



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

MICRORNAS EXOSÓMICOS CIRCULANTES EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME QT LARGO

Alumno: Sergio Román Navarro

Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales



Trabajo Fin de Grado

MICRORNAS EXOSÓMICOS CIRCULANTES EN UN MODELO MURINO DE SÍNDROME QT LARGO

Alumno: Sergio Román Navarro

Firma:

Julio, 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT	5
3. ABREVIATURAS	6
4. INTRODUCCIÓN	7
4.1. Función y estructura del corazón.....	7
4.2. Electrofisiología cardíaca.....	8
4.3. Arritmias	11
4.4. Modelo murino de síndrome de QT largo	16
4.5. Comunicación intercelular por exosomas	17
5. HIPÓTESIS.....	21
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1. Modelo experimental.....	22
6.2. Obtención de sangre y suero	22
6.3. Extracción de exosomas	22
6.4. Extracción de ARN.....	23
6.5. Retrotranscripción a cDNA	23
6.6. PCR a tiempo real	23
6.7. Análisis de los resultados obtenidos	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
8. CONCLUSIÓN.....	31
9. BIBLIOGRAFÍA	32

1. RESUMEN

El síndrome de QT largo es una enfermedad cardiovascular que afecta a una de cada 2500 personas. Se trata de una arritmia caracterizada por una prolongación del segmento QT del electrocardiograma. El gen KCNQ1 es uno de los muchos genes identificados que producen este síndrome, este concretamente crea proteínas transmembrana defectuosas para el paso de potasio.

En los últimos años se ha visto que la comunicación intercelular puede estar mediada por exosomas. Los exosomas son vesículas de pequeño tamaño, entre 40-100nm, que son liberados por la mayoría de células del cuerpo y representan una nueva forma de comunicación intercelular. En su interior llevan desde proteínas y lípidos hasta ácidos nucleicos como microRNAs. Los microRNAs tienen un tamaño de 19-25 nucleótidos, y al viajar dentro de los exosomas pueden ser activos en su célula huésped, mientras que en su célula de origen permanecían inactivos. Se conoce que variaciones en el contenido de los exosomas están relacionadas con el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares.

En este estudio hemos analizado varios miRs exosomales en una condición arritmogénica del tipo QT largo.

Palabras clave: arritmia, síndrome QT largo, gen KCNQ1, exosomas, microRNAs.

2. ABSTRACT

Long QT syndrome is a cardiovascular disease that's affects one in 2500 people. It's an arrhythmia characterized by an extension of the QT segment of the electrocardiogram. The KCNQ1 gene is one of the many genes identified that produce this syndrome, this specifically creates defective transmembrana proteins for the passage of potassium.

In recent years it has been seen that intercellular communication can be mediated by exosomes. Exosomes are small vesicles, between 40-100 nm, that are released by most cells of the body and represent a new form of intercellular communication. Inside they carry proteins and lipids to nucleic acids such as microRNAs. The microRNAs have a size of 19-25 nucleotides, and when traveling within the exosomes they can be active in their host cell, while in their cell of origin they remained inactive. It is known that variations in the content of exosomes are related to the development of varius cardiovascular diseases.

In this study we have analyzed several exosomes miRs in an arrhythmogenic condition of the long QT type.

Key words: arrhythmia, long QT syndrome, KCNQ1 gene, exosomes, miRNAs.

3. ABREVIATURAS

ECG: electrocardiograma

SQTC: síndrome de QT corto

SQTL: síndrome de QT largo

FA: fibrilación auricular

JLNS: síndrome de Jervell-Lange-Nielsen

RWS: síndrome de Romano-Ward

miRs: microRNAs

qPCR: PCR a tiempo real

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Función y estructura del corazón

El corazón es el órgano que se encarga de bombear la sangre hacia un sistema arterial que la reparte por todo el cuerpo. Se sitúa en el tórax, detrás del esternón y delante de la columna vertebral, a ambos lados están los pulmones y por debajo se encuentra el diafragma. El corazón tiene dos movimientos; sístole o contracción y diástole o relajación¹.

El corazón se constituye de cuatro cavidades, dos en el lado derecho y dos en el lado izquierdo, es por ello que se podría hablar de corazón izquierdo y corazón derecho. Ambos están separados por un tabique.

El corazón derecho se divide en aurícula, en la parte superior, y ventrículo, en la parte inferior. El corazón izquierdo se divide de la misma manera. Además, se encuentra dentro de una bolsa llamada pericardio, la cual se divide en una hoja interna sobre la superficie cardíaca y otra más externa fijada a los vasos que salen del corazón. En mitad de estas hojas existe un líquido para evitar su roce cuando late¹.

La sangre no oxigenada llega de todo el cuerpo a la aurícula derecha a través de las venas cavas, después pasa al ventrículo derecho mediante la válvula tricúspide, movimiento que nunca puede suceder en sentido contrario. Cuando el corazón se contrae, la sangre sale del ventrículo por la válvula pulmonar y pasa a la arteria pulmonar que la lleva a los pulmones para que se oxigene¹.

Cuando la sangre se ha oxigenado, llega a la aurícula izquierda (parte superior del corazón izquierdo) por cuatro venas pulmonares. El paso de la aurícula izquierda al ventrículo izquierdo lo controla la válvula mitral, y la salida de aquí a todo el cuerpo se produce cuando el corazón se contrae y se abre la válvula aórtica (Figura 1). Este es un sistema de circulación cerrado¹.

Corazón Normal

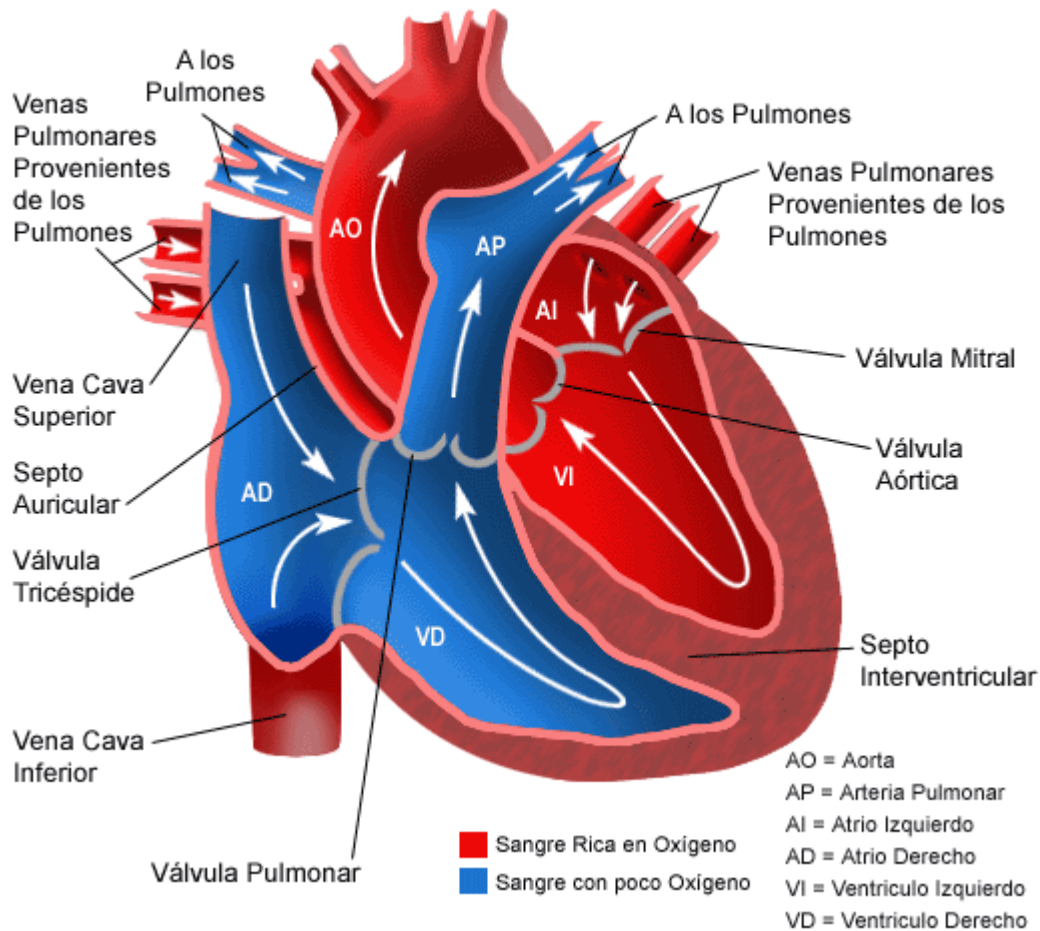


Figura 1: Imagen obtenida de la web www.standforchildrens.org

4.2. Electrofisiología cardíaca

En las células cardíacas el valor del potencial de acción en reposo es de -85 mV y se eleva hasta un valor de $+20$ mV con cada latido. Se distinguen hasta 5 fases en este potencial de acción cardíaco, que van desde la fase 0 hasta la fase 4².

En la fase 0 tiene lugar la despolarización, se abren los canales de Na^+ y entra a la célula gran cantidad de iones positivos. También se produce la apertura de canales lentos de Ca^{2+} . A continuación, tiene lugar la fase 1, en la que se abren los canales de K^+ y se produce la salida de este de la célula, lo que da lugar a una repolarización rápida pero corta, ya que la constante entrada de Ca^{2+} cierra los canales de K^+ .

