Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Papel de los miARNs en la fisiopatología cardiovascular

Jesús García Pozo

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2016-17

DNI de l'alumne: 43216750-A

Treball tutelat per Ana María Proenza Arenas
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:
Regulación génica, microRNA (miRNAs), disfunción/fisiopatología cardiovascular, biomarcador

ÍNDICE

1) Introducción 4

1.1) Definición y nomenclatura 4

1.2) Biosíntesis y mecanismo de acción de los miRNAs 7

1.3) miRNAs extracelulares y comunicación celular 10

2) Objetivos 11

3) Materiales y métodos 11

3.1) Estrategia de búsqueda 11

3.2) Selección de artículos 13

4) Resultados/Discusión 14

4.1) miRNAs en la fisiopatología cardiovascular 14

4.1.1) miRNAs durante el desarrollo cardíaco, la fisiología y en cardiopatías congénitas 14

4.1.2) miRNAs en el sistema vascular y la homeostasis endotelial 16

4.2) Principales miRNAs implicados en la disfunción cardiovascular y su potencial papel como biomarcadores 17

4.3) miRNAs como terapia 26

5) Conclusiones 27

6) Bibliografía 28

1) Introducción

1.1) Definición y nomenclatura

Los microRNAs (miRNAs) son ácidos nucleicos monocatenarios no codificantes, de muy pequeño tamaño, que presentan una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos(**figura 1**)[1]. Estas moléculas tienen como función principal la regulación de la expresión génica de las células mediante diferentes procesos, como la activación mecanismos de degradación de los mRNA, la inhibición de la traducción y la estimulación indirecta de la transcripción de genes específicos. Esto permite que estas moléculas intervengan en un gran número de procesos celulares.

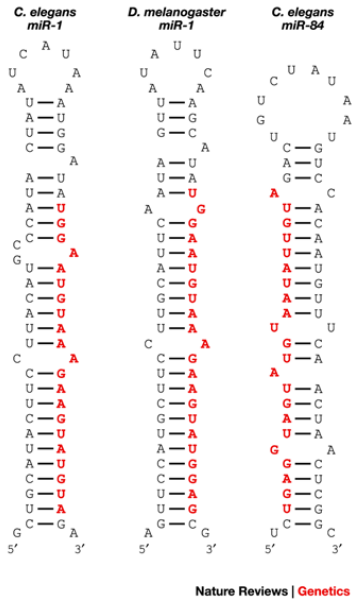

Figura 1. Estructura de los precursores de los miRNA, y marcado en rojo la secuencia que corresponde al miRNA. En este caso se ilustran el miRNA-1 y miRNA-84[2]

Los miRNAs se encuentran localizados en múltiples tejidos del organismo, como también en el suero sanguíneo, donde se asocian a exosomas, HDLs o complejos proteicos para evitar su degradación[1].

Pero también se han descrito otra función relevante de los miRNAs, ya que numerosos estudios han demostrado que la desregulación en el perfil de expresión y secreción de algunos tipos de miRNAs están relacionados con la aparición y desarrollo de diferentes enfermedades, en especial de la fisiopatología cardiovascular. Este aspecto es el que vamos a abordar en este trabajo, recogiendo y seleccionando la información de mayor relevancia y actualizada sobre el tema.

Es considerado un asunto de gran importancia, ya que las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad en el mundo (**figura 2**), y gracias al estudio de los miRNA se puede contribuir a conocer la etiología de estas patologías, e incluso llegar a desarrollar marcadores o dianas terapéuticas para tratar y evitar estas enfermedades.

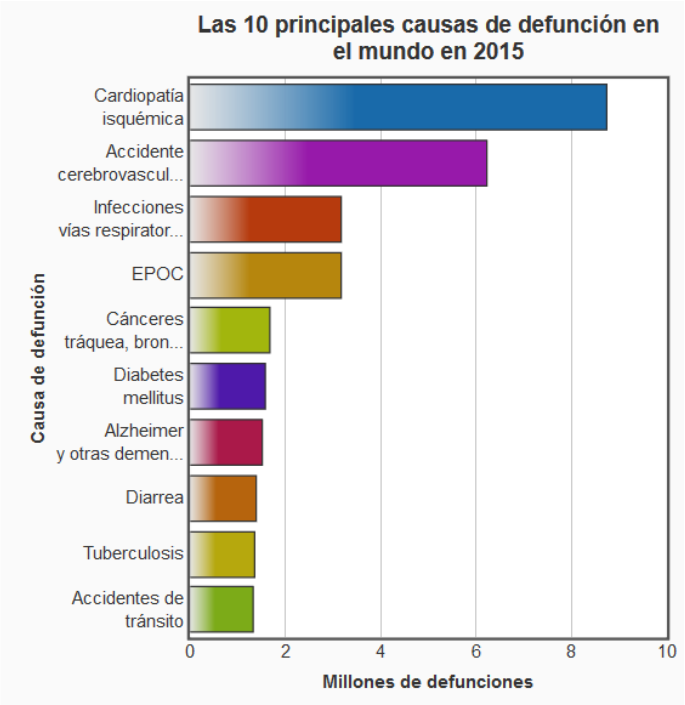

Figura 2. Las 10 principales causas de muerte en el mundo según la OMS[3].

Los miRNA fueron descritos por primera vez el año 1993 por Lee[4] y su equipo en la especie *Caenorhabditis elegans*[4], pero no fue hasta el año 2001 cuando fueron reconocidos bajo este nombre gracias a los hallazgos realizados por diferentes investigadores y publicados en 3 artículos en la revista *Science*[5]. En el 2002 se publicaron los primeros estudios que ponían de manifiesto el rol patogénico de los miRNA, en relación con la leucemia crónica[6].

En el año 2006 se le otorgó el premio nobel en medicina a los investigadores Craig C. Mello y Andrew Z. Fire[7] por sus descubrimientos sobre la regulación de la expresión génica mediante los miRNA y los siRNA[7], por el mecanismo conocido como interferencia por RNA.

Con el paso de los años se fue descubriendo que los miRNA además estaban implicados en un gran número de procesos. En el 2008 se descubrió la presencia de miRNAs circulantes[8], y se empezaron a asociar los niveles de miRNA con la aparición de diferentes patologías, en concreto en primera instancia se asoció el aumento de miRNA-21 con el linfoma de células B[8]. Desde entonces un gran nº de estudios e investigaciones se han centrado en encontrar diferentes perfiles de miRNA circulantes que pudieran ser útiles como biomarcadores de una amplia gama de patologías[6].

En cuanto a su influencia en el sistema cardiovascular, fue en el año 2005 que mediante estudios con *Drosophila* se observó el papel que tenían los miRNA en la fisiología cardiaca, y su conservación entre las diferentes especies permitió que estos hallazgos pudieran ser importantes también para la especie humana[6].
A día de hoy ya se han hallado más de 2500 tipos de miRNA diferentes en células humanas[9], y se tiene un registro de todos ellos en la base de datos conocida como "miRNAbase".

Es importante para la comprensión de este trabajo recordar que la **nomenclatura** de los miRNAs se basa en las siguientes normas:

- Los miRNA se numeran para distinguirse entre ellos, clasificándose según el orden en el que se descubran[10]. Se diferencian por sus secuencias nucleótidicas.
- Los ortólogos (miRNA en diferentes especies con la misma función) son casi idénticos por lo que se designan con el mismo número, ya que la secuencia se conserva entre especies[10].
- Los miRNA que tienen secuencias muy similares (con cambios en uno o dos nucleótidos) dentro de una especie también se nombran con el mismo número, pero son distinguidos por una letra (por ejemplo miRNA-133a y miRNA-133b)[10]. Aquellos miRNA con secuencias muy similares suelen agruparse en familias, y normalmente tienen funciones similares[11].
- En el caso de que haya 2 miRNA que se originan de los extremos opuestos de un mismo pre-miRNA (precursor), se añade el sufijo -3p o -5p[12].
- Y finalmente aquellos miRNA que tienen una secuencia idéntica pero que son codificados en diferentes genes o regiones génicas se diferencian añadiendo un número adicional tras su número correspondiente[12].

