



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Identificació dels microRNAs responsables de la recuperació funcional després de patir un ictus isquèmic.

Maria Antònia Caro Miró

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2015-16

DNI de l'alumne: 43213001A

Treball tutelat per Dr. Cristòfol Vives Bauzà
Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa)

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:

Ictus isquèmic, etiologia criptogènica, microRNA, biomarcador, pronòstic, recuperació funcional, grup control, grup problema.

Resum

L'ictus és una de les primeres causes de dependència i discapacitat en el nostre país i en el món. Una mala recuperació de la lesió isquèmica s'associa a un deteriorament neurològic. En aquesta recuperació hi intervenen diversos processos fisiològics: és necessària una revascularització de la regió afectada que aportï oxigen i factors tròfics, l'angiogènesi; per altra banda, també s'ha d'activar la neurogènesi, la neuritogènesi i la sinaptogènesi per tal de recuperar el teixit neuronal danyat amb noves cèl·lules, projeccions neuronals i interaccions neuronals. Tots aquests processos estan àmpliament regulats per l'activació-inhibició de diversos gens. A la vegada, els microRNAs, per la seva implicació en la regulació de l'expressió gènica, participarien en el control de tots els processos esmentats.

En aquest estudi s'analitzaren els perfils d'expressió de microRNAs (miRNAs) de mostres de sang perifèrica de pacients que havien patit un ictus d'etiologia criptogènica als quals se'ls havia otorgat un valor de pronòstic funcional als tres mesos d'haver patit l'ictus segons la *Modified Rankin Scale* (mRS) que permetia separar-los amb dos grups: grup control (*good-outcome*) i grup problema (*bad-outcome*).

Els nivells d'expressió dels miRNAs es determinaren utilitzant el *Chip Affymetrix miRNA 3.0*, el qual analitza 1733 microRNAs humans a més d'altres molècules petites de RNA, tals com *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) i *non-coding RNAs* (ncRNAs).

Posteriorment, es compararen els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients control als 0 mesos envers els dels pacients problema als 0 mesos, els perfils d'expressió dels pacients problema als 3 mesos envers els del mateix grup als 0 mesos i els perfils d'expressió dels pacients control als 3 mesos envers els del mateix grup als 0 mesos. Els miRNAs on s'apreciaren canvis més significatius, tant a nivell de sobre-expressió com d'infra-expressió, varen ser analitzats amb més profunditat: es va dur a terme una recerca de bibliografia i es determinaren els seus potencials gens diana mitjançant eines bioinformàtiques, per així investigar les seves possibles implicacions en les vies de recuperació funcional.

A partir dels resultats obtinguts es suggeriren una sèrie de miRNAs com a possibles reguladors de les vies de recuperació funcional. S'hauran de dur a terme estudis de validació i funcionalitat en una cohort més àmplia de pacients per confirmar la implicació dels miRNA identificats en la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic.

Índex

Resum.....	1
Abreviacions.....	3
1. Introducció	4
1.1. Concepte d'ictus	4
1.2. Classificacions de la patologia	4
1.3. Mètodes i tècniques diagnòstiques a l'ictus	5
1.4. Impacte econòmic social i sanitari de la patologia	6
1.5. Factors de risc vascular i mesures de prevenció.....	6
1.6. Situació actual i noves perspectives	7
1.7. Mecanismes cel·lulars i moleculars que es produeixen en un ictus isquèmic.....	8
1.8. Els microRNAs com a biomarcadors	8
2. Hipòtesi i objectius.....	10
2.1. Hipòtesi:.....	10
2.2. Objectiu principal:	10
2.3. Objectius secundaris	10
3. Materials i mètodes	10
3.1. Disseny	10
3.2. Individus	11
3.2.1. Criteris d'inclusió.....	12
3.2.2. Criteris d'exclusió	12
3.2.3 Consideracions relacionades amb els criteris de selecció	12
3.3. Variables clíniques	12
3.4. Anàlisi genètic	13
3.5. Anàlisi de dades	14
4. Resultats	14
5. Discussió	21
6. Conclusions	28
Bibliografia.....	29