En la fase 2 o de meseta ocurren varias cosas, se cierran los canales de Na^+ , pero sigue entrando Ca^{2+} lentamente, por lo que el K^+ no puede volver a su nivel de reposo. Es en la fase 3 en la que se cierran los canales de Ca^{2+} y aumenta la permeabilidad de la membrana para la salida de K^+ , y la célula cardíaca vuelve a su voltaje negativo. En la fase 4 y última, la bomba Na-K-ATPasa se encarga de bombear iones Na^+ fuera de la célula, al mismo tiempo que introduce K^+ , manteniendo negativo el potencial de acción² (Figura 2).

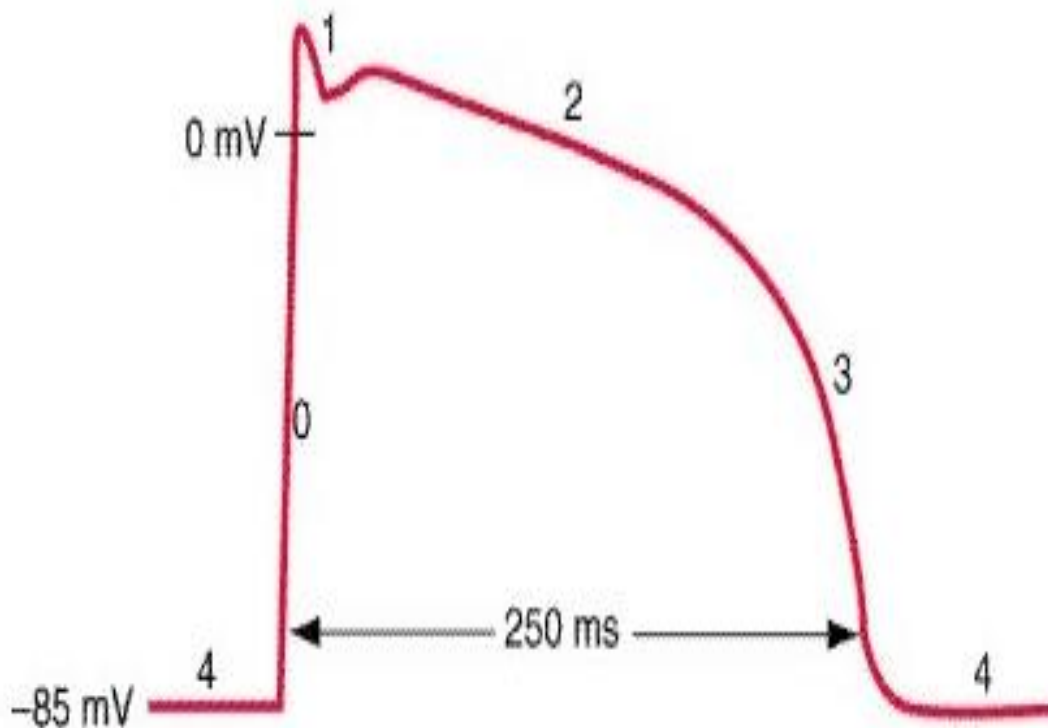


Figura 2: Imagen del potencial de acción de una célula cardíaca. Imagen obtenida de la web www.ffis.es

El sistema de conducción cardíaca se encarga de generar y transmitir el potencial de acción y está formado por los siguientes componentes (Figura 3). El nodo sinusal es la estructura donde se inician los latidos del corazón y marca el ritmo cardíaco, por ello, se le puede llamar “el marcapasos del corazón”. Es una estructura que se encuentra a menos de 1 mm de la superficie del epicardio, y al lado de la unión entre vena cava superior y aurícula derecha³.

El impulso generado se transmite por vías preferenciales hasta el nodo auriculoventricular y a la aurícula izquierda cruzando las fibras del haz de Bachmann, haciendo que las aurículas se contraigan. El nodo auriculoventricular se sitúa en la parte inferior derecha del septointerauricular, dentro del triángulo de Koch. Su función es la de posponer el paso del impulso eléctrico desde la aurícula al ventrículo, este retraso es para asegurar que toda la sangre ha pasado de las aurículas a los ventrículos antes de que estos se contraigan³.

El nodo auriculoventricular recibe las señales del nodo sinusal y las pasa al haz de His, que a su vez se divide en rama derecha y rama izquierda, ambas ramas terminan en la red de Purkinje, que transmite el impulso eléctrico a todo el endocardio del ventrículo izquierdo y derecho³.

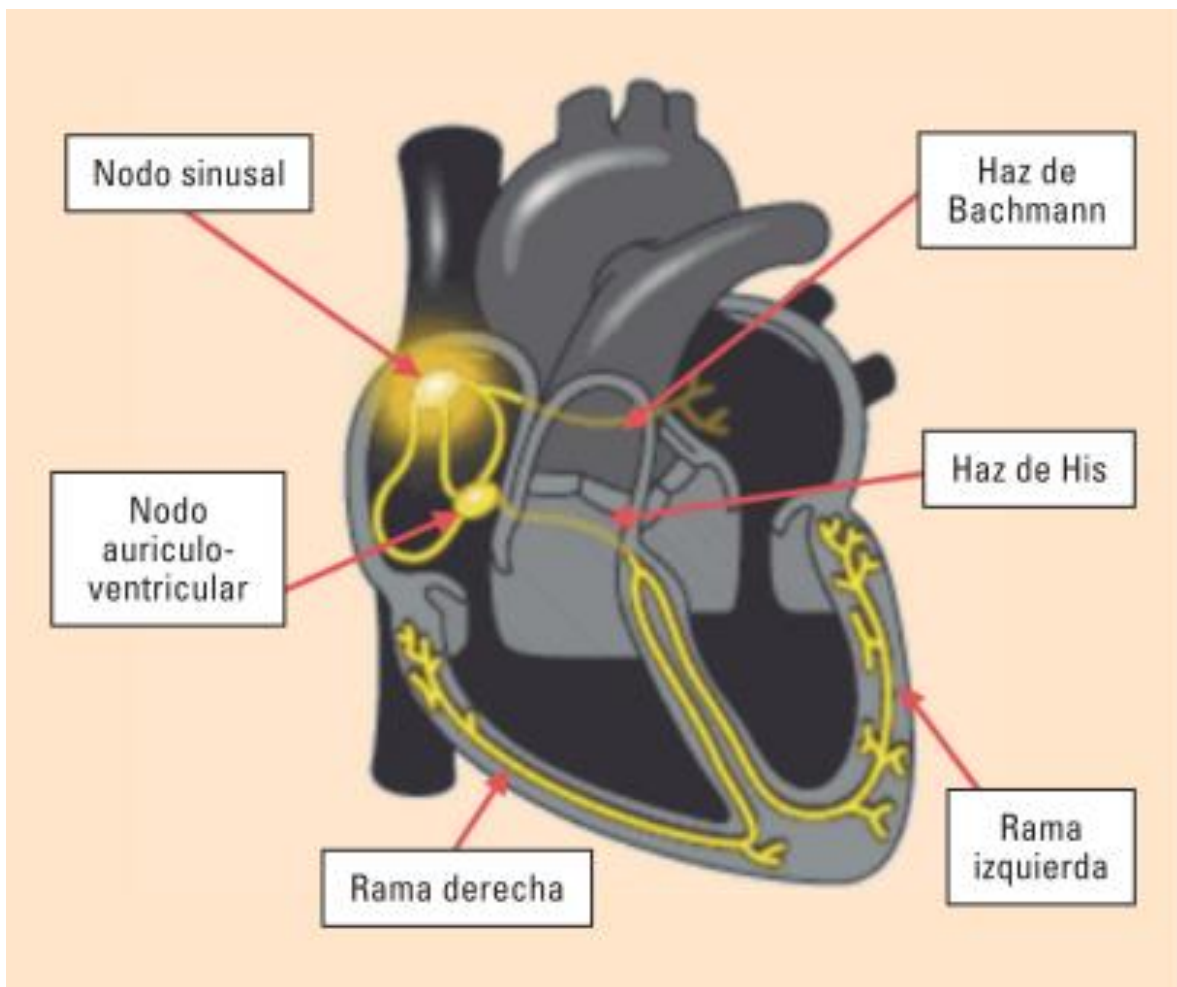


Figura 3: Sistema de conducción cardíaco³.

La actividad eléctrica del corazón la podemos ver representada en un electrocardiograma. Al observar un ECG se ve una onda p de pequeño tamaño que representa la despolarización auricular. El complejo de ondas QRS representa la activación ventricular. La onda T es la consecuencia de la repolarización de la masa miocárdica⁴ (Figura 4).