1.2) Biosíntesis y mecanismo de acción de los miRNAs

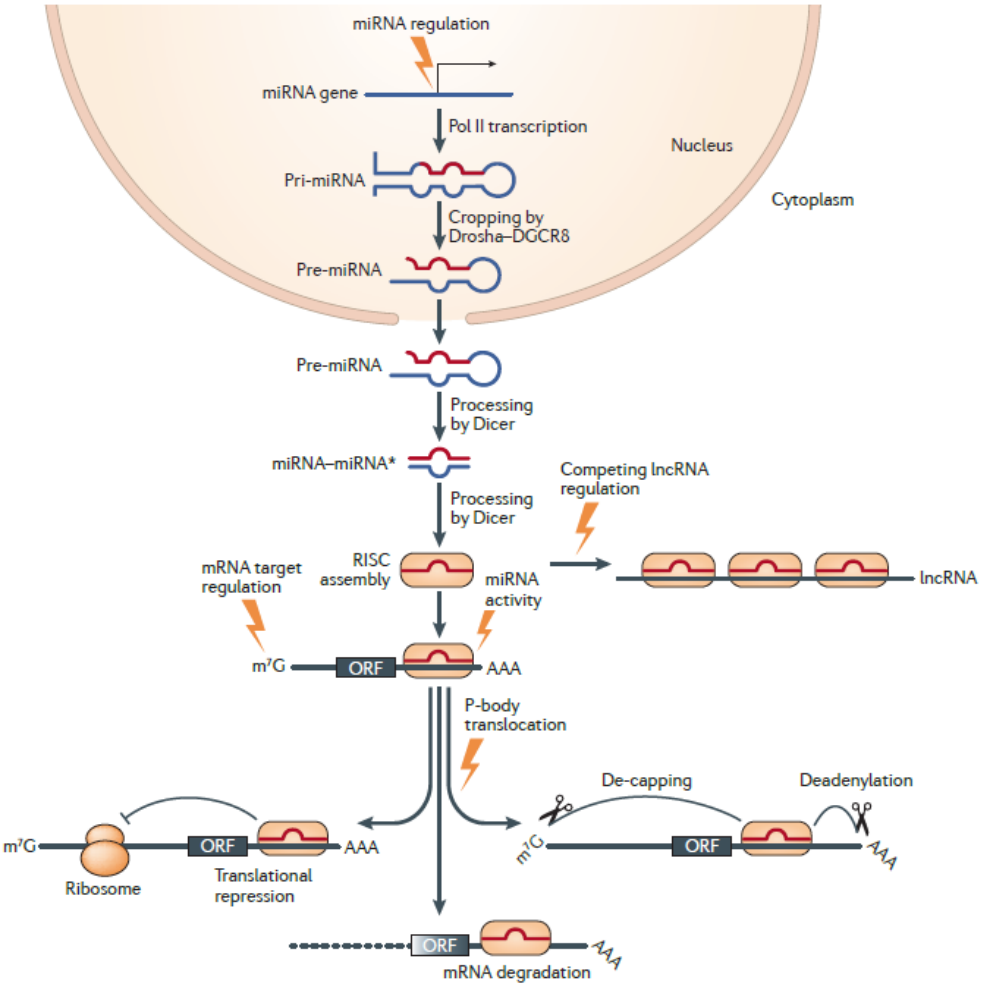

Figura 3. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs[13]

Los miRNAs en primer lugar son transcritos en el núcleo por la RNA polimerasa II, y se forma un tránscrito poliadenilado, este es un precursor del futuro miRNA funcional, y se conoce con el nombre de miRNA primario (pri-miRNA), que forma estructura de horquilla, que se escinde mediante un complejo formado por Drosha (RNAsa III endonucleasa) y DGCR8, constituyendo otro precursor, conocido como el pre-miRNA, que es una secuencia de unos 70 nucleótidos, que mantiene la estructura de horquilla mencionada anteriormente. Este pre-miRNA se exporta del núcleo al citoplasma, normalmente por la exportin 5, donde se procesa por el enzima Dicer (RNAsa III), y se forma un dúplex con dos cadenas de miRNA, ambas de una longitud de unos 22 nucleótidos. Estas dos cadenas del dúplex pueden actuar como miRNA funcionales, sin embargo solo una de ellas se incorpora al *RNA-induced silencing complex* (RISC). Cuando forma parte de este complejo, el miRNA es capaz de reconocer sus dianas, los mRNA, sobre los que actúa inhibiendo su traducción y por extensión reduciendo la expresión génica de determinados genes. Esto se logra a través de

la degradación de los mRNA, la represión transcripcional o la deadenilación o *de-capping* (**figuras 3-4**)[13].

Condiciones de estrés pueden influir en gran parte en la biogénesis de los miRNAs, provocando una disminución en su perfil de expresión. Por ello no actuarían inhibiendo diferentes mRNAs. Estos puntos donde influye el estrés se representan en la **figura 3** mediante rayos[13].

Origen de los genes que codifican para el miRNA:

Una gran parte del genoma humano da lugar a lo que se conocen como los ARN no codificantes (ncRNA), moléculas funcionales que cumplen acciones regulatorias, pero que no llegan a traducirse a proteínas[6]. Entre los diferentes tipos de ncRNAs se encuentran los miRNAs[6].

Como hemos mencionado, ya se han catalogado más de 2500 secuencias de miRNA en el genoma humano[6]. Muchos de estos miRNAs son de expresión específica de diferentes tejidos y tienen patrones de expresión que varían en función del estado del tejido o el momento del desarrollo en el que se encuentre[6]. Los genes que codifican para los miRNA tienen una longitud mayor a los miRNA funcionales.

Más del 50% de los miRNA son policistrónicos, es decir que son generados a partir de un mismo tránscrito o de un cluster de genes[6], en una misma secuencia del DNA se pueden encontrar codificados diferentes miRNA. Posteriormente se fragmenta esta secuencia y se obtienen los miRNA individuales y maduros[6].

En cuanto a la transcripción de los genes de miRNA, esta puede regularse por promotores específicos. Pueden encontrarse en intrones o de forma menos frecuente en las regiones no codificantes de los exones[6,14]. Los niveles relativos de los miRNA dentro del cluster están regulados por estímulos externos, como el desarrollo, la aparición de una patología o diferentes condiciones fisiológicas[6].

Las regiones de DNA que codifican para los miRNA en el genoma también pueden sufrir mutaciones[15], que al tener lugar pueden provocar diferentes enfermedades o problemas en el desarrollo. También pueden tener lugar mutaciones en los lugares de unión de los miRNA, especialmente en el extremo 3' UTR de los mRNA[15], y que de esta forma se pierda también la regulación que ejercen los miRNA.

Actuación de los miRNA sobre la regulación de otros genes:

Como se ha comentado de forma breve anteriormente, los miRNA ejercen su función regulando la expresión de los mRNA, ahora se va a exponer esto con un poco más de detalle (**figura 4**):

Las señales de estrés activan diferentes vías de señalización, que puede provocar el aumento o la disminución de los niveles de miRNA en la célula[16]. Los miRNA se unen específicamente a diferentes mRNAs y regulan negativamente su expresión, mediante su degradación o inhibiendo la traducción de ese mRNA. Pero también pueden jugar un papel aumentando la expresión de diferentes genes, al disminuir la expresión de sus inhibidores, o un patrón de una bajos niveles de miRNA específicos puede conllevar al aumento de mRNAs que estaban inhibidos[16]. Con estas situaciones se demuestra como los miRNAs están implicados en la regulación génica, regulando de forma directa la inhibición de mRNAs y provocando la traducción de otros miRNAs de forma indirecta[16].

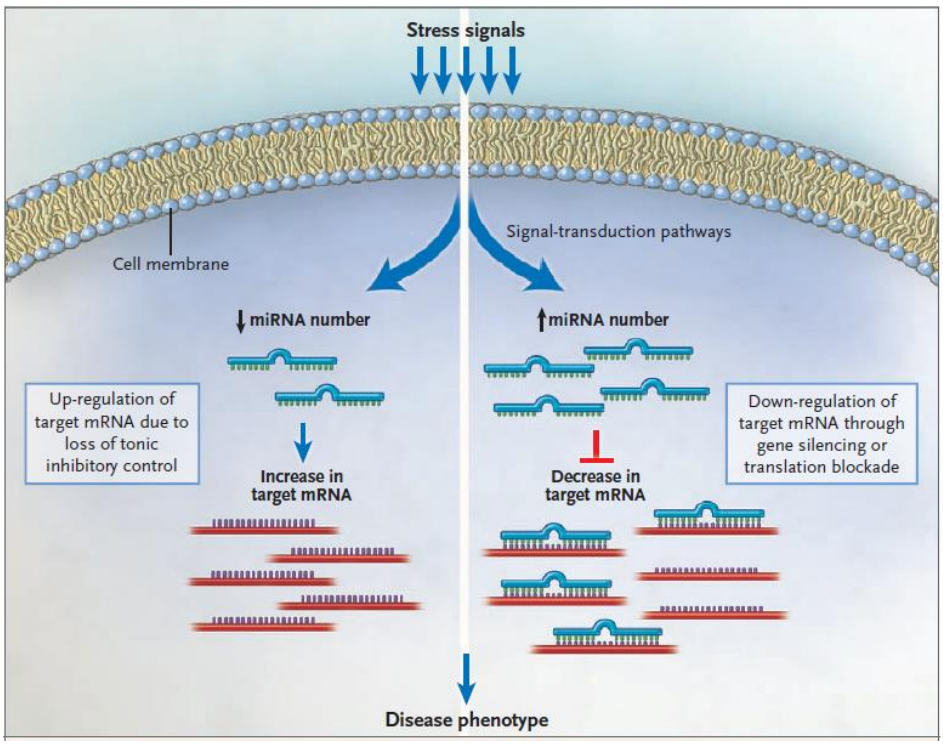

Figura 4. Regulación génica mediada por miRNAs[16]

Es importante recalcar que al tener un tamaño pequeño, los miRNAs pueden tener un gran nº de secuencias diana en diferentes mRNA, por tanto un mismo miRNA puede estar implicado en la regulación de un gran nº de proteínas y procesos. De la misma forma, un mRNA puede ser regulado por más de un miRNA.