Abreviacions

ABVD: Activitats Bàsiques de la Vida Diària

ACA: artèria cerebral anterior

ACM: artèria cerebral mitjana

ACTB: Actin β

ADAM22: ADAM Metallopeptidase domain 22

ADAMTS8: ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin type 1 motif 8

AGO1: Argonaute 1

AGO2: Argonaute 2

ATG4: Autophagy related 4A cysteine peptidase

CaMK: Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase

CaMKK2: Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase 2 β

cDNA: DNA còpia

CEIC-IB: Comitè Ètic d'Investigació Clínica de les Illes Balears

CKAP2: Cytoskeleton Associated Protein 2

CLDN11: Claudin 11

DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8

DNAL4: Dynein Axonemal Light chain 4

DWI: Diffusion Weighted Imaging

DYRK1A: Dual specificity Tyrosine phosphorylation Regulated Kinase 1

eIF4E: Eukaryotic translation initiation factor 4E

FLAIR: Fluid Attenuation Inversion Recovery

FLRT3: Fibronectin Leucine Rich Transmembrane protein 3

FSD1L : Fibronectin type III and SPRY Domain containing 1-Like

HIF: Hypoxia Inducible Factors

hsa: Homo sapiens

HUSE: Hospital Universitari de Son Espases

ICAMs: Intercellular adhesion molecules

IdISPa: Institut d'Investigació Sanitària de Palma

IL13RA1: Interleukin 13 Receptor- α 1

ITGA11: Integrin Alpha 11

ITGB8: Integrin β 8

LCR: líquid cefaloraquídi

LDLs: Low Density Lipoproteins

let: lethal

LIN28B: Lin-28 homolog B

MAP1A: Microtubule-Associated Protein 1A

MAP2: Microtubule-Associated Protein 2

MAP3K7: Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 7

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase C

MIAME: Minimum Information About a Microarray Experiment

miR: microRNA

miRDB: MicroRNA target prediction and funcional study DataBase

miRISC: miRNA-induced silencing complex

miRNAs: microRNAs

MMP-9: Matrix metallopeptidase-9

MMP-24: Matrix Metallopeptidase-24

MMPs: Matrix Metallopeptidases

MOV10: Moloney leukemia virus

mRNA: RNA missatger

mRS: Modified Rankin Scale

MT5-MMP: Matrix Type-5 Metallopeptidase

MT-MMPs: Matrix Type-Metallopeptidases

ncRNAs: non-coding RNAs

neuroD2: Neuronal Differentiation 2

NFASC: Neurofascin

NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale

NKAPL: NFKB Activating Protein-Like

NLGN2: Neuroligin 2

NRG3: Neuroregulin 3

PIK3R2: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit

PKC: Protein Kinase C

PRKACB: Protein Kinase cAMP-dependent Catalytic β

Pum2: Pumilio 2

REGICOR: Registre Gironí del COR

SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation

SLITRK1: SLIT and NTRK Like Family Member 1

SMARCAD1: SWI/SNF-Related, Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1

snoRNAs: small nucleolar RNAs

SNPH: Syntaphilin

SPRED1: Sprouty-Related EVH1 Domain-containing protein 1

TLL4: Tubulin Tyrosine Ligase-Like family, member 4

TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

t-SNARE: target SNARE

Tsp-1: Thrombospondin-1

VAMP2: Vesicle-Associated Membrane Protein 2

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1

v-SNARE: vesicle SNARE

1. Introducció

1.1. Concepte d'ictus

L'ictus és una patologia produïda com a conseqüència d'una alteració del flux sanguini cerebral, provocant trastorns transitoris o definitius d'una o diverses regions de l'encèfal. N'existeixen multitud de tipus, els quals es poden organitzar en una sèrie de classificacions les quals depenen de diversos factors: perfil evolutiu; característiques de la neuroimatge; naturalesa, mida i topografia de la lesió; mecanisme de producció; entre d'altres. També és important conèixer l'etiologia de la patologia per així poder aplicar un tractament adequat i una prevenció secundària eficaç¹.