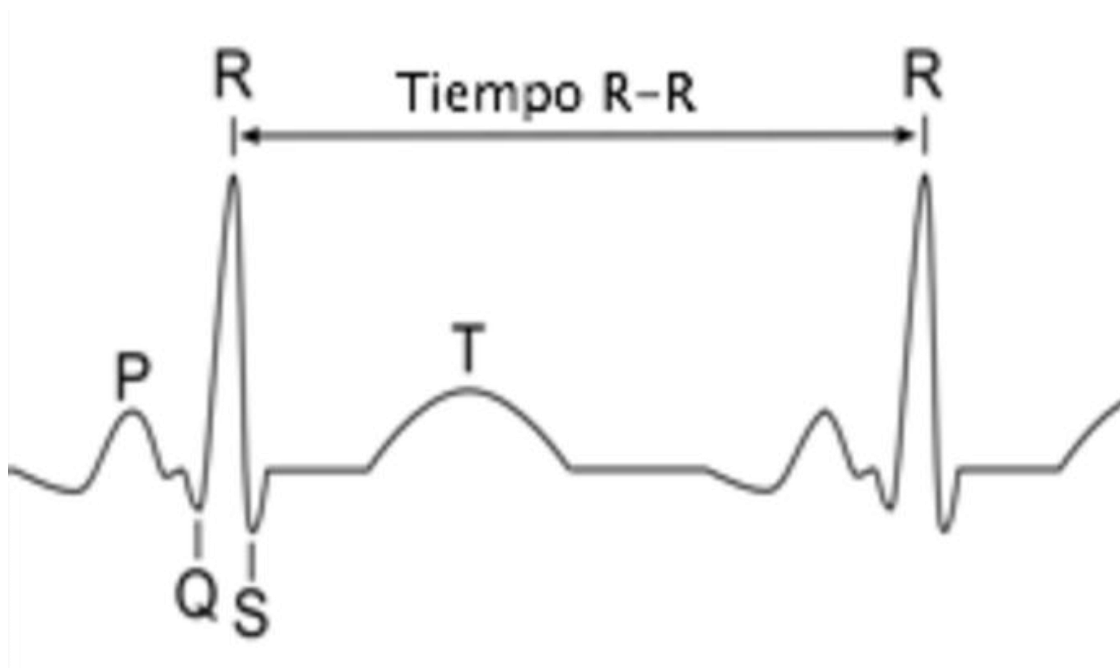


Figura 4: Imagen de un electrocardiograma. Imagen obtenida de la web www.researchgate.net

4.3. Arritmias

Una arritmia es una alteración en la generación, transmisión y/o regularidad de los impulsos eléctricos comparados con un corazón sano que late a ritmo normal. Se pueden clasificar en dos vertientes; si implica un descenso de la frecuencia cardíaca se denominan bradiarritmias, o si por el contrario causa un aumento de la frecuencia, en ese caso se denominan taquiarritmias³.

El síndrome de QT corto (SQTC) se caracteriza por un intervalo de QT sucinto y un riesgo de arritmias auriculares y ventriculares. La descripción inicial del SQTC incluyó un QT de 300 milisegundos. El límite inferior de la normalidad para el intervalo de QT es de aproximadamente 350 milisegundos para los hombres y 360 milisegundos para las mujeres. En la actualidad, se ha llegado a un consenso y el QTT para diagnosticar SQTC se ha corregido a 330 milisegundos⁵.

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) fue descrita por primera vez en 1978. El sello distintivo de CPVT es la aparición de arritmias ventriculares con el ejercicio físico, el estrés emocional, o la administración de catecolaminas, en ausencia de cardiopatía estructural. Los síntomas suelen comenzar en la infancia o en la adolescencia, pero hay casos con inicio en la edad adulta. El síncope durante el ejercicio suele ser el síntoma de presentación. Si no se trata, esta condición tiene una mortalidad muy elevada, con informes de hasta el 50% a la edad de 30 años⁵.

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia más frecuente y afecta al ritmo normal del corazón. En la unión Europea hay unos 4,5 millones de personas que la sufren. La FA es una taquiarritmia en la que las aurículas laten de forma descoordinada a una frecuencia muy alta. Esta frecuencia supera los 350 latidos por minuto. Las aurículas bombean la sangre ineficazmente a los ventrículos haciendo que se contraigan de forma irregular. Esta descoordinación auricular se representa como oscilaciones rápidas en el ECG⁶.

El síndrome de QT largo (SQTL) es una canalopatía que afecta aproximadamente a una de cada 2500 personas, principalmente gente joven. Está caracterizado por una prolongación de la repolarización ventricular que se manifiesta por un incremento del QT en el ECG (Figura 5). Esto arriesga a los pacientes a presentar síncope y muerte súbita por Torsade de pointes (una especie de taquicardia), que degenera en fibrilación ventricular, una desorganización de los impulsos ventriculares con ausencia de latido efectivo. Hasta el momento se han descubierto más de 700 mutaciones en 13 genes distintos relacionados con el SQTL, de las cuales el 75% aproximadamente se encuentran en 3 genes: KCNQ1 (SQTL1) y KCNH2 (SQTL2), que afectan a los canales de potasio, y SCN5A (SQTL3), que codifica los canales de sodio⁷.

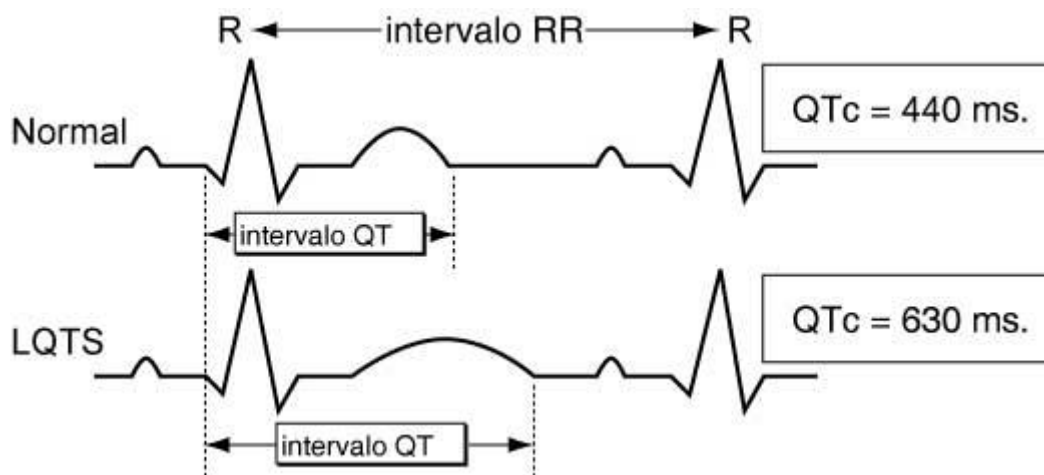


Figura 5: Electrocardiograma de una persona normal comparado con el electrocardiograma de un paciente con SQTL. Imagen obtenida de la web www.sads.org

El SQTL muestra una gran heterogeneidad genética (Tabla 1).

Tipo de SQTL	Cromosoma en el que se halla (CHORM)	Nombre del gen
1	CHORM 11	KCNQ1
2	CHORM 7	KCNH2
3	CHORM 3	SCN5A
4	CHORM 4	ANKB
5	CHORM 21	KCNE1
6	CHORM 21	KCNE2
7	CHORM 17	KCNJ2
8	CHORM 12	CACNA1
9	CHORM 3	CAV3
10	CHORM 11	SCN4B

Tabla 1: Relación de tipos de SQTL con el cromosoma donde se encuentra y el nombre del gen⁸.

A pesar de la secuenciación completa de todos los genes descritos, existe un 25-30% de pacientes con SQTL que permanecen sin diagnóstico genético⁹.

Estos 3 genes (KCNQ1, KCNH2 y SCN5A) codifican para las unidades formadoras de poros de los canales de potasio I_{kansas} y I_{kr} . Los canales iónicos son proteínas transmembrana que los iones utilizan para pasar a través de la membrana celular. Los canales implicados en el SQTL son selectivos, están especializados en el transporte de un solo ión y son dependientes de la tensión, que se activen o no va a depender de la tensión intracelular específica, que varía de acuerdo con el subtipo de canal⁸. Los fenómenos eléctricos y contráctiles que se inician en el cardiomiocito están controlados por estas estructuras. Los canales iónicos forman complejos macromoleculares que consiste en una unidad principal que forma el poro del canal y las proteínas auxiliares que lo regulan. El mal funcionamiento del canal visto en el SQTL puede ocurrir en estos dos sitios: la proteína principal o las proteínas reguladoras⁸.

La participación de la unidad de formación de poros se conoce como alfa, es la encargada de generar los tres tipos de SQTL más comunes: SQTL1 (afecta a los canales de potasio I_{kansas}), SQTL2 (que afecta a los canales de potasio I_{kr}) y SQTL3 (que afecta los canales de sodio)⁸.

Las mutaciones heterocigotas (gen dominante) en KCNQ1 causan el síndrome de Romano-Ward (SQTL solamente), mientras que las mutaciones homocigotas (gen recesivo) causan el síndrome de Jervell-Lange-Nielsen (SQTL y sordera). La prevalencia de RWS se estima que es de 1:10.000 a 1:15.000, mientras que JNLS se produce una prevalencia estimada de 1,6 a 10 por millón¹⁰.

El gen para SQTL1 (el más común de los trastornos) es KCNQ1, que codifica la subunidad alfa de formación de poros de la proteína de canal de potasio I_{kansas} , lo que requiere que se ensamble con la subunidad beta llamada minK para su correcto funcionamiento¹⁰. Cuatro subunidades alfa de KCNQ1 interactúan con KCNE1, gen que codifica minK, para iniciar la corriente de I_{kansas} .

KCNQ1 se compone de seis segmentos putativos de transmembrana (S1 a S6), existe una región de poro (P) situado entre S5 y S6, y un dominio C-terminal que representa casi el 60% del canal de potasio. El dominio C-terminal se une para operar en conjunción con minK¹⁰.