Se debe tener en cuenta que cuando en este trabajo se hable de inhibición génica por miRNAs, se estará refiriendo a una inactivación de la expresión a nivel post-transcripcional, es decir, mediante los mecanismos por los cuales actúan los miRNA sobre los mRNAs.

1.3) miRNAs extracelulares y comunicación celular

Para salir de la célula y poder ejercer sus funciones en otros tejidos diferentes a donde se sintetizan, los pre-miRNAs y los miRNAs pueden incorporarse a exosomas, que se secretan cuando los cuerpos multivesiculares (MVB) se fusionan con la membrana plasmática[15]. También se pueden secretar al unirse a microvesículas, al asociarse con lipoproteínas de alta densidad (HDL) o al juntarse con proteínas de unión a RNA, como la NPM1 o la Ago2[15] (**figura 5**).

Los últimos estudios han propuesto que los miRNA también podrían salir de la célula por canales, aunque esto no se ha demostrado aún a día de hoy[15].

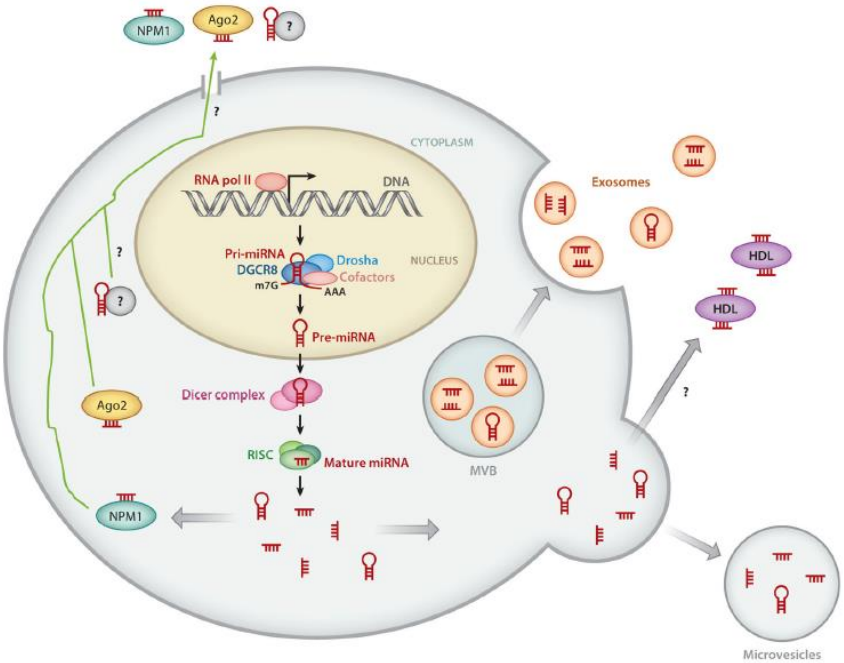

Figura 5. Representación de los diferentes mecanismos de excreción (o secreción) de los miRNA celulares[15]

Estos miRNAs circulantes pueden llevar a cabo funciones como mensajeros endocrinos o paracrinos en el sistema cardiovascular[9]. La estabilidad de los miRNAs circulantes, ha puesto de manifiesto la posibilidad de que estas moléculas tengan un importante papel como comunicadores intercelulares[9]. Existen diferentes modelos que explican la internalización de los miRNAs en los tejidos diana: el primero de ellos expone que las microvesículas que contienen miRNAs pueden ser captadas por fibroblastos mediante endocitosis, fusión de

membranas o fagocitosis[9]. La captación de miRNAs que no se encuentran en vesículas, como por ejemplo de los asociados a HDL, consistiría en la unión a receptores scavenger en las células diana[9].

En el contexto de la enfermedad Cardiovascular, diferentes estudios han propuesto que los miRNAs exógenos (que actúan en un tejido donde no han sido sintetizados) regulan la expresión génica de la misma forma que los miRNA endógenos. Esto confirma que los miRNA pueden ejercer sus funciones en un gran nº de tejidos sin importar que no se sinteticen en ellos. Por ejemplo, se observó como el suministro de miR-126 originado en células endoteliales transmitía señales paracrinas a las células vasculares receptoras, desencadenando así la producción de CXCL12, una citoquina que contrarresta la apoptosis y recluta a otras células progenitoras[17].

2) Objetivos

A lo largo de este trabajo de fin de grado se va a tratar, a partir de la bibliografía disponible, de alcanzar los siguientes objetivos:
La identificación de los principales miRNAs que están implicados en la disfunción cardiovascular, profundizando en los mecanismos de acción mediante los que actúan.
También es objetivo evaluar el posible papel de los miRNAs circulantes sobre la fisiopatología cardiovascular.
Finalmente se tratará de reflejar la importancia de los miRNA circulantes como instrumentos de diagnóstico, proponiendo diferentes perfiles como marcadores de patologías cardiovasculares.

3) Materiales y métodos

3.1) Estrategia de búsqueda

Búsqueda bibliográfica de artículos relacionados con el tema en las bases de datos on-line disponibles: *PubMed* Central y *PubMed*.
También se han buscado artículos las bases de datos *SCOPUS* y *science direct*, aunque en estos casos la aportación ha sido mínima, al repetirse mucha información de la ya seleccionada de *PubMed*.
Incluso se ha podido obtener información directamente de la revista *Circulation research*, una de las revistan más influyentes sobre la investigación de la fisiopatología cardíaca.

Primero se realizó una búsqueda más general para hacerse una idea de la situación actual del tema del trabajo, todo lo que se sabe de él a día de hoy. Se hacen búsquedas por las palabras claves, como microRNA y su relación con el sistema cardiovascular (**tablas 1-2**).
La estrategia consiste en ir acotando cada vez más la búsqueda e ir seleccionando y leyendo los artículos que parezcan de más utilidad para realizar el trabajo.
Se han aplicado los siguientes filtros:

- **Año de publicación:** a partir de 2012 (últimos 5 años)
- **Disponibilidad:** *full text available*

Además con la cuenta personal de PubMed, pude hacer que se me enviarán alertas mensuales con los artículos publicados durante ese tiempo que contuvieran las palabras clave "miRNA" AND "cardiovascular".

También hay que destacar que la bibliografía se almacena en el programa de citaciones *Mendeley*, que ha resultado muy útil a la hora de guardar referencias y organizar la bibliografía.

A continuación (**figura 6**) vemos el auge en las publicaciones sobre la relación del miRNA con el sistema cardiovascular:

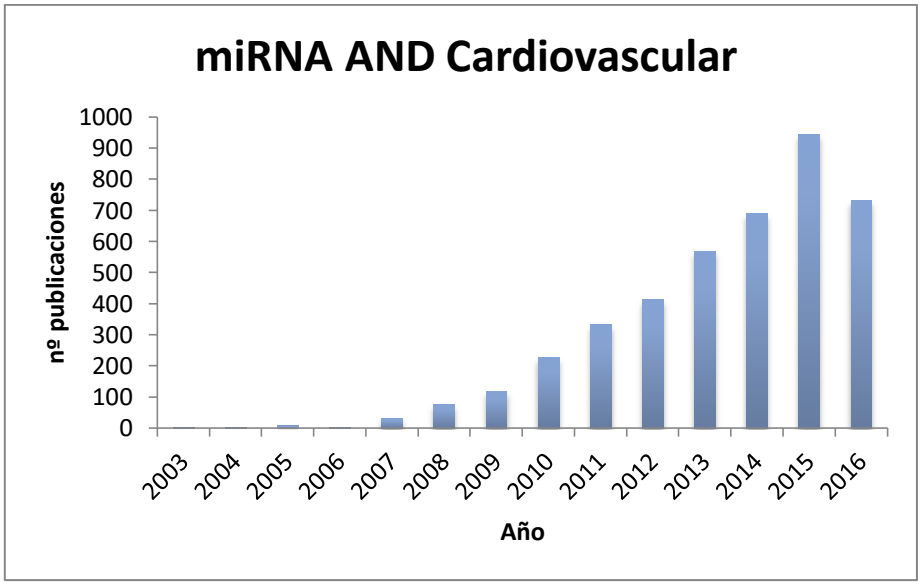

Figura 6. Número de publicaciones en función del año sobre los miRNA y su relación con el sistema cardiovascular, en la base de datos *PubMed*, desde el 2003 hasta el 2016.

También se han hecho búsquedas en función de autores que están relacionados con el tema, como la autora Eva van Rooij, una de las pioneras en las investigaciones que relacionaron los miRNA con la disfunción cardiovascular.

3.2) Selección de artículos

Atendiendo a la gran cantidad de artículos obtenidos mediante las búsquedas realizadas (**tablas 1-2**), es necesario seleccionar aquello que se consideren que más y mejor información pueden aportar al trabajo.
Para situarse en el tema e ir empezando con el trabajo, aquellos artículos que más se consultaron fueron correspondientes a *reviews*. Dentro de las *reviews* se encontraron también referencias útiles sobre artículos experimentales que también han contribuido al trabajo.

Después se aplicaron los siguientes criterios de selección: aquellos cuyo título se ajustara más a la búsqueda y a los intereses del trabajo y a continuación aquellos que leyendo el *abstract* se considerarán útiles.