1.2. Classificacions de la patologia

Pel que fa al **mecanisme de producció de la patologia**, es poden diferenciar dos grans grups: ictus isquèmic i ictus hemorràgic. En aquest treball ens centrarem amb l'ictus isquèmic, el qual es genera com a conseqüència d'un trastorn qualitatiu o quantitatiu en l'aport circulatori¹. Per altra banda, l'ictus hemorràgic fa referència a una extravasació de sang dins la cavitat cranial produïda per la ruptura d'un vas sanguini, ja sigui arterial o venós, com a conseqüència de diversos mecanismes. Aquest es pot classificar en funció del lloc on es produeix l'hemorràgia: intracerebral i subaracnoidea¹.

L'ictus isquèmic, representa entre el 80 i el 85% dels casos, en canvi, l'ictus hemorràgic només ocupa entre el 15 i el 20% restant².

Segons les zones de l'encèfal afectades en podem diferenciar dos subtipus: isquèmia cerebral focal, quan només afecta una regió de l'encèfal; i isquèmia cerebral global, quan afecta a tot l'encèfal. A la vegada, es consideren dos tipus d'isquèmia cerebral focal: l'atac isquèmic transitori i l'infart cerebral. L'atac isquèmic transitori és un període curt de disfunció neurològica on s'aprecien símptomes clínics que duren menys d'una hora. A més, no hi ha evidències d'infart cerebral apreciables a través de les tècniques de neuroimatge. Tanmateix, els pacients que el pateixen són considerats un grup d'alt risc d'ictus i altres patologies vasculars¹. En canvi, l'infart cerebral és aquell on l'aport circulatori es veu alterat durant almenys 24 hores, provocant una necrosi tissular apreciable a través de les tècniques de neuroimatge¹.

Així mateix, podem diferenciar diversos tipus d'infart cerebral **segons la classificació de *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)***, la qual els classifica en funció de la seva etiologia: aterotrombòtic, cardioembòlic, lacunar, inhabitual i indeterminat¹.

- Infart aterotrombòtic o provocat per arteriosclerosi dels grans vasos: en general afecta una zona mitjana (1,5 a 3 cm) o gran (>3 cm) de l'encèfal i el pacient ha de patir una arteriosclerosi clínicament generalitzada o una estenosi de les artèries cerebrals¹.

- Infart cardioembòlic: també afecta generalment una zona mitjana o gran de l'encèfal i es presenta de manera instantània (minuts) o aguda (hores), provocant un dèficit neurològic màxim en les primeres fases. A més, és imprescindible la presència d'una cardiopatia embolígena demostrada (grup de condicions heterogènies que predisposen a tenir un elevat risc de tromboembolismes sistèmics, un exemple n'és la fibril·lació auricular) i l'absència d'una oclusió o estenosi arterial¹.

-**Infart de tipus lacunar**: causa una lesió de petita mida (<15 mm de diàmetre) localitzada a la zona de distribució de les arterioles perforants cerebrals i es produeix en pacients amb hipertensió arterial o que presenten altres factors de risc vascular cerebral¹.

- **Infart de causa rara**: afecta una zona petita, mitjana o gran d'un pacient sense factors de risc vascular cerebral al qual s'han descartat les altres etiologies (infart cardioembòlic, lacunar i aterotrombòtic). D'aquesta manera sol ser provocat per una arteriopatia no arterioscleròtica o per una patologia sistèmica¹.

-**Infart d'etiologia indeterminada**, en el qual ens centrarem en aquest treball: afecta a una zona mitjana o gran de l'encèfal i pot ser provocat per la coexistència de dues o més etiologies desencadenants, una causa desconeguda o criptogènica o per un estudi incomplet o insuficient¹.

Si ens fixem en el **perfil evolutiu de la patologia**, podem diferenciar tres grups: l'**ictus progressiu o en evolució**, l'**ictus amb tendència a la millora amb seqüeles mínimes** i l'**ictus estable**. L'ictus progressiu o en evolució és aquell on les manifestacions clíniques inicials evolucionen cap a l'empitjorament del pacient, ja sigui per la localització de la lesió, per l'aparició de nous símptomes o per ambdues circumstàncies. Per altra banda, l'ictus amb tendència a la millora o amb seqüeles mínimes fa referència als pacients que segueixen un curs regressiu i per tant, a les tres setmanes de l'inici de la simptomatologia la recuperació de la lesió neurològica és igual o superior al 80%. Finalment, l'ictus estable és aquell on el dèficit neurològic inicial no es veu modificat¹.