KCNQ1 se expresa en más sitios además del corazón, también se puede encontrar en el oído interno (lo que explica la sordera del JLNS), en el riñón, pulmón y placenta¹⁰.

La combinación de subunidades normales y subunidades mutantes KCNQ1 crea canales anormales, y estas mutaciones reducen $I_{K_{\text{Kansas}}}$ causando una pérdida de la función del canal. Las mutaciones en la región del poro y en la región transmembrana S5 son las principales causas de la interrupción del transporte de potasio (Figura 6). En cualquier caso, $I_{K_{\text{Kansas}}}$ se reduce, provocando una prolongación de la repolarización cardíaca¹⁰.

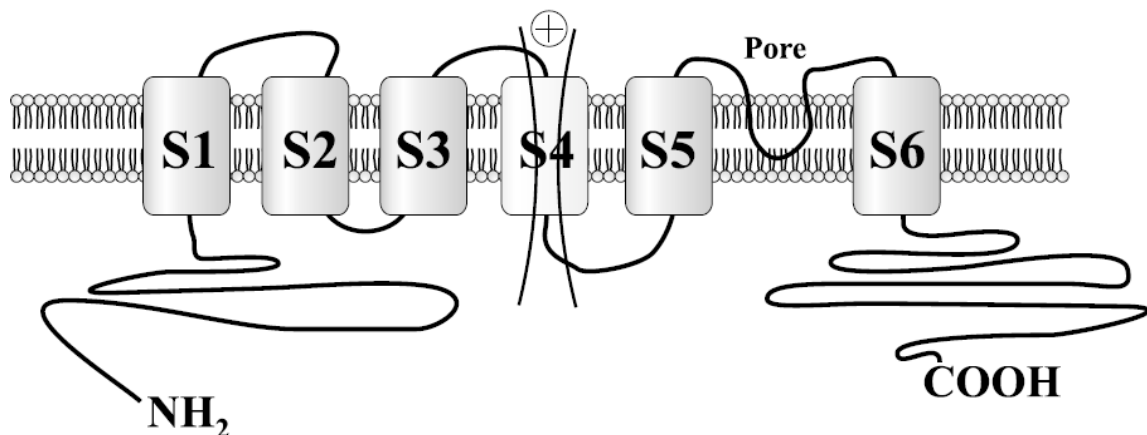


Figura 6: Imagen de KCNQ1 en la membrana celular¹⁰.

Los pacientes con SQTl presentan síncope y mareos, además de palpitations y convulsiones entre otros síntomas. El síncope se da sin previo aviso y es abrupto y sin señal alguna de advertencia. Se diagnostica por la presencia de estos síntomas, antecedentes familiares (por lo que sería bueno una prueba genética si ha habido algún caso en la familia, ya sea de episodios o incluso muerte súbita) y las características del ECG¹¹.

Se aconseja un estilo de vida saludable a los pacientes con SQTl, evitando ejercicios que supongan un gran esfuerzo, incluyendo natación y deportes acuáticos.

La exposición a ruidos fuertes como podría ser la alarma de un reloj debe ser reducida, además de evitar fármacos que prolonguen el intervalo QT.

Para el tratamiento, el pilar de la terapia son los betabloqueantes, ya que estos están asociados a una significativa reducción de episodios cardíacos en pacientes con SQTL. Para los pacientes sintomáticos se recomiendan los bloqueadores beta de acción prolongada en las dosis máximas toleradas y la interrupción brusca debe ser evitada¹¹.

Los suplementos de potasio y/o medicamentos ahorradores de potasio, como la espironolactona acorta el intervalo QT en un 24% de los casos. Los fármacos que favorecen la apertura de los canales de sodio como aprikalim, levromakalim, nicorandil y pinacidil, han demostrado ser útiles en el tratamiento con pacientes de SQTL1 y SQTL2. Los pacientes con SQTL3 por lo general se benefician más del uso de un marcapasos⁸.

4.4. Modelo murino de síndrome de QT largo

En 2001 se crearon los ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT-iso-T7. Este modelo murino presenta caracteres fenotípicos propios del síndrome QT largo, ya que sobreexpresa una isoforma truncada del canal de potasio humano causado por el gen KCNQ1. Se diferenciaron tres líneas transgénicas dependiendo de la gravedad del fenotipo, de modo que la línea H02 sería la menos severa, después vendría la línea H05 y por último la más severa, la línea H08¹².

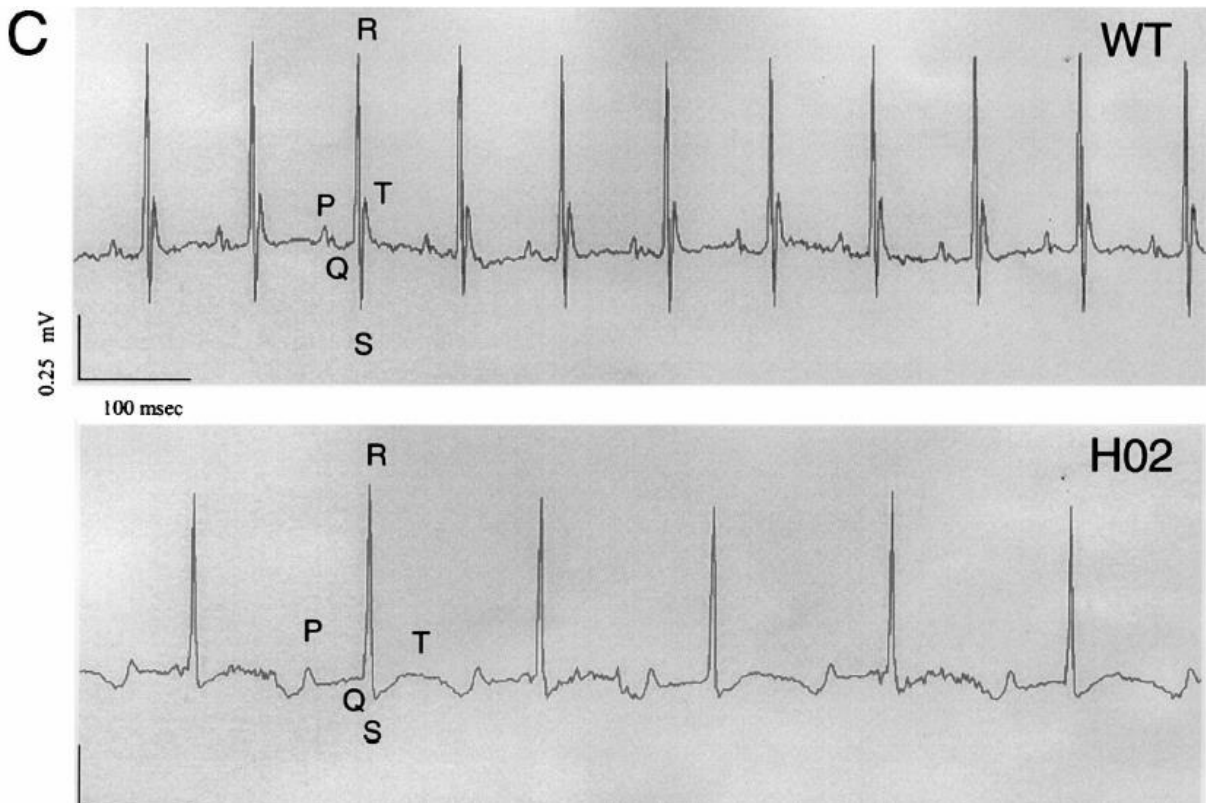


Figura 7: electrocardiograma de un ratón normal (WT) y un ratón transgénico (H02) con el gen *KCNQ1*¹².

4.5. Comunicación intercelular por exosomas

En los últimos años se ha visto que la comunicación intercelular puede estar mediada por exosomas. Los exosomas son pequeñas microvesículas derivadas de la membrana plasmática. Se consideran como una mini versión de la célula por su composición similar, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y el contenido respectivo a su célula de origen¹³.

Tienen un diámetro de entre 40-100 nm y son liberados por la mayoría de células del cuerpo, posiblemente como un vehículo para una nueva forma de comunicación intercelular. Se han encontrado exosomas en fluidos corporales como orina, líquido amniótico, leche materna, saliva o sangre. También se han implicado en el transporte y la propagación de la carga infecciosa, tales como priones y retrovirus, incluido el VIH. Además, los exosomas llevan una serie de proteínas que reflejan la célula huésped de origen¹⁴. Hallazgos recientes dicen que los exosomas contienen formas inactivas de ARNm y microRNAs que pueden ser transferidos a

otra célula y ser funcional en ese nuevo entorno, por ello se han iniciado nuevos estudios con miRNAs de exosomas que circulan por la sangre.

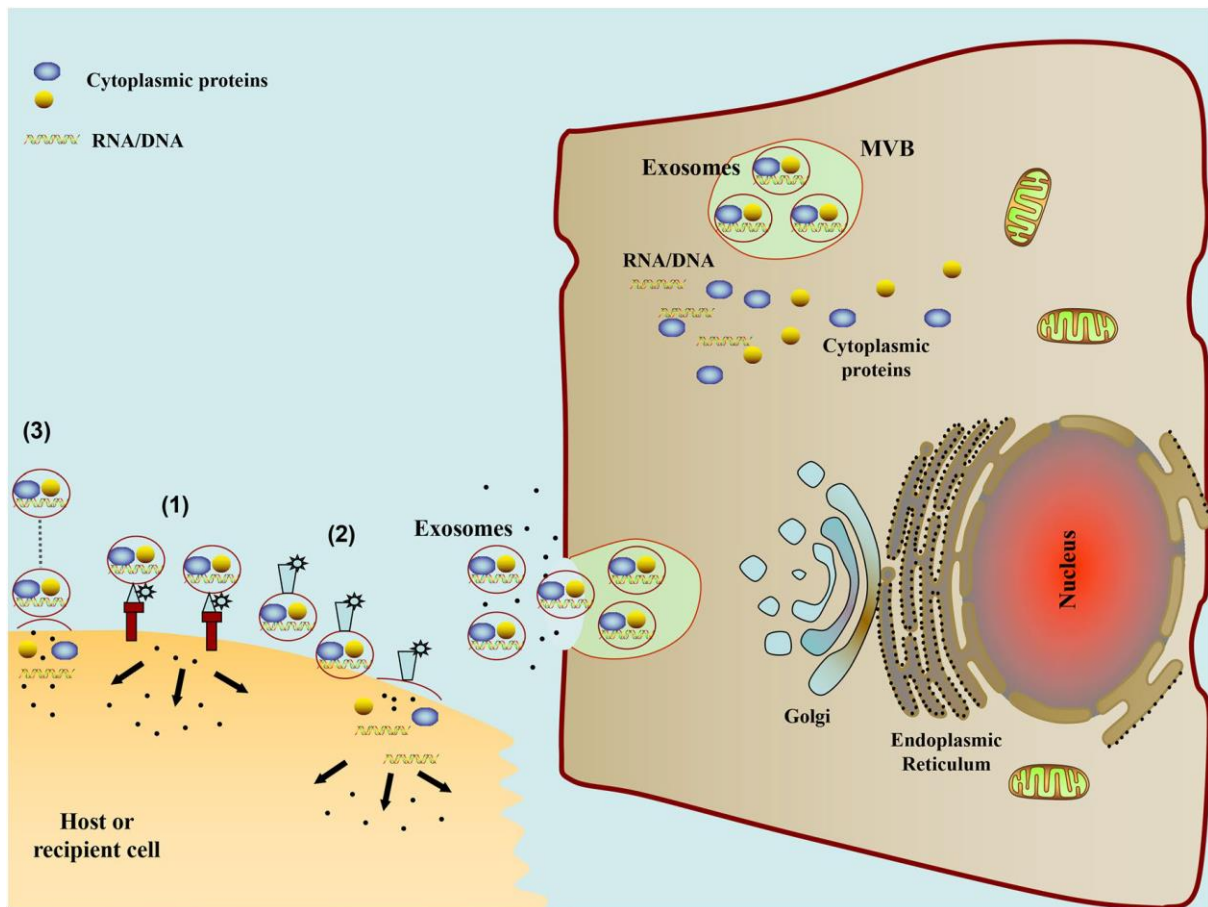


Figura 8: diagrama esquemático de vías implicadas en la comunicación de célula a célula por exosomas¹³.

Los microRNAs tienen un tamaño de 19-25 nucleótidos, y son objeto de estudio pues al formar parte de la composición de los exosomas, y estos migrar de una célula a otra, estos miRs se pueden activar y ser funcionales en otra célula del cuerpo, y no en su célula de origen¹⁵.

La primera vez que se identificaron estos miRs fue en *Caenorhabditiselegans* a principios de la década de 1990¹⁶. En los últimos años se ha incrementado el estudio del papel de los miRs circulantes libres en sangre en humanos, sobre todo en el área del cáncer. Se conoce que estos miRs pueden ejercer como oncogenes y/o como supresores de tumores. La alteración en los niveles de expresión de un miR puede ayudar al desarrollo de estas enfermedades y por ello se investigan como nuevos biomarcadores¹⁷.

Tipo de cáncer	miRNAs	citas
Cáncer pancreático	miR-200a y miR-200b	18
Linfoma de células B	miR-21, miR-155 y miR-210	19
Cáncer de mama	miR-195, let-7a, miR-155, miR-10b y miR-34a	20
Cáncer gástrico	miR-21, miR106b, let-7a y miR-17-5p	21
Cáncer de próstata	miR-375 y miR-141	21 y 22
Cáncer colorrectal	miR-92, miR-17-3p y miR-29a	23
Hepatocarcinoma celular	miR-16, miR-199a y miR-195	24
Cáncer de pulmón	miR-17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR-191, miR-192, miR-203, miR-205, miR-210, miR-212 y miR-214.	25

Tabla 2: Ejemplos de miRs libres circulantes en sangre en diferentes tumores malignos.

Viendo la relación existente entre los miRs libres circulantes en sangre y su influencia en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, se empezaron las investigaciones también en el campo de las enfermedades cardiovasculares.

Los miRs se utilizan como biomarcadores de patologías cardiovasculares como insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria o riesgo cardiovascular¹⁵. Hasta el momento , parece haber aproximadamente 150-200 miRs expresados en el sistema cardiovascular²⁶.

Las altas concentraciones de miR-1^{27,28}, miR-133²⁹, miR-208a³⁰ y miR-499³¹ son biomarcadores de infarto agudo de miocardio. Altas concentraciones de miR-1 y miR-133a también son indicadoras de síndrome coronario agudo³².

Cuando se hallan concentraciones altas de miR-29a se inhibe la proliferación de cardiomiocitos, por lo que se impide la regeneración cardíaca después de un fallo³³. El miR-29a también se asocia significativamente tanto a la hipertrofia como a la fibrosis cardíaca³⁴. Y las altas concentraciones de miR-100 vulneran la placa coronaria³⁶ acumulando grasa en la placa dentro de la arteria hasta que esta se cierra o es obstruida por un coágulo sanguíneo.

Pero no solo las altas concentraciones de miRs son indicadoras de enfermedades cardiovasculares, las bajas concentraciones de algunos miRNAs también lo son impidiendo que el corazón se desarrolle de manera normal. En el caso de los miR-30, miR-182 y miR-526, las bajas concentraciones se asocian a la hipertrofia cardíaca, además de las altas concentraciones de miR-21, miR-29b, miR-129, miR-210, miR-211, miR-212 y miR-423²⁶.

Por el momento se dispone de muy poca información sobre miRs en exosomas en un contexto de arritmia. En la actualidad no hay ningún estudio que analice miRs exosómicos en síndrome de QT largo.

En este TFG se ha querido analizar si alguno de los miRs relacionados anteriormente con algunas patologías, tales como miR-1, miR-29a y miR-100, presentan alteraciones en sus niveles exosomales en un contexto de arritmia, como es el caso del síndrome de QT largo.

5. HIPÓTESIS

La hipótesis de este Trabajo Fin de Grado es que los niveles de expresión de miRs de exosomas circulantes en ratones normales (tipo salvaje) difiere a los ratones transgénicos que comparte caracteres fenotípicos con el síndrome de QT largo de humanos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Modelo experimental

En este estudio se utilizó el ratón (*Mus musculus*) como modelo experimental, en concreto se usó el modelo transgénico alfa-MHC-KvLQT-iso2-T7. Este modelo murino presenta caracteres fenotípicos propios del síndrome QT largo, ya que sobreexpresa una isoforma truncada del canal de potasio humano causado por el gen KCNQ1. En total se utilizaron seis individuos de la cepa alfa-MHC-KvLQT-isoT7, tres de los cuales no portaban la construcción génica (controles) y tres ratones que eran positivos para dicha construcción.

6.2. Obtención de sangre y suero

De la extracción de sangre se encargó el personal CPEA del animalario de la Universidad de Jaén. Se extrajo entre 0,25-0,5 ml de sangre mediante la técnica de extracción submandibular y se depositó en un tubo eppendorf de 1 ml, los cuales se mantuvieron y trasladaron en frío. Las muestras se identificaron correctamente.

A continuación, se deja reposar la sangre 15-20 minutos a temperatura ambiente para que se forme el coágulo y después se centrifugan los tubos a 1500 r.p.m durante 10 minutos también a temperatura ambiente. Con una micropipeta se recoge con cuidado el suero que se ha quedado en la parte de arriba del tubo centrifugado, evitando coger el coágulo, y se deposita en un tubo eppendorf, el cual ha sido previamente identificado.

6.3. Extracción de los exosomas

Para la obtención de los exosomas a partir del suero se utilizó el kit Total Exosome Isolation Reagent (from serum, número de catálogo: 4478360) de la casa comercial Invitrogen by ThermoFisher Scientific. La extracción se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.4. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir de los exosomas se utilizó el kit Direct-zolTMRNA Miniprep (número de catálogo: R2052) de la casa comercial ZYMO RESEARCH, junto con TrizolTMReagent (número de catálogo 15596-026) de la casa comercial Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Para verificar la calidad de la extracción de ARN se añadió a las muestras el kit RNA Spike-In Kit, For RT (número de catálogo: 339390) de la casa comercial Qiagen, el cual contiene los spikes-in Sp2, Sp4 y Sp5. Los spikes-in son miRNAs sintéticos que se añaden a la muestra y se comprueban en la PCR para ver si la extracción de ARN ha sido correcta.

6.5. Retrotranscripción

La retrotranscripción es una técnica en la que se sintetiza ADNc (ADN complementario) a partir de ARN molde para, en nuestro caso, su posterior amplificación mediante una PCR a tiempo real. Se realizó el ensayo siguiendo las indicaciones del protocolo del kit MiRCURY LNA RT Kit (número de catálogo 339340) de la casa comercial Qiagen. Este kit contiene el spike-in Sp6 para verificar que la retrotranscripción se ha llevado a cabo correctamente.

6.6. PCR a tiempo real

Los ensayos de la PCR a tiempo real (q PCR) se llevaron a cabo usando el perfeCTa SYBR Green FastMixfor IQ (orden: 95071-250) de la casa comercial Quantabio y se siguieron sus indicaciones.

Se utilizaron los primers miR-1 (número de catálogo MS00008358), miR-29a (número de catálogo MS00003262) y miR-100 (número de catálogo MS00008365) todos pertenecientes a la casa Qiagen. Como normalizador se utilizó el miR-16 (número de catálogo 333832).

Las qPCRs se realizaron en el equipo CFX384 (Biorad) compuesto por un termociclador modelo C1000. Como controles negativos se utilizaron muestras en las que se añadió agua y no ADNc y unas muestras(RT-), en las que no se había añadido enzima de retrotranscripción. Este último sirve para detectar posibles contaminaciones con ADN genómico.

	# Cycles	Standard Cycling Program
Hot-Start Activation	1	95°C for 2 minutes
Denaturation	40	95°C for 15 seconds
Annealing/Extension		60°C for 60 seconds
Dissociation	1	60–95°C

Figura 9: perfil térmico de la PCR a tiempo real de los miRs.

6.7. Análisis de los resultados obtenidos.

La cuantificación del ADN se realizó siguiendo el método de Livak³⁶. Se usó Prism 6 para el análisis estadístico y representación de los resultados obtenidos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La PCR a tiempo real (qPCR) es una técnica de detección y amplificación de ADN que utiliza oligonucleótidos y un marcador fluorescente para medir la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo de la PCR. En nuestro caso se ha analizado mediante qPCR los niveles de miR-1, miR-29a y miR-100 en exosomas de un modelo murino que presenta caracteres fenotípicos propios del síndrome de QT largo. Como control, se usaron animales del mismo modelo que eran negativos para la construcción génica. Como normalizador, se usó la expresión del miR-16.

Los datos obtenidos de la PCR se analizaron estadísticamente mediante el test T-student para la comparación de medias, y los resultados fueron:

$p = 0,11$ para el miR-1

$p = 0,39$ para el miR-29a

$p = 0,33$ para el miR-100

Según estos valores no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambas poblaciones (controles y alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7) para ninguno de los tres miRNAs analizados.

Una explicación para que no se encuentren diferencias estadísticamente significativas en las medias entre ratones normales y los que portan la construcción génica puede ser que un $n=3$, no es suficiente para obtener una representación del comportamiento de medias de ambas poblaciones.

En las gráficas (Figuras 10, 11 y 12) se puede ver que existen diferencias en la dispersión de datos de ambas poblaciones, y que para la población de los que portan el transgén se observa mucha más variabilidad. Por ello se hizo un segundo test estadístico, el test F de Snedecor para la varianza y los resultados fueron:

p= 0,0063 para el miR-1.

p= 0,0097 para el miR-29a.

p= 0,001 para el miR-100.

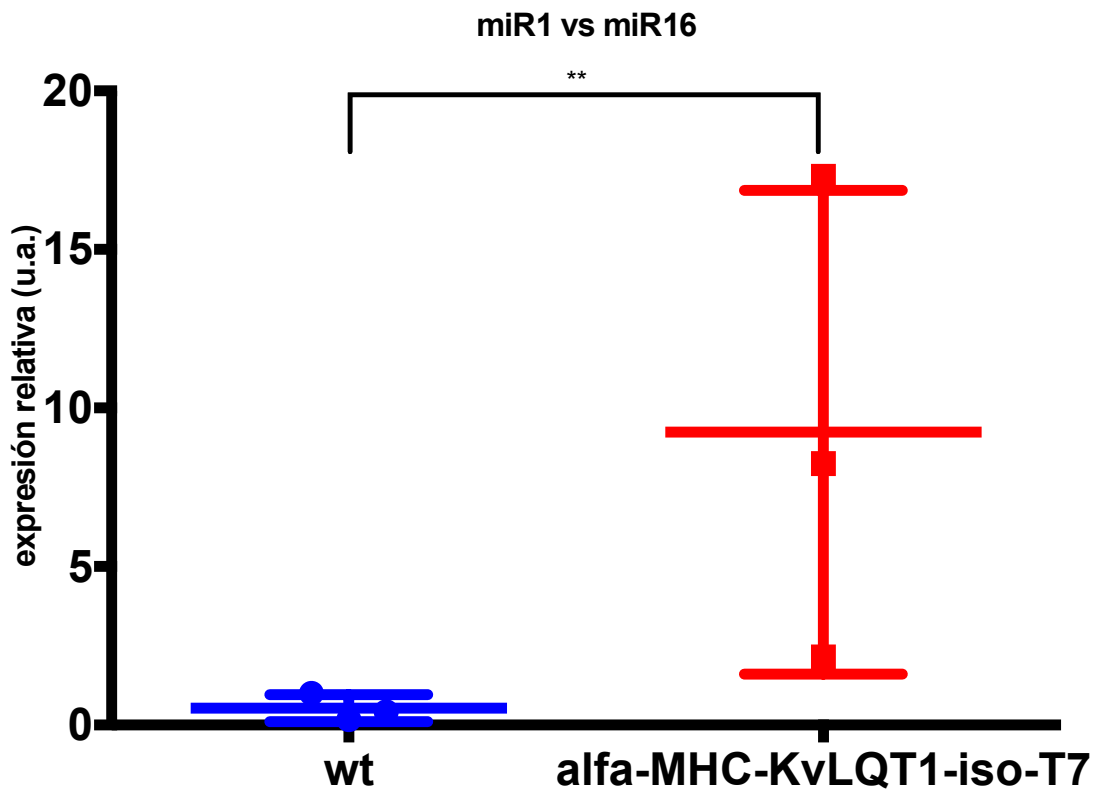


Figura 10: Expresión relativa del miR-1 en ratones control (wt) y ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

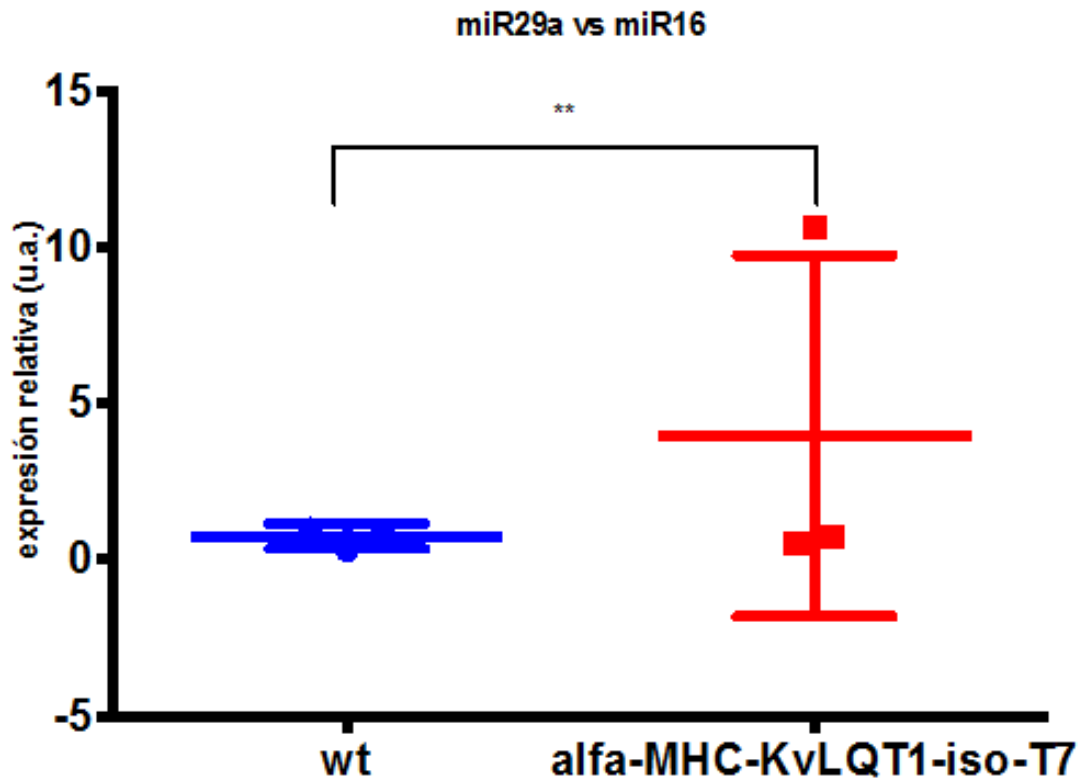


Figura 11: Expresión relativa del miR-29a en ratones control (wt) y ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