Búsqueda	Nº de resultados
microRNA AND cardiovascular	14095
microRNA AND cardiovascular (últimos 5 años)	11717
microRNA AND cardiovascular (último año)	2290
microRNA AND cardiovascular (review)	9029

Tabla 1. Búsquedas realizadas y los resultados correspondientes obtenidos en la base de datos *PubMed Central* (PMC), a día 27/02/2017 para realizar una primera aproximación sobre el tema a estudiar.

Búsqueda	Nº de resultados
microRNA AND cardiovascular	4364
microRNA AND cardiovascular (últimos 5 años)	3448
microRNA AND cardiovascular (último año)	335
microRNA AND cardiovascular (review)	1111

Tabla 2. Búsquedas realizadas y resultados correspondientes obtenidos en la base de datos *PubMed*, a fecha de 27/02/2017

Gracias a este procedimiento de búsqueda se consiguieron seleccionar un total de 69 artículos, de los cuáles 48 de ellos fueron útiles para extraer la información que se ve reflejada en este trabajo, los restantes se descartaron al tener un contenido bastante similar a otros artículos empleados.

4) Resultados/Discusión

En este apartado se va a tratar transmitir como actúan los miRNA sobre el tejido cardíaco, se va ver cuáles son sus funciones en condiciones normales, y como la desregulación de estas moléculas influye en un gran número de enfermedades cardiovasculares, y aprovechando este conocimiento se van a proponer diferentes miRNA circulantes como biomarcadores.
Para concluir esta sección se describirá brevemente el uso de miRNAs para la terapia de enfermedades cardiovasculares.

4.1) miRNAs en la fisiopatología cardiovascular

4.1.1) miRNAs durante el desarrollo cardíaco, la fisiología y en cardiopatías congénitas

El corazón es el primer órgano que se desarrolla durante la embriogénesis de los vertebrados, y una disrupción en su formación desemboca en los que se conocen como desórdenes congenitos[18]. Experimentos con supresiones en genes que codifican para diferentes miRNAs resultan en la letalidad de los sujetos experimentales por defectos severos en el sistema cardiovascular[15], lo que pone de manifiesto que los miRNA son esenciales para el desarrollo cardíaco (**figura 7**).

Los miRNA expresados en el tejido cardíaco (actualmente ya se han descrito más de 200) contribuyen a la función normal o patológica del sistema cardiovascular, en particular durante el desarrollo regulan la proliferación, diferenciación y la conducción cardíaca[15] (**figura 7**), por ejemplo el miRNA-1 promueve la diferenciación de los cardiomiocitos, mientras que el miRNA-133 la inhibe[15]. Mediante este mecanismo los miRNA controlan lo que se conoce como hipertrofia fisiológica cardíaca[19]. También cabe destacar el papel del miRNA-208, que también regula la hipertrofia cardiaca, uniéndose a una proteína implicada en la vía de la señalización de la hormona tiroidea[20].

Hay muchos otros miRNA regulando el desarrollo cardíaco, sin embargo se ha demostrado que no todos son imprescindibles, ya que hay grupos de miRNA con funciones redundantes[15] o bien se activan mecanismos compensatorios *in vivo* ante el déficit de un miRNA con una específica[15].

A nivel post natal se ha observado un aumento en los niveles de miRNA-195 y miRNA-497 en ratones, que pueden estar implicados en la binucleación y la diferenciación de los cardiomiocitos[15], mientras que la familia del miRNA-15 reprime la expresión de diferentes reguladores del ciclo celular e inhibe la proliferación de los cardiomiocitos[15].

Además estudios han demostrado que incluso miRNA no expresados en el corazón pueden tener un efecto cardioespecífico, por ejemplo miRNA expresados en fibroblastos, células musculares lisas o células endoteliales[20]. Esto es gracias a los mecanismos de comunicación celular y el transporte característico de los miRNA[21]. En el músculo esquelético se expresa específicamente en miRNA-206, y también miRNA-1, miRNA-133a y miRNA-133b (aunque estos se expresan también en el tejido cardíaco), que son conocidos bajo el nombre de myomiRs[22] . Estos están implicados en la diferenciación, desarrollo y mantenimiento de las células musculares, tanto de músculo cardíaco como esquelético[22].

Recientemente se ha descrito que los miRNA tienen importancia en la recuperación del tejido cardíaco tras sufrir el infarto de miocardio (IM)[20].

Defectos congénitos

Diferentes defectos congénitos han sido relacionados con la expresión alterada de diferentes miRNAs[20]. Los corazones de pacientes con anormalidades congénitas tienen unos perfiles de expresión de miRNAs alterados, lo que puede afectar al desarrollo o función del sistema cardiovascular[20]. Por ejemplo en pacientes con Síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), presentan una sobreexpresión de miRNAs codificados en este gen, como son el miRNA-99a, let-7c, miRNA-125b-2, miRNA-155 y miRNA-802[20].

En el caso de la Tetralogía de Fallot, se ha encontrado que hasta 61 miRNA implicados en el desarrollo cardíaco se encuentran desregulados[20].

La desregulación de miRNA que en condiciones normales no tiene efectos importantes, pueden tener un grave impacto en el caso de que el individuo se encuentre en condiciones estresantes[20].

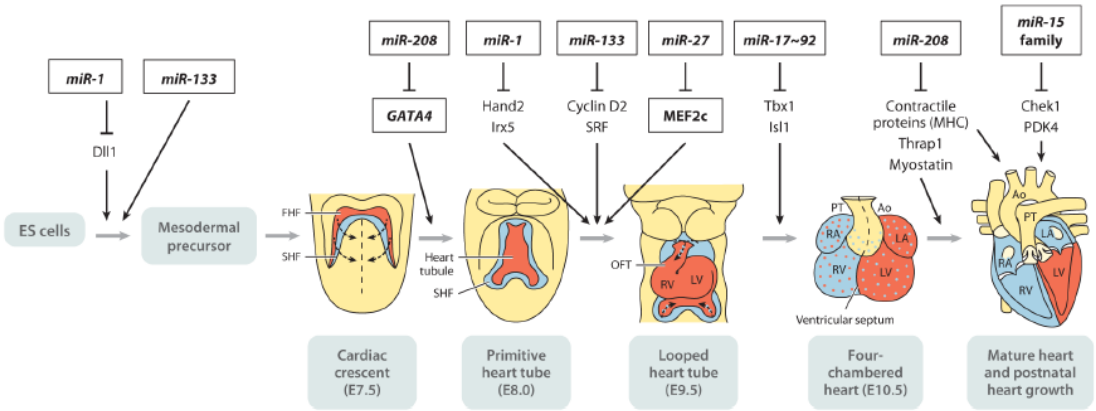

Figura 7. Representación del desarrollo cardíaco en ratones y los miRNAs implicados en su regulación[15].

4.1.2) miRNAs en el sistema vascular y la homeostasis endotelial

Se ha demostrado también que los miRNA tienen un papel clave en el control de la diferenciación y proliferación de las células musculares lisas y células de médula ósea, en la angiogénesis, la inflamación, la remodelación cardíaca, la vasculogenesis y en la función endotelial[6].

La formación del sistema vascular es un proceso muy complicado que requiere de la agrupación de angioblastos, que dan lugar a la vasculogenesis y a la angiogénesis[15]. Se define la angiogénesis, como el proceso mediante el cual se forman los vasos sanguíneos, y es un proceso muy importante para el desarrollo y la remodelación del sistema vascular. Es fisiológico, pero en condiciones puntuales, como en el desarrollo de los tumores, también puede llegar a ser patológico. Investigadores han demostrado como el miRNA-26 regula negativamente la angiogénesis al actuar sobre las BMPs (*bone morphogenic protein)* en células endoteliales[23], lo que afecta a la vía de señalización SMAD1 (vía implicada en la angiogénesis) [23]. Otro implicado es el miRNA-222**,** que se relaciona negativamente con el STAT5A[24] (molécula de transducción de señal que activa la transcripción de genes angiogénicos), lo que provoca que se pierda la formación de vasos sanguíneos.
En cambio hay otros miRNA que estimulan la angiogénesis, como es el caso del miRNA-210, que estimula la tubulogénesis[25] o del miRNA-130a[26], que estimula la formación de vasos sanguíneos al inhibir factores anti-angiogénicos como GAX o HOXA5[26].
También cabe destacar que el miRNA-126 (específico de las células endoteliales), estimula la señalización VEGF y activa la actividad de Ang-1[27], factor que provoca la estabilización y maduración de los vasos sanguíneos.

La homeostasis y la integridad de las células endoteliales son esenciales para la función correcta del sistema vascular[18] En la disfunción de las células endoteliales se ha descrito como la expresión de miRNA-10a contribuye a la regulación del estado pro-inflamatorio en regiones susceptibles a sufrir aterosclerosis[28], inhibiendo moléculas de adhesión pro-inflamatorias, como CAM-1 o E selectina[6,28]. De forma similar hay miRNA que controlan la inflamación vascular, actuando sobre la expresión de CAM-1 y E-selectina. Entre ellos se encuentran: miRNA-181, miRNA-126, miRNA-31 y miRNA-17-3p [6].

Finalmente, es importante destacar el caso del miRNA-145, se expresa en altos niveles en las células musculares lisas del sistema vascular (VSMC), regula el cambio de estado contráctil a secretor[6]. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG) regula la expresión del cluster miRNA-17-92, por lo que este miRNA tienen importancia sobre el proceso de angiogénesis[6].

4.2) Principales miRNAs implicados en la disfunción cardiovascular y su potencial papel como biomarcadores

Los miRNAs circulantes presentan muchas ventajas para convertirse en posibles biomarcadores para una amplia gama de enfermedades cardiovasculares. Entre estas ventajas encontramos que se pueden medir mediante técnicas no invasivas, un alto grado de especificidad y sensibilidad, tienen vida media elevada[6], las secuencias se conservan entre distintas especies (lo que hace más sencillo su estudio) , no se degradan con facilidad (son estables a temperatura ambiente y resisten a bajas temperaturas)[29,30] y se encuentran estables circulando en sangre[1]. A día de hoy los diagnósticos de enfermedades cardiovasculares dependen en gran medida de técnicas de imagen (RMN, TAC…), las cuáles no son cuantitativas. Con el estudio de los miRNA circulantes, este campo puede mejorar la sensibilidad y especificidad a la hora de diagnosticar este tipo de enfermedades[15]. Su detección en sangre se realiza gracias a la técnica conocida como microarray, que permite evaluar todos los miRNAs presentes en el plasma[31]. También se puede utilizar una PCR cuantitativa (qPCR) para determinar su distribución[32]. Cabe tener en cuenta que los miRNAs se ven afectados por fármacos de anticoagulación antiplaquetarios[6], por tanto se debe tomar en cuenta si el paciente toma este tipo de medicación cuando se le realice el análisis de miRNAs.

Otra ventaja es que los miRNA pueden ser detectados en las primeras horas de la manifestación del cuadro clínico, lo que facilita que se dé un rápido diagnóstico, además sus cambios a lo largo de la patología nos informan sobre la progresión de esta, por lo que también tienen utilidad de pronóstico[6].

Los miRNA extracelulares son detectables en un gran nº de fluidos corporales: plasma, suero, saliva, orina, lágrimas, líquido amniótico, calostro, leche materna, líquido seminal, fluido bronquial, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y líquido pleural[32]. Esto da una idea de la gran influencia que tienen los miRNA y en los múltiples tejidos donde actúan. Sin embargo las muestras que son de mayor utilidad para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares son las de plasma[33]. Muchos miRNAs tienen expresión tejido-específica, es por ello que para estudiarlos se ha requerido de mediciones de sus niveles de expresión en el tejido de origen, y no solo en el plasma[19].

La presencia en sangre de los miRNA en una situación patológica puede deberse tanto a que pueden estar implicados directamente en el desarrollo y progresión de la enfermedad o porque han sido secretados de la célula como consecuencia de la lesión en el tejido.

Entre las enfermedades que pueden ayudar a diagnosticar encontramos entre otras la insuficiencia cardiaca, el infarto de miocardio agudo, y cardiopatías asociadas a arterosclerosis y diabetes *mellitus*[6], y como pasaremos a ver a continuación, más que

seleccionar un solo tipo de miRNA como biomarcador, es de más utilidad tener en cuenta todo un conjunto de miRNA para diagnosticar la enfermedad.

Si bien es cierto, a día de hoy no se han estipulado unos rangos o valores de referencia que relacionen unos niveles específicos con la enfermedad, se ha observado que la simple presencia o ausencia de un determinado tipo de miRNA en sangre se relaciona directamente con las diferentes enfermedades cardiovasculares que pasaremos a exponer en este apartado. Pero también cabe mencionar que en los estudios epidemiológicos que se han realizado en este campo, los resultados obtenidos se suelen comparar con los niveles en individuos control, y es por eso que se habla de niveles aumentados o disminuidos de ciertos tipos de miRNA (en comparación al individuo control), y por ello en este trabajo también se utilizará esta terminología.
Este campo aún sigue en investigación y en un futuro cercano gracias a los estudios que están realizándose, se va a llegar a definir unos rangos de concentración de miRNA en sangre que va a aumentar la especificidad y la sensibilidad de este tipo de diagnósticos.

- ***Aterosclerosis***

La aterosclerosis es la enfermedad en la cual tiene lugar un estrechamiento en la luz de los vasos vasculares por la acumulación de placas de ateroma, y esto conduce a una gran multitud de enfermedades del sistema cardiovascular, como la cardiopatía isquémica[34].

Los miRNAs tienen un papel fundamental en la patogénesis de la aterosclerosis, pero antes de exponer su relevancia, cabe recordar que los macrófagos son los principales implicados en el desarrollo de esta condición, al formar las células espumosas (cargadas de colesterol) que componen la placa de ateroma. Los macrófagos se pueden dividir dos tipos, los primeros promueven la inflamación e inhiben la proliferación celular, mientras que los segundos promueven la proliferación celular, la reparación tisular y son antiinflamatorios[35]. La proporción de los dos fenotipos macrófagos afecta a la aparición de la aterosclerosis.

Una vez mencionado esto, pasamos a ver la implicación de los miRNA en esta patología. La disminución de la expresión de **miRNA-181b** en las células endoteliales del tejido adiposo blanco de ratones se ha relacionado con una predisposición a sufrir aterosclerosis[35]. Gracias al hallazgo de esta relación, estudios demostraron que la administración de **miRNA-181b** estimula la presencia de los macrófagos del fenotipo antiinflamatorio y reduce la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo[35]. El **miRNA-181b** también estimula la fosforilación y activación de AKT (proteína kinasa) en Ser473, lo que provoca una reducción de la disfunción endotelial y un menor riesgo aterogénico, y además el **miRNA-181b** inhibe la expresión de PHLPP2, proteína que desfosforila e inactiva AKT[35].

Sin embargo, el **miRNA-181b** no inhibe la capacidad migratoria y proliferativa de los macrófagos[34].

Por lo tanto, la disminución de **miRNA-181b** aumenta la inflamación vascular y acelera la aterogénesis, y por eso en este trabajo lo consideramos como un potencial biomarcador de esta enfermedad.

Los miRNA también están implicados en la regulación del metabolismo del colesterol, desde la biosíntesis a la captación y la excreción(o retirada de exceso)[6]. Esta regulación es otro mecanismo mediante el cual los miRNA están implicados en la aterosclerosis y todas las complicaciones que se derivan de estas[6]. En este contexto, otro miRNA que está implicado en la aterosclerosis es el **miRNA-33**, ya que inhibe la expresión del ABCA1, un importante transportador de colesterol presente en las HDL, cuya función es retirar el exceso de colesterol de los tejidos[28]. Este es un mecanismo que tienen las células para prevenir la formación de placas de ateroma. La función fisiológica de este miRNA asegura un nivel adecuado de colesterol en la célula cuando los niveles de colesterol disminuyen, al inhibir su transporte[28]. Sin embargo si la expresión del **miRNA-33** persiste, puede llegar a acumularse demasiado colesterol en las células y que se produzca una aterosclerosis[28]. Además este miRNA también está implicado en otras vías como la inflamación, la secreción biliar o la glucemia, teniendo un papel importante en la formación y desarrollo de esta patología[28]. También se ha visto implicado en la homeostasis lipídica el **miRNA-122**[6], de expresión hepática, y estudios han demostrado como su inhibición conlleva una bajada del nivel de colesterol total, y una mejora en la esteatosis hepática (hígado graso)[6].

El problema del **miRNA-33** es que también está presente en otras enfermedades cardiovasculares, como veremos a continuación, por lo que no se puede utilizar exclusivamente como diagnóstico de la aterosclerosis.

Para mejorar la especificidad del diagnóstico de la aterosclerosis, propongo usar la combinación de la medida de estos tres miRNAs. Niveles aumentados de **miRNA-33 y miRNA-122** y niveles disminuidos de **miRNA-181b** en sangre, respecto a individuos control, serían los marcadores de esta enfermedad.

- ***Infarto Agudo de miocardio (IAM)***

Es la necrosis del tejido cardíaco por falta de riego sanguíneo debido a una obstrucción en los vasos sanguíneos coronarios[36]. Se trata de la patología coronaria con mayor morbimortalidad[1], y por tanto la más preocupante. Un diagnóstico preciso y precoz es esencial para el control de la enfermedad[1]. Por ello se investigan biomarcadores eficaces para diagnosticar la afección.

El infarto agudo de miocardio se caracteriza por una muerte súbita de las células cardíacas, lo que provoca la salida al medio extracelular de diferentes componentes celulares, entre los que hallamos diferentes miRNAs, que podrían ser usados como biomarcadores de la enfermedad (el principal biomarcador que se utiliza ahora es la troponina).

El **miRNA-208** específico de las células cardíacas, se codifica por un intron del gen α-MHC. Estudios han confirmado que está involucrado en la hipertrofia de los cardiomiocitos, la fibrosis y la expresión del gen β-MHC en respuesta al estrés[37].
En diferentes investigaciones, en las que se indujo una lesión del miocardio, se observó cómo durante las primeras horas tras el infarto, los niveles del **miRNA-208** aumentaban[38]. Incluso se observó una correlación entre los niveles plasmáticos de **miRNA-208** y de troponina cardíaca[38], el mejor marcador para el IAM actualmente. Esta molécula es detectable en el plasma entra la 1ª y la 4ª hora tras sufrir el IAM[6]
En estudios realizados en humanos, mediante análisis realizados con microarrays, ya se ha visto como pacientes que han sufrido un IAM tienen elevados niveles de **miRNA-208** en sangre[39].

Gracias a estos resultados podríamos considerar al **miRNA-208** como un buen biomarcador, sensible y específico, para el diagnóstico de IAM.

Otro miRNA relacionado con el IAM **miRNA-499** , del que se observó un incremento en sus niveles plasmáticos en la fase aguda de un IAM (período de 48h tras el inicio del dolor en el pecho)[1]. Tras este tiempo sus concentraciones son prácticamente indetectables, lo que puede suponer una limitación. Niveles de **miRNA-1** también se incrementan rápidamente después del IAM, llegando a una concentración máxima a las 6h, y se mantienen en sangre, hasta volver a sus niveles basales, hasta 3 días después de la lesión[1].
Estudios sugieren que en pacientes de IAM, los niveles de **miRNA-133a** en la circulación coronaria se encuentran aumentados[1].

Otros candidatos son los miRNA-21, miRNA-126, miRNA-146a, miRNA-30a y miRNA-195[1], que podrían complementar el diagnóstico, sin embargo de estos no se ha observado una implicación muy relevante en la enfermedad[1].

Se puede concluir que la combinación de cuatro perfiles principales de **miRNAs (miRNA-208, miRNA-499, miRNA-1 y miRNA-133)** son unos buenos marcadores para detectar el IAM. Para realizar un diagnóstico preciso es mejor mirar los niveles en sangre de los cuatro tipos, y no tan solo de un tipo.
También hay que remarcar que todavía existen limitaciones. Los miRNA-499, **miRNA-1** y **miRNA-133** no pueden utilizarse como biomarcador del IAM por si solos, ya que investigaciones han determinado que en lesiones del músculo esquelético también se elevan

los niveles de estos miRNA[39], perdiendo así especificidad para diagnosticar el IAM, en cambio el miRNA-208 sí que es específico del tejido cardíaco[1].
También se debe tener en cuenta la dificultad que puede tener determinar los niveles de los miRNA.

- ***Insuficiencia cardíaca (IC)***

En esta patología el corazón es incapaz de bombear sangre de forma correcta para satisfacer las necesidades del organismo[40].
A día de hoy no se ha descrito ningún miRNA específico para la insuficiencia cardíaca, sin embargo, se han observado en pacientes con insuficiencia cardíaca perfiles de miRNA característicos que están implicados en la patología y pueden ser útiles para el diagnóstico.
El **miRNA-423-5p** presenta valores altos en aquellas personas que padecen IC[1], y permite distinguirlos de personas sanas y pacientes con disneas[1]. Por tanto se considera como un potencial biomarcador para esta enfermedad.
También se han descrito otros potenciales candidatos para el diagnóstico de la IC, aunque de menor especificidad que el mencionado. Se trata de los **miRNA-126** y **miRNA-499[1].** Los niveles de **miRNA-499** se encuentran elevados en plasma en la fase aguda de la IC[41], en cambio los de **miRNA-126** disminuyen al sufrir una IC[42]. Aunque como se ha mencionado estos 2 miRNAs no son demasiado específicos para el diagnóstico de IC ya que se han visto relacionados también con otras enfermedades, como es el caso del **miRNA-499** y el IAM, y se necesita profundizar en su investigación para considerarlos marcadores fiables para el IC[1].
Los estudios recientes están estudiando la posible relación de la insuficiencia cardíaca con los siguientes miRNA: **miR-519e, miR-520d, miR-1231, miR-200b, miR-622** y **miR-1228[6].** Hay evidencia de que estos miRNA se encuentran elevados en la IC y se relacionan además con el péptido natriurético tipo B o cerebral (BNP) [6], principal marcador de la IC.

También se observó que los perfiles de miRNA circulantes en enfermos con insuficiencia cardíaca podían ser de utilidad para ver como respondían a la terapia. Y es que los niveles de **miR-26b-5p, miR-145-5p, miR-92a-3p, miR-30e-5p** y **miR-29a-3p** se encuentran elevados en los pacientes que se recuperan favorablemente de la patología, gracias a la terapia de re-sincronización cardíaca[1].
De esto se puede concluir también que los miRNA circulantes están implicados en la recuperación de las funciones cardíacas[1].

- ***Hipertensión***

Se he propuesto que los miRNA también pueden tener un rol regulando la presión sanguínea. Se ha observado el aumento de los niveles de **miRNA-42, miRNA181a, miRNA-210, y miRNA-505** en pacientes con hipertensión[31], comparados con individuos control,

postulándose estas variantes como biomarcadores de la hipertensión. El que presenta más especificidad y puede ser considerado como mejor biomarcador es el **miRNA-505,** ya que también se han observado niveles elevados de este tipo tanto en pacientes pre-hipertensos como hipertensos[31].

Pero también es interesante el caso del **miRNA-181a,** que actúa en el riñón, mediante la regulación negativa (*downregulation*) de cuatro vías mitocondriales y la estimulación (*upregulation*) de 41 cascadas de señalización implicadas en la inmunidad adaptativa y la inflamación[43], y es por este motivo que el **miRNA-181a** renal ejerce múltiples efectos en vías relevantes para la regulación y el aumento de la presión sanguínea (tanto sistólica como diastólica) y por tanto los niveles circulantes de **miRNA-181a** son a la vez un indicador de la expresión renal **miRNA-181a** y un potencial biomarcador de la hipertensión arterial[43].
También cabe destacar que este miRNA se une a la región 3'UTR del gen de la renina, y provoca la inhibición de la expresión de este gen[43], pero solo se une a aquellos genes de renina que codifican para proteínas que no son secretadas a la circulación[43] y por tanto no tienen función sobre la presión arterial. Por esta razón el miRNA se relaciona con la presión sanguínea independientemente de la renina.

- ***Hipertrofia cardíaca patológica***

Aumento del tamaño del corazón en respuesta a enfermedades cardiovasculares[18]. A menudo pueden llegar a provocar una insuficiencia cardíaca[18].
Hasta 3 miRNA circulantes se han considerado relacionados con la hipertrofia cardíaca patológica, estos son el **miRNA-199a-5p, miRNA-27a, miRNA-29a**[6,44] y el **miRNA-195**[18]**.**
Especialmente destaca el caso demo **miRNA-195**, ya que en ratones se ha observado cómo se une específicamente a la proteína MO25, importante componente de la señalización de AMPK, vía que está implicada en el desarrollo de la hipertrofia y de la insuficiencia cardíaca[18].
Referente al **miRNA29a**[44], hay que comentar que su presencia elevada en la circulación se asocia significantemente tanto a la hipertrofia como a la fibrosis cardíaca[44].
Por tanto se postula el aumento o la presencia en sangre de estos 3 miRNA como un potencial biomarcador de la hipertrofia cardíaca patológica.

- ***Fibrosis cardíaca***

La fibrosis cardíaca es el proceso mediante el cual se originan depósitos (o deposiciones) nocivas de proteínas de la matriz extracelular en el miocardio, lo que conduce a una rigidez ventricular y disfunción contráctil, condiciones que contribuyen a la aparición y desarrollo de la insuficiencia cardíaca en diversas condiciones patológicas[18].

Se ha demostrado como este proceso está altamente influido y regulado por diferentes miRNA: **miRNA-21** se encuentra sobreexpresado en los fibroblastos cardíacos, en respuesta al estrés (por ejemplo en una situación de insuficiencia cardíaca), y actúa reprimiendo a *Spry1*, aumentando la señalización de PK y la vía de MMP-2, al inhibir PTEN. Todas estas situaciones provocan proliferación y fibrosis de los fibroblastos[18].
Como hemos mencionado en el apartado anterior, también existe correlación entre el **miRNA-29a** y la fibrosis cardíaca.
Por tanto, ante la elevada producción de **miRNA-21** en el tejido cardíaco en esta situación patológica, lo veo como un buen marcador para la enfermedad, ya que con seguridad, se verá la presencia de este miRNA en sangre, o su elevación respecto a individuos sanos. También es indicador de esta patología el **miRNA-29a** en sangre.

- ***Arritmias***

Las arritmias son deterioros en la función de bombeo del corazón, en las cuáles la actividad eléctrica del corazón se torna inestable e irregular[18]. Se producen a consecuencia de la remodelación del corazón posterior a una insuficiencia cardíaca o a una isquemia en el tejido cardíaco (que conllevan a una pérdida de tejido)[18].
Se ha determinado la influencia de los **miRNA-1** y **133** (presentes en músculo cardíaco)[45], en el proceso del desarrollo cardíaco, y se encuentran en niveles especialmente elevados en la lesión isquémica cardíaca. Esta sobreexpresión de estos tipos de miRNA conduce a una ralentización y despolarización, al reprimir la traducción de *KCNJ2* (encargado de expresar el canal de K+ en el complejo Kir2.1) y *GJA1* (que codifica para la conexina 43, una proteína "gap junction") [18], promoviendo la aparición de arritmias. La conexina 43 es objetivo de **miRNA130a**[18], y la sobreexpresión de este miRNA contribuye a la patogénesis de las arritmias atrial y ventricular.
También se ha descrito como los miRNA pertenecientes al cluster del **miRNA-17-92 (miRNA-17, miRNA-18a, miRNA-19a/b, miRNA-20a, miRNA-92a)**[46] y del cluster **miRNA-106b-25 (miRNA-106b, miRNA-93 y miRNA-25)**[46] se regulan positivamente por Pitx2[47], un factor de transcripción implicado en el desarrollo cardíaco. Un déficit de estos **miRNA** (por alteraciones en los niveles de Pitx2), se traduce en una fibrilación auricular[47], una de las arritmias más comunes.

Otros autores pusieron de manifiesto como una reducción de los niveles de **miRNA-150** en las plaquetas estaba relacionada con la aparición de la fibrilación auricular en pacientes que habían sufrido previamente una insuficiencia cardiaca sistólica[18].

Por los motivos expuestos creo que unos biomarcadores específicos para detectar las arritmias serían tanto la elevación del **miRNA-1** y **miRNA-133** como la disminución del

miRNA-150 y de los miRNA pertenecientes a los clusters de los **miRNA-17-92** y **miRNA-160b-25.**

- ***Complicaciones cardiovasculares asociadas a la diabetes***

Los pacientes diabéticos tienen un alto riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado recientemente que la hiperglicemia aumenta la expresión de **miRNA-1** y **miRNA-133** en células progenitoras (célula madre unipotente), lo que se asocia con la supresión de *KCNE1* y *KCNQ1*[18], genes que codifican para un canal de potasio (IKs), presente en el tejido cardíaco e implicado en mantener el potencial de acción cardíaco y por ende la contracción del corazón. Estos defectos se traducen en alteraciones del ritmo cardíaco como por ejemplo una arritmia o la fibrilación auricular.
Alteraciones en otros perfiles de miRNA también afectan a la progresión de complicaciones cardiovasculares derivadas de la diabetes[34]. Por ejemplo, estudios epidemiológicos han demostrado que el **miRNA126** circulante (que es una molécula implicada en la angiogénesis y confiere protección vascular) de pacientes diabéticos tipo 2 con enfermedad coronaria se encontraba en niveles disminuidos[34], al compararse con individuos sanos[34].
Además la alteración de los niveles miRNA se relaciona con la disfunción endotelial, la disfunción de las células β pancreáticas y células musculares lisas, la activación de macrófagos y el metabolismo lipídico en la diabetes[34].
Así se demuestra el rol de los miRNA sobre la patogénesis asociada a las complicaciones diabéticas[34], y gracias a estos estudios podemos determinar como la medición en sangre de pacientes diabéticos de **miRNA-1**,**miRNA-133** (presencia o valores aumentados) y **miRNA-126** (ausencia o valores disminuidos), pueden utilizarse como biomarcadores de complicaciones cardiovasculares derivadas de una diabetes.

- ***Miocarditis viral (VM)***

Esta enfermedad se define como inflamación del miocardio, causada por infecciones virales, reacciones inmunes post-infección o reacciones autoinmunes[1].
Los niveles en circulación de **miRNA-208b** y **miRNA-499** se elevan en la fase aguda de la VM[1].
Pero como ocurre con casos anteriores, estos miRNA no se relacionan exclusivamente con esta patología, también presentan niveles elevados en pacientes con IAM o IC,[1].
En este caso la presencia en plasma de niveles elevados **miRNA-208b** y **miRNA-499** se puede relacionar con la miocarditis viral, pero también con otras diversas patologías cardiovasculares, por lo que harían falta otras pruebas complementarias para diagnosticar específicamente esta patología[1].

A continuación, en la siguiente página, se presenta una tabla con los potenciales miRNA que podrían ser usados como biomarcadores, según los conocimientos adquiridos en el trabajo:

Patología	MiRNAs circulantes	Efectos patológicos
Aterosclerosis	↑miRNA-33 ↑miRNA-122 ↓miRNA-181b	Inhibición transportador ABCA1, acumulación de colesterol e inflamación vascular
Infarto agudo de miocardio	↑ miRNA-1 ↑ miRNA-133 ↑ miRNA-208 ↑ miRNA-499	Hipertrofia cardiomiocitos, fibrosis, disfunción músculo cardíaco
Insuficiencia cardíaca	↑ miRNA-126 ↑ miRNA-423-5p ↑ miRNA-429	Gran especificidad, relación con BNP
Hipertensión	↑miRNA-42 ↑ miRNA-181a ↑ miRNA-210 ↑ miRNA-505	Aumento de la presión sanguínea También para pre-hipertensión
Hipertrofia cardíaca patológica	↑ miRNA-27a ↑ miRNA-29a ↑ miRNA-195 ↑ miRNA-199a-5p	Activación vía AMPK, cambio tamaño cardiomiocitos
Fibrosis cardíaca	↑ miRNA-21 ↑ miRNA-29a	Proliferación y fibrosis de los fibroblastos
Arritmias	↑miRNA-1 ↑miRNA-133 ↓miRNA-17-92* ↓miRNA-106b-25* ↓ miRNA-150	Despolarización , defectos en desarrollo que provocan fibrilación auricular
Complicaciones asociadas a diabetes	↑miRNA-1 ↑miRNA-133 ↓miRNA-126	Arritmias, fibrilación auricular Pérdida protección vascular
Miocarditis viral	↑ miRNA-208b ↑ miRNA-499	Presentes en la fase aguda

Tabla 3. Propuesta de diferentes perfiles de miRNAs como biomarcadores de diferentes patologías cardiovasculares, y una breve mención sobre su implicación en la enfermedad.

Se indica el uso del marcador según sus niveles se encuentren elevados o disminuidos, respecto a un control sano. Aunque en algunos casos también su mera presencia en el

plasma puede usarse como biomarcador. La detección se realiza en muestras de plasma mediante microarrays. El símbolo * indica clusters de genes.

4.3) miRNAs como terapia

Como hemos visto a lo largo de este trabajo los miRNA tienen gran importancia en la aparición y desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares, es por ese motivo que uno de los objetivos actuales de las investigaciones es usar a estas moléculas como dianas terapéuticas[48]. Como veremos a continuación estos fármacos se basan tanto en aumentar como disminuir la presencia de miRNA, gracias a la administración de moléculas análogas o inhibidoras (**figura 8**).

El principal reto de estas terapias es ser lo más específicas posible, ya que como un mismo miRNA puede interactuar con diversos mRNA y viceversa, por lo que su administración puede conllevar la alteración de diferentes funciones celulares[18].

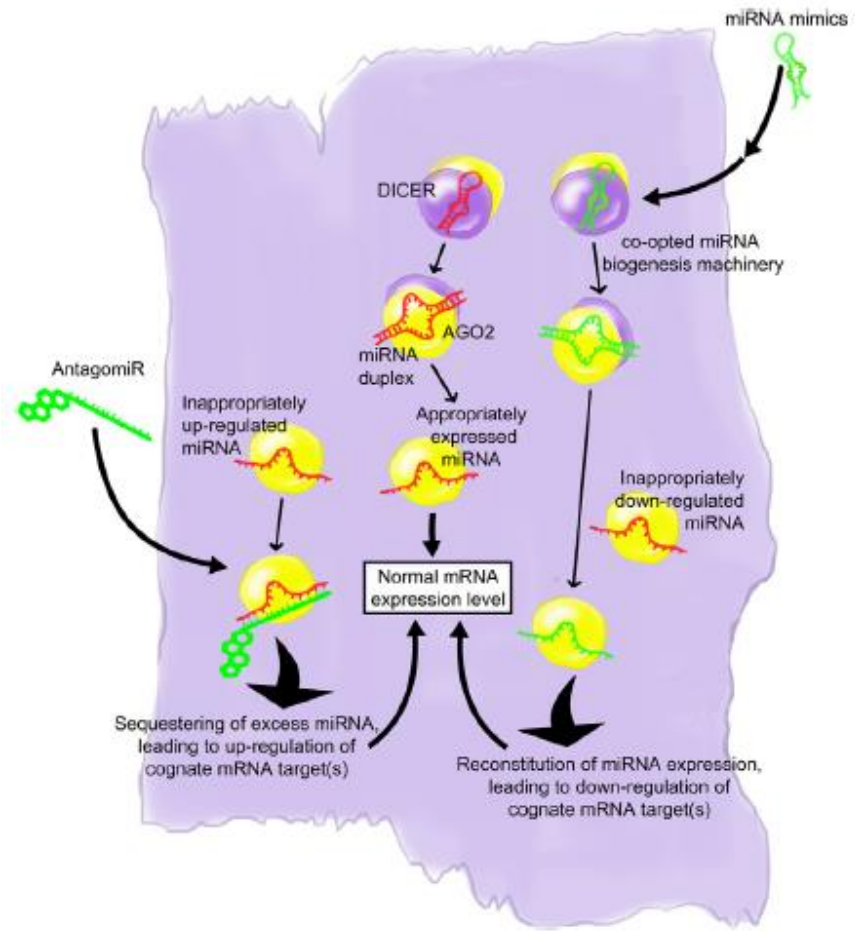

Figura 8. Principales estrategias terapéuticas basadas en miRNAs[6]

Se han desarrollado dos aproximaciones para utilizar los miRNAs como terapia[6]:

1) El uso de Anti-miRNAs o AntagomiRs (inhibidores de miRNAs) para **disminuir** los niveles de miRNAs que se encuentren sobre expresados en una situación patológica[6].
2) El uso de miRNAs "*mimics*" para **aumentar** los niveles de miRNAs que se encuentren en baja expresión en una situación patológica[6].

Por tanto la terapia consistiría en modular los niveles de miRNAs celulares, incrementándolos o disminuyéndolos, según el tipo y la situación.

Actualmente no hay ningún fármaco basados en estos mecanismos que se aplique en la clínica, pero algunos de ellos ya están en ensayos clínicos, en las fases I y II , y el futuro parece favorable[6].

5) Conclusiones

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en todo el mundo, por ello es un campo donde se realizan un gran número de investigaciones y donde los avances en materias de diagnóstico y terapia son de gran importancia, al tener impacto sobre la salud de muchas personas. El descubrimiento y estudio de los miRNA demostró cómo estas secuencias cortas no codificantes de nucleótidos actuaban en la regulación de la expresión génica y estaban implicadas en los procesos de desarrollo de órganos y de diferentes patologías, donde destaca su implicación en la fisiopatología cardiovascular.
Se ha visto como la expresión de estos miRNA está sujeta a la señalización de diversos factores de crecimiento y a señales ambientales, y que la desregulación de la expresión de estas moléculas, tanto por déficit como por sobreexpresión tiene efectos importantes sobre la aparición de defectos en el desarrollo del sistema cardiovascular y en la aparición de diversas enfermedades. Es por este motivo que se han propuesto los miRNA como un potencial biomarcador para las enfermedades cardiovasculares, ya que se pueden detectar y analizar en el plasma sanguíneo tanto los miRNA que son responsables de la aparición de la patología, como aquellos que han sido secretados a la sangre a causa de una lesión en el tejido. Se crean perfiles de excreción característicos de cada enfermedad. En este trabajo se han realizado propuestas seleccionando aquellos miRNA que se han considerados de mayor especificidad para diferentes patologías, poniendo así de manifiesto la relevancia de estas moléculas.
Por otra parte también están siendo estudiados como terapia para tratar enfermedades cardiovasculares, ya que se ha visto que es posible la regulación de múltiples procesos.

Las perspectivas para llegar a utilizar estas moléculas en futuras pruebas de diagnóstico parece favorable, sin embargo aún quedan numerosos retos a superar y es por ello que me esperanza el gran número de investigaciones que hay en activo en este campo.

6) Bibliografía

1. Wang, F., Chen, C. & Wang, D. Circulating microRNAs in cardiovascular diseases: from biomarkers to therapeutic targets. *Front. Med.* **8,** 404–418 (2014).
2. Figure 3 : Non-coding RNA genes and the modern RNA world : Nature Reviews Genetics. Available at: http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n12/fig_tab/nrg1201-919a_F3.html. (Accessed: 1st June 2017)
3. OMS | Las 10 principales causas de defunción. *WHO* (2017).
4. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75,** 843–54 (1993).
5. Ruvkun, G. MOLECULAR BIOLOGY: Glimpses of a Tiny RNA World. *Science (80-.).* **294,** 797–799 (2001).
6. Condorelli, G., Latronico, M. V. G. & Cavarretta, E. microRNAs in Cardiovascular Diseases: current knowledge and road ahead. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63,** 2177–2187 (2014).
7. Press Release: The 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine. (2010). Available at: https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/press.html. (Accessed: 21st April 2017)
8. Lawrie, C. H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **141,** 672–675 (2008).
9. Collection, S. The biology of miRNAs in cardiovascular disease. **8,** 583–592 (2016).
10. Ambros, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9,** 277–9 (2003).
11. Zou, Q., Mao, Y., Hu, L., Wu, Y. & Ji, Z. miRClassify: An advanced web server for miRNA family classification and annotation. *Comput. Biol. Med.* **45,** 157–160 (2014).
12. Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A. & Enright, A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* **34,** D140-4 (2006).
13. van Rooij, E. & Olson, E. N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11,** 860–872 (2012).
14. Bartel, D. P. *et al.* MicroRNAs. *Cell* **116,** 281–297 (2004).
15. Hata, A. Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **75,** 69–93 (2013).
16. Mann, D. L. MicroRNAs and the Failing Heart. *N. Engl. J. Med.* **356,** 2644–2645 (2007).
17. Zernecke, A. *et al.* Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Sci. Signal.* **2,** ra81-ra81 (2009).
18. Joladarashi, D., Thandavarayan, R., Babu, S. & Krishnamurthy, P. Small Engine, Big Power: MicroRNAs as Regulators of Cardiac Diseases and Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **15,** 15891–15911 (2014).
19. Oliveira Carvalho, V. *et al.* Artículo de Revisión MicroRNAs: ¿Un Nuevo Paradigma en el Tratamiento y Diagnóstico de la Insuficiencia Cardíaca? (2011).
20. Tian, J., An, X. & Niu, L. Role of microRNAs in cardiac development and disease. *Exp. Ther. Med.* **13,** 3–8 (2017).
21. Chen, J. & Wang, D. miRNAs in cardiovascular developement. **52,** 949–957 (2013).
22. Mitchelson, K. R. & Qin, W.-Y. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J. Biol. Chem.* **6,** 162–208 (2015).
23. Icli, B. *et al.* MicroRNA-26a Regulates Pathological and Physiological Angiogenesis by Targeting BMP/SMAD1 Signaling. *Circ. Res.* **113,** 1231–1241 (2013).

24. Dentelli, P. *et al.* microRNA-222 Controls Neovascularization by Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription 5A Expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30,** 1562–1568 (2010).
25. Fasanaro, P. *et al.* MicroRNA-210 Modulates Endothelial Cell Response to Hypoxia and Inhibits the Receptor Tyrosine Kinase Ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* **283,** 15878–15883 (2008).
26. Chen, Y. & Gorski, D. H. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* **111,** 1217–1226 (2007).
27. Sessa, R. *et al.* The miR-126 regulates Angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85β. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823,** 1925–1935 (2012).
28. Madrigal-Matute, J., Rotllan, N., Aranda, J. F. & Fernández-Hernando, C. MicroRNAs and Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **15,** 322 (2013).
29. Tsui, N. B. Y., Ng, E. K. O. & Lo, Y. M. D. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin. Chem.* **48,** 1647–53 (2002).
30. Chen, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* **18,** 997–1006 (2008).
31. Romaine, S. P., Charchar, F. J., Samani, N. J. & Tomaszewski, M. Circulating microRNAs and hypertension—from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk. *Curr. Opin. Pharmacol.* **27,** 1–7 (2016).
32. Weber, J. A. *et al.* The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. (2010). doi:10.1373/clinchem.2010.147405
33. Kappel, A. & Keller, A. miRNA assays in the clinical laboratory: workflow, detection technologies and automation aspects. *Clin. Chem. Lab. Med.* **55,** 636–647 (2017).
34. Ding, Y., Sun, X. & Shan, P.-F. MicroRNAs and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Biomed Res. Int.* **2017,** 4080364 (2017).
35. Sun, X. *et al.* MicroRNA-181b Improves Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity by Regulating Endothelial Function in White Adipose TissueNovelty and Significance. *Circ. Res.* **118,** 810–821 (2016).
36. Fundación española del corazón. Infarto de miocardio. (2015). Available at: http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/infarto.html. (Accessed: 1st May 2017)
37. van Rooij, E. *et al.* Control of Stress-Dependent Cardiac Growth and Gene Expression by a MicroRNA. *Science (80-.).* **316,** 575–579 (2007).
38. Ji, X. *et al.* Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clin. Chem.* **55,** 1944–1949 (2009).
39. Wang, G.-K. *et al.* Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.* **31,** 659–666 (2010).
40. Fundación española del corazón. Insuficiencia cardiaca. (2015). Available at: http://www.fundaciondelcorazon.com/informacion-para-pacientes/enfermedades-cardiovasculares/insuficiencia-cardiaca.html. (Accessed: 1st May 2017)
41. Corsten, M. F. *et al.* Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **3,** 499–506 (2010).
42. Fukushima, Y., Nakanishi, M., Nonogi, H., Goto, Y. & Iwai, N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ. J.* **75,** 336–40 (2011).
43. Marques, F. Z. *et al.* Signatures of miR-181a on renal transcriptome and blood pressure. *Mol. Med.* **21,** 739 (2015).
44. Roncarati, R. *et al.* Circulating miR-29a, Among Other Up-Regulated MicroRNAs, Is the Only Biomarker for Both Hypertrophy and Fibrosis in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63,** 920–927 (2014).
45. He, B. *et al.* Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *J. Biomed. Sci.* **18,** 22 (2011).

46. Tan, W., Li, Y., Lim, S.-G. & Tan, T. M. C. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **20,** 5962–72 (2014).
47. Wang, J. *et al.* Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111,** 9181–9186 (2014).
48. Van Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol Med* **6,** 851–864 (2014).