1.3. Mètodes i tècniques diagnòstiques a l'ictus

Els pacients que presenten un quadre suggestiu de patir una patologia cerebrovascular o ictus han de passar per un procés dirigit a: la confirmació del diagnòstic; la determinació del tipus d'ictus i l'extensió de la lesió; el coneixement de la situació del sistema vascular i la seva etiologia i patogènia. Aquest procés s'ha de dur a terme de manera ràpida i ens ha de permetre indicar un tractament adient pel pacient i establir un pronòstic evolutiu a curt i llarg termini¹.

D'aquesta manera el procés es basa en tres apartats: història clínica del pacient, exploració general i neurològica i exploracions paraclíniques. Així mateix, les exploracions paraclíniques es poden subdividir en tres parts: l'avaluació sistèmica (dades analítiques i radiografia de tòrax), les tècniques de neuroimatge i l'avaluació cardíaca¹.

Pel que fa a l'avaluació de les dades analítiques, es duran a terme una sèrie de proves seguint unes consideracions determinades. Aquestes inclouen diversos estudis: hematològics (hemograma complet, velocitat de sedimentació globular, plaquetes, temps de protrombina, temps parcial de tromboplastina, fibrinogen i homocisteïna plasmàtica); bioquímics; endocrins; immunològics; serològics; genètics i del líquid cefaloraquídi (LCR), el qual s'obté a través d'una punció lumbar¹.

En relació a les proves de neuroimatge, destaquen la **tomografia computeritzada cranial** i la **ressonància magnètica cranial**. La tomografia computeritzada cranial permet la diferenciació precisa entre un ictus isquèmic i un hemorràgic, a més ajuda a descartar la presència de lesions intracranials d'origen no vascular. Així, aquesta tècnica constitueix l'examen neurològic de primera elecció a la major part dels hospitals¹. D'altra banda, la ressonància magnètica cranial proporciona una identificació més precisa de la topografia, extensió i etiologia de determinats tipus d'ictus. Tanmateix aquesta altra tècnica no sol ser considerada una exploració de primera elecció en el diagnòstic primerenc de la isquèmia cerebral¹.

1.4. Impacte econòmic social i sanitari de la patologia

Les malalties cerebrovasculars constitueixen una de les primeres causes de mort, juntament amb les patologies cardiovasculars i el càncer². Concretament són la tercera causa de mortalitat en el món occidental i la segona a Espanya, la primera causa de discapacitat física en adults i la segona de demència segons la Organització Mundial de la Salut³. Als sis mesos d'haver patit l'ictus, un 26,1% dels pacients han mort, un 41,5% són independents i un 32,4% són dependents². Així, de manera global s'estima que un 44% dels supervivents presenten una dependència funcional². De forma paral·lela es creu que al 2030 hi haurà un increment d'un 24,9% de casos d'ictus respecte el nombre dels que hi va haver a l'any 2010⁴.

Les principals discapacitats i complicacions derivades de la patologia són: paràlisi, desequilibri, trastorns de la parla i/o llenguatge, trastorns visuals, dèficits cognitius, alteracions emocionals, fatiga física i psíquica, crisis epilèptiques i dolor².

La incidència de l'ictus incrementa de manera progressiva amb l'edat i és més alta en homes que en dones². Concretament, a Espanya la incidència de la patologia es troba entre 132-174 nous casos cada any per cada 100.000 habitants³.

Respecte a la prevalença de la patologia, és important destacar que hi ha diferències geogràfiques importants; és superior a les zones urbanes, amb un 8,7%, i inferior a les zones rurals, amb un 3,8%. Així mateix, es produeix un augment de la prevalença a les dones a mesura que augmenta l'edat².

S'estima que aquesta patologia consumeix entre un 3 i un 4% del cost sanitari als països amb rentes elevades². Cal recalcar que un 76% d'aquest és destinat a costos hospitalaris durant el primer any posterior al succés². En els anys següents, la major part de la càrrega econòmica és derivada a costos directes no sanitaris, tals com assistència social i/o familiar; i costos indirectes, com per exemple els provocats per la incapacitat o pèrdua laboral.