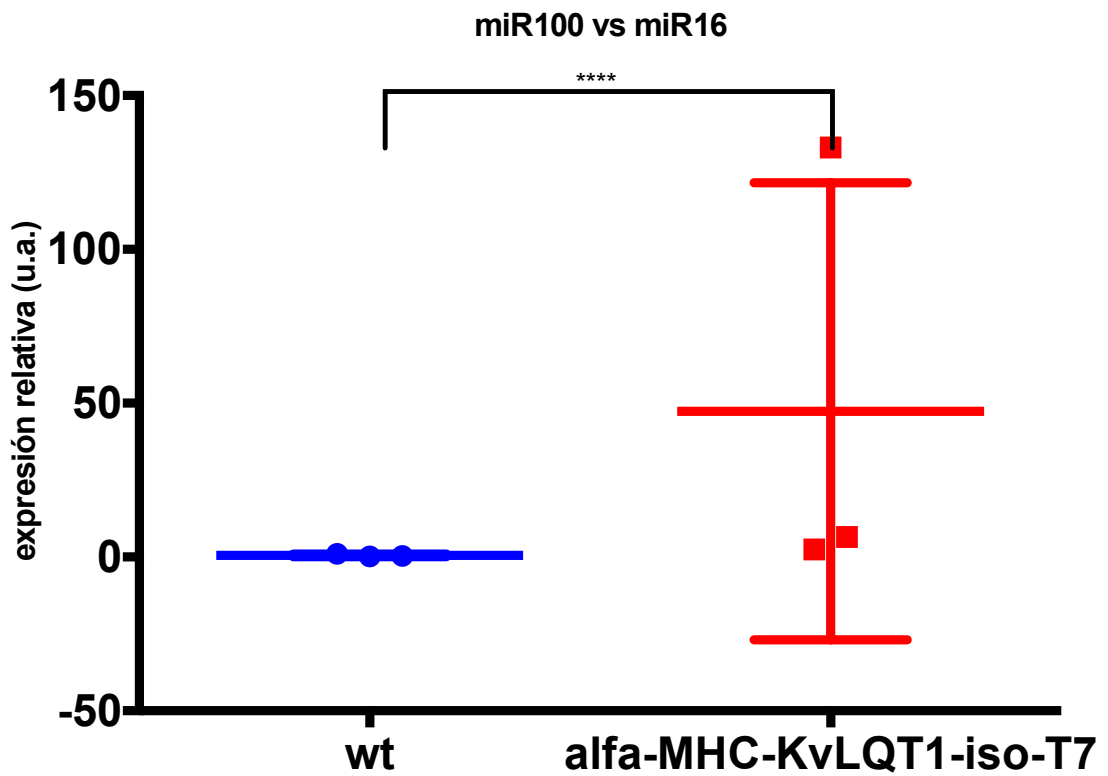


Figura 12: Expresión relativa del miR-100 en ratones control (wt) y ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

Además, si se observan las gráficas de la población transgénica (Figuras 13, 14 y 15) se puede ver claramente como uno de los individuos analizados muestra una mayor expresión de los tres miRs analizados, destacando sobre el resto (individuo número 2).

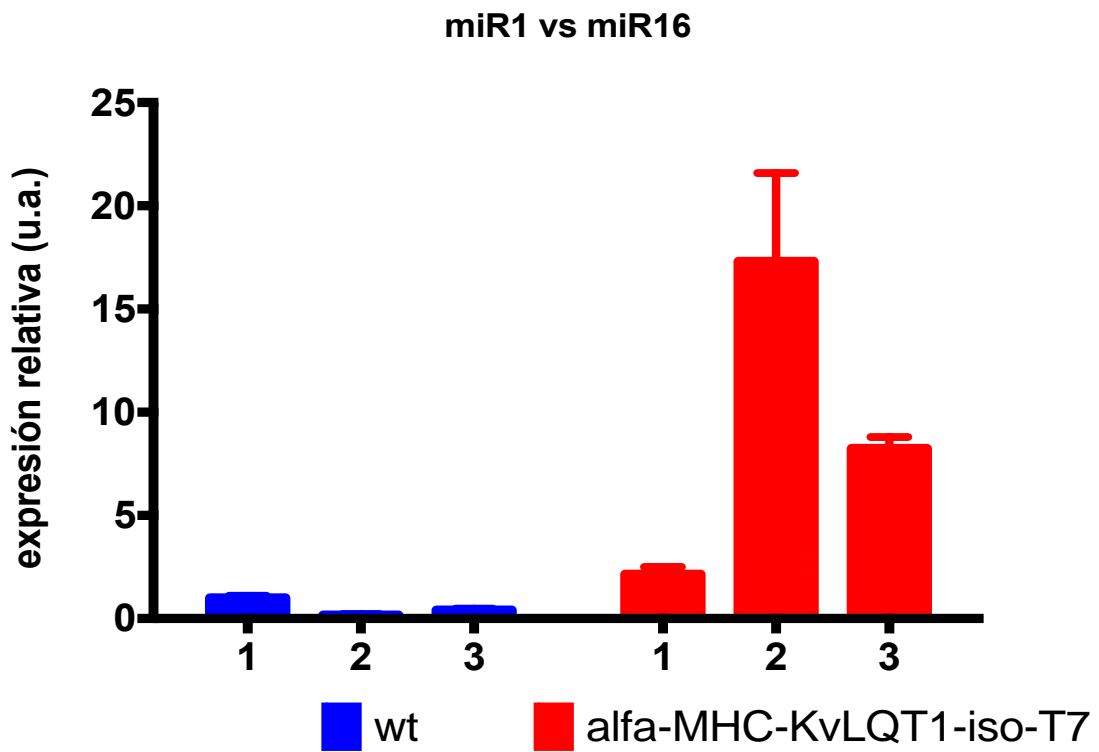


Figura 13: Representación de la expresión relativa del miR-1 en cada uno de los ratones control (wt) y ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

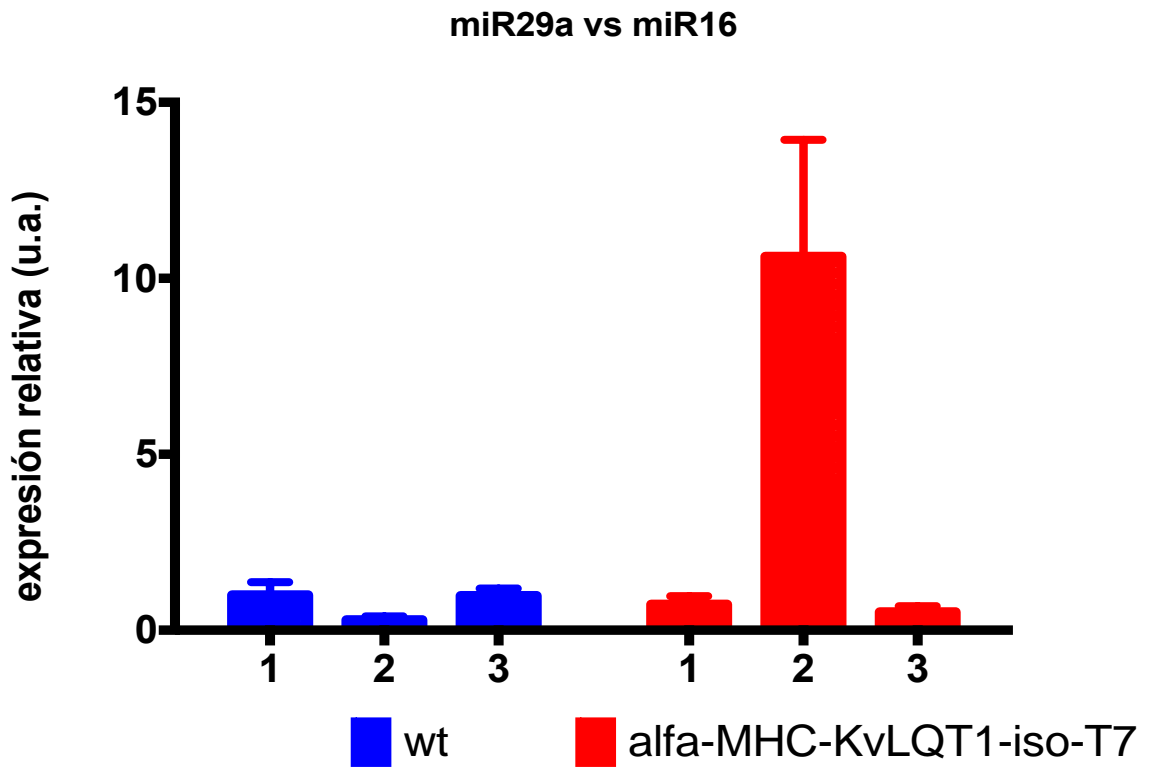


Figura 14: Representación de la expresión relativa del miR-29a en cada uno de los ratones control (wt) y ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

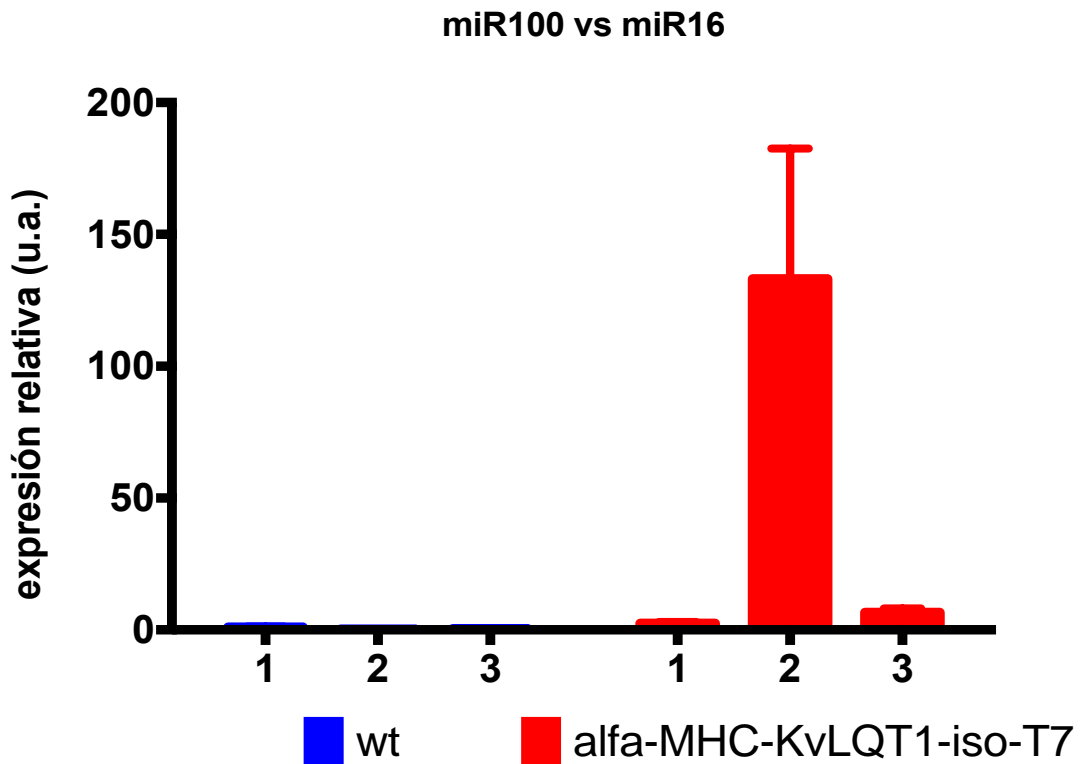


Figura 15: Representación de la expresión relativa del miR-100 en cada uno de los ratones control (wt) y ratones transgénicos alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

En este caso, para el test F de Snedecor si hay significación tal y como muestran las figuras 10, 11 y 12. Esto quiere decir que aunque las medias no muestran diferencias, si muestra diferencias la dispersión, hay una mayor variabilidad de los datos obtenidos en la población transgénica con respecto a la población control. Esto podría indicarnos que dentro de los animales transgénicos analizados, algunos poseen más copias de ese transgén en su genomio que otros. Esto explicaría los resultados obtenidos, con mucha dispersión para los niveles de expresión de miRs exosómicos en los alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7.

Con este trabajo se pretendía familiarizarse con los materiales y métodos, y de obtener unos primeros resultados. Para futuras investigaciones se debe aumentar el número de individuos analizados para poder aclarar si estos miRs están o no alterados en los exosomas en este modelo de QT largo.

El uso de miRs exosómicos supone un método de obtención de muestras no invasivo, pues al circular por la sangre, es muy fácil obtener muestras sin causar demasiado malestar al paciente. Su uso como bioindicador ayudaría como pronóstico a personas emparentadas con otras que si sufren arritmias u otras enfermedades cardiovasculares, incluso que han muerto. También ayudarían en el diagnóstico en el caso de que las pruebas genéticas o el electrocardiograma no resultaran del todo concluyentes, ya que se dan episodios de arritmias que escapan a estas pruebas. Y por último, para diseñar un tratamiento que ayude a mejorar la calidad de vida de las personas afectadas.

8. CONCLUSIÓN

- 1) No existen diferencias en los niveles de expresión de los miRs exosómicos miR-1, miR-29a y miR-100 entre ratones controles (wt) y alfa-MHC-KvLQT-iso2-T7.
- 2) Existe una mayor variabilidad en los niveles de expresión en exosomas de miR-1, miR-29a y miR-100 en ratones alfa-MHC-KvLQT1-iso2-T7, al ser comparados con ratones normales (wt).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Paloma D, Ballesteros A. Capítulo 2 Anatomía del corazón. :35-40.
https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap2.pdf.
2. Ramírez J. Fisiología cardiaca. *Rev Médica MD Número 3*. 2009;1:3-6.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2009/md093d.pdf>.
3. Rodríguez Muñoz D, del Val Martín D, Zamorano Gómez JL. Arritmias. *Med*. 2017;12(38):2263-2266. doi:10.1016/j.med.2017.07.001
4. Anderson RH, Yanni J, Boyett MR, Chandler NJ, Dobrzynski H. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat*. 2009;22(1):99-113.
doi:10.1002/ca.20700
5. Spears DA, Gollob MH. Genetics of inherited primary arrhythmia disorders. *Appl Clin Genet*. 2015;8:215-233. doi:10.2147/TACG.S55762
6. Tamargo J, Delpón E. La fibrilación auricular Introducción a la fibrilación auricular. *La salud Cardiovasc.*:405-407.
https://www.fbbva.es/microsites/salud_cardio/mult/fbbva_libroCorazon_cap46.pdf.
7. de Pablo Márquez B, Oliveras Vilà T, Bisbal van Byley F, Grange Sobe IP. Mutação no gene KCNH2 e síndrome de QT longo: um estudo de caso. *Rev Andaluza Med del Deport*. 2016;9(3):138-141. doi:10.1016/j.ramd.2016.02.003
8. Medeiros-Domingo A, Iturralde-Torres P, Ackerman MJ. Clinical and Genetic Characteristics of Long QT Syndrome. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2008;60(7):739-752. doi:10.1016/s1885-5857(08)60010-9
9. Jiménez-Jáimez J, Tercedor-Sánchez L, Álvarez-López M, et al. Estudio genético en el síndrome de QT largo en nuestro medio. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64(1):71-74. doi:10.1016/j.recesp.2010.10.002
10. Herbert E, Trusz-Gluza M, Moric E, Smiłowska-Dzielicka E, Mazurek U, Wilczok T. KCNQ1 gene mutations and the respective genotype-phenotype correlations in the long QT syndrome. *Med Sci Monit*. 2002;8(10):RA240-8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388934>.
11. Shah SR, Park K, Alweis R. Long QT Syndrome: A Comprehensive Review of the Literature and Current Evidence. *Curr Probl Cardiol*. 2019;44(3):92-106.
doi:10.1016/j.cpcardiol.2018.04.002

12. Demolombe S, Lande G, Charpentier F, et al. Transgenic mice overexpressing human KvLQT1 dominant-negative isoform Part I: Phenotypic characterisation. *Cardiovasc Res*. 2001;50:314-327. www.elsevier.com%5Cnwww.elsevier.nl.
13. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019;9(1):1-18. doi:10.1186/s13578-019-0282-2
14. Simpson RJ, Lim JWE, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: Proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6(3):267-283. doi:10.1586/epr.09.17
15. de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutiérrez E, Llorente-Cortés V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol*. 2017;70(9):763-769. doi:10.1016/j.recesp.2017.02.027
16. Lee RC, Lee Feinbaum Ambros the C *Elegans* Heterochronic Gene Lin4 Encodes Small Rnas With Antisense Complementarity To Lin14. 1993;75:843-854.
17. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087-2092. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x
18. Omura N, Goggins M, Borges M, et al. Pancreatic Cancers Epigenetically Silence SIP1 and Hypomethylate and Overexpress miR-200a/200b in Association with Elevated Circulating miR-200a and miR-200b Levels. *Cancer Res*. 2010;70(13):5226-5237. doi:10.1158/0008-5472.can-09-4227
19. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141(5):672-675. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x
20. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease. *Oncologist*. 2010;15(7):673-682. doi:10.1634/theoncologist.2010-0103
21. Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*. 2010;102(7):1174-1179. doi:10.1038/sj.bjc.6605608
22. Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2011;128(3):608-616. doi:10.1002/ijc.25376

23. Ng EKO, Chong WWS, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: A potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*. 2009;58(10):1375-1381. doi:10.1136/gut.2008.167817
24. Qu KZ, Zhang K, Li H, Afdhal NH, Albitar M. Circulating MicroRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45(4):355-360. doi:10.1097/MCG.0b013e3181f18ac2
25. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):189-198. doi:10.1016/j.ccr.2006.01.025
26. Oliveira-carvalho V, Carvalho VO, Silva MM, Bocchi A. Artículo de Revisión MicroRNAs : ¿ Un Nuevo Paradigma en el Tratamiento y Diagnóstico de la Insuficiencia Cardíaca ? 2011:362-369.
27. Cheng Y, Tan N, Yang J, et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci*. 2010;119(2):87-95. doi:10.1042/cs20090645
28. Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):73-77. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.005
29. D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2010;31(22):2765-2773. doi:10.1093/eurheartj/ehq167
30. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: A novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010;31(6):659-666. doi:10.1093/eurheartj/ehq013
31. Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2010;56(7):1183-1185. doi:10.1373/clinchem.2010.144121
32. Kuwabara Y, Ono K, Horie T, et al. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(4):446-454. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.958975
33. Cao X, Wang J, Wang Z, et al. MicroRNA profiling during rat ventricular maturation: A role for miR-29a in regulating cardiomyocyte cell cycle re-entry. *FEBS Lett*. 2013;587(10):1548-1555. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.075

34. Pozo JG, Bioquímica G De. Papel de los miARNs en la fisiopatología cardiovascular. 2016.
35. Soeki T, Yamaguchi K, Niki T, et al. Plasma MicroRNA-100 Is Associated With Coronary Plaque Vulnerability. *Circ J*. 2014;79(2):413-418. doi:10.1253/circj.cj-14-0958
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262