL: **Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets.** *Am J Med Genet* 1999, **88**:83-87.
17. D'Souza UM, Craig IW: **Functional genetic polymorphisms in serotonin and dopamine gene systems and their significance in behavioural disorders.** *Prog Brain Res* 2008, **172**:73-98.
18. Harrap SB, Dominiczak AF, Fraser R, Lever AF, Morton JJ, Foy CJ, Watt GCM: **Plasma angiotensin II, predisposition to hypertension, and left ventricular size in healthy young adults.** *Circulation* 1996, **93**:1148-1154.
19. Johnson DB, Foster RE, Barilla F, Blackwell GG, Roney M, Stanley AWH Jr, Kirk K, Orr RA, van der Geest RJ, Reiber JHC: **Dell'Italia LJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy affects left ventricular mass in patients with ejection fraction < 40% after acute myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 1997, **29**:49-54.
20. Wang JG, Staessen JA: **Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease.** *Eur J Pharmacol* 2000, **410**:289-302.
21. Hebert PR, Foody JM, Hennekens CH: **The renin-angiotensin system: the role of inhibitors, blockers, and genetic polymorphisms in the treatment and prevention of heart failure.** *Curr Vasc Pharmacol* 2003, **1**:33-39.
22. Lechin M, Quinones MA, Omran A, Hill R, Yu QT, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R, Marian AJ: **Angiotensin I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *Circulation* 1995, **92**:1808-1812.
23. Tesson F, Dufour C, Moolman JC, Carrier L, Al-Mahdawi S, Chojnowska L, Dubourg O, Soubrier F, Brink P, Komajda M, Guicheney P, Schwartz K, Feingold J: **The influence of the angiotensin I converting enzyme genotype in familial hypertrophic cardiomyopathy varies with the disease gene mutation.** *J Mol Cell Cardiol* 1997, **29**:831-838.
24. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F: **Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients.** *Circulation* 1996, **94**:698-703.
25. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Arai K, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K: **Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease.** *Atherosclerosis* 1996, **125**:161-169.
26. Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden EP, Escudero X, Lablanche JM, Amouyel P, Bertrand ME: **The angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction.** *J Am Coll Cardiol* 1997, **29**:486-490.
27. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH: **T1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy.** *Hypertension* 1998, **32**:825-830.
28. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ: **Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology.** *J Am Soc Echocardiogr* 2005, **18**:1440-1463.
29. García-Castro M, Reguero JR, Batalla A, Díaz-Molina B, González P, Alvarez V, Cortina A, Cubero GI, Coto E: **Hypertrophic cardiomyopathy: low frequency of mutations in the beta-myosin heavy chain (MYH7) and cardiac troponin T (TNNT2) genes among Spanish patients.** *Clin Chem* 2003, **49**:1279-1285.
30. García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Alvarez V, Alonso B, Sainz R, Martín M, Moris C: **Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *Rev Esp Cardiol* 2009, **62**:48-56.
31. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E: **Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease.** *Cardiovasc Res* 1998, **40**:375-379.
32. Coto E, Reguero JR, Alvarez V, Morales B, Batalla A, González P, Martín M, García-Castro M, Iglesias-Cubero G, Cortina A: **5-Hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptor and 5-hydroxytryptamine transporter polymorphisms in acute myocardial infarction.** *Clin Sci (Lond)* 2003, **104**:241-245.
33. Coto E, Rodrigo L, Alvarez R, Fuentes D, Rodríguez M, Menéndez LG, Ciriza C, González P, Alvarez V: **Variation at the Angiotensin-converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase genes is associated with the risk of esophageal varices among patients with alcoholic cirrhosis.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2001, **38**:833-839.
34. den Dunnen JT, Antonarakis SE: **Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion.** *Hum Mutat* 2000, **15**:7-12.
35. Brugada R, Kelsey W, Lechin M, Zhao G, Yu QT, Zoghbi W, Quinones M, Elstein E, Omran A, Rakowski H, Wigle D, Liew CC, Sole M, Roberts R, Marian AJ: **Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *J Invest Med* 1997, **45**:542-551.
36. Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, Feldman DS, Schmittgen TD, Elton TS: **The human angiotensin II type 1 receptor + 1166 A/C polymorphism attenuates microrna-155 binding.** *J Biol Chem* 2007, **282**:24262-24269.
37. Su X, Lee L, Li X, Lv J, Hu Y, Zhan S, Cao W, Mei L, Tang YM, Wang D, Krauss RM, Taylor KD, Rotter JI, Yang H: **Association between angiotensinogen, angiotensin II receptor genes, and blood pressure response to an angiotensin-converting enzyme inhibitor.** *Circulation* 2007, **115**:725-732.
38. Abdollahi MR, Lewis RM, Gaunt TR, Cumming DV, Rodriguez S, Rose-Zerilli M, Collins AR, Syddall HE, Howell WM, Cooper C, Godfrey KM, Cameron IT, Day IN: **Quantitated transcript haplotypes (QTH) of AGTR1, reduced abundance of mRNA haplotypes containing 1166C (rs5186:A > C), and relevance to metabolic syndrome traits.** *Hum Mutat* 2007, **28**:365-373.
39. Verdecchia P, Sleight P, Mancia G, Fagard R, Trimarco B, Schmieder RE, Kim JH, Jennings G, Jansky P, Chen JH, Liu L, Gao P, Probstfield J, Teo K, Yusuf S: **ONTARGET/TRANSCEND Investigators. Effects of telmisartan, ramipril, and their combination on left ventricular hypertrophy in individuals at high vascular risk in the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global End Point Trial and the Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects With Cardiovascular Disease.** *Circulation* 2009, **120**:1380-1389.
40. Kurland L, Melhus H, Karlsson J, Kahan T, Malmqvist K, Ohman P, Nyström F, Hägg A, Lind L: **Polymorphisms in the angiotensinogen and angiotensin II type 1 receptor gene are related to change in left ventricular mass during antihypertensive treatment: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) trial.** *J Hypertens* 2002, **20**:657-663.

doi: 10.1186/1479-5876-8-64

Cite this article as: Coto et al., Functional polymorphisms in genes of the Angiotensin and Serotonin systems and risk of hypertrophic cardiomyopathy: AT1R as a potential modifier *Journal of Translational Medicine* 2010, **8**:64