Es pot observar que en els darrers anys hi ha hagut un important increment en el nombre de publicacions relacionades amb les malalties cerebrovasculars com a conseqüència del seu gran impacte socio-econòmic.

1.5. Factors de risc vascular i mesures de prevenció

En els darrers anys s'estan posant en marxa diverses mesures de prevenció de la patologia amb l'objectiu d'evitar el major nombre possible de morts derivades. S'ha de tenir en compte que hi estan implicats múltiples factors de risc vascular, alguns dels quals són modificables i altres no. Així, la detecció i modificació dels factors de risc és fonamental per a la prevenció del primer ictus o atac isquèmic transitori (mesures de prevenció primària) i per a la prevenció de recurrències després del primer episodi (mesures de prevenció secundària)².

La hipertensió arterial és modificable amb l'estil de vida i constitueix el factor de risc més important, després de l'edat. D'aquesta manera els valors de pressió arterial s'han de mantenir inferiors a 140/90 mm de Hg². Per altra banda també destaca el tabaquisme, tant fumadors actius com passius, i el consum d'alcohol. El tabaquisme augmenta el risc de patir un ictus, tanmateix pel que fa a l'alcohol, s'ha vist que un consum lleu o moderat no incrementa el risc de patir la patologia i fins i tot, podria presentar un efecte protector. Així mateix, el consum de drogues i la dieta també poden afectar al risc de patir la patologia. S'ha demostrat que el consum regular de peix i de tres o més fruites al dia en redueix el risc². A més, la concomitància d'altres patologies com l'obesitat, la diabetis *mellitus*, la

dislipèmia i la fibril·lació auricular també afecten al risc de patir un ictus. La obesitat i la diabetis *mellitus* n'incrementen el risc, tanmateix l'efecte de la dislipèmia encara no està del tot clar. El que sí es sap és que els fàrmacs hipolipemians del grup de les estatines, disminueixen el risc de patir ictus isquèmics². Un altre factor de risc són els anticonceptius orals i les teràpies hormonals. Les dones fumadores, que pateixen migranyes o que tenen antecedents d'episodis tromboembòlics i prenen anticonceptius orals presenten un major risc de patir un ictus². Per altra banda, la pràctica d'exercici físic s'associa amb un menor risc de patir la patologia². Finalment l'aterosclerosi també constitueix un factor de risc important. Al llarg del temps es van formant plaques arterioscleròtiques a l'interior dels vasos sanguinis dificultant així el transport de la sang i podent arribar a provocar una isquèmia. Aquestes plaques estan compostes per lípids i cèl·lules espumoses, les quals contenen lipoproteïnes de baixa densitat o *Low Density Lipoproteins* (LDLs)⁵.

Les taules més usades per avaluar el risc vascular són: la de Framingham, la del Registre Gironí del COR (REGICOR) i la *Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE). Aquestes tenen en compte el sexe, l'edat, els factors de risc no modificables, la pressió arterial, els valors de colesterol, l'estat de fumador i la concomitància de diabetis *mellitus*².

1.6. Situació actual i noves perspectives

Actualment no es compta amb cap eina pronòstica absolutament fiable ni cap fàrmac per la prevenció de la dependència posterior a l'ictus. En els darrers anys molts d'estudis van destinats a la recerca de biomarcadors neuronals que ajudin a diferenciar l'etiologia de la patologia i a establir un pronòstic eficaç. Certes substàncies presents al teixit neural s'alliberen ràpidament al torrent sanguini després del dany neuronal, així el biomarcador ideal seria aquell que s'alliberés al torrent sanguini amb una quantitat proporcional al dany neural produït⁶.

D'aquesta manera des de fa uns anys molts estudis s'han centrat en la recerca de substàncies que puguin ser usades com a biomarcadors i que així ens permetin establir un diagnòstic i pronòstic eficaç de l'ictus isquèmic, tanmateix és un procés complicat⁶. S'han suggerit diversos biomarcadors com a potencials eines diagnòstiques, entre els quals trobem: la proteïna C reactiva, la interleuquina-6, la *Matrix metalloproteinase-9* (MMP-9), la *Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) i altres *Intercellular adhesion molecules* (ICAMs). Si més no, la seva especificitat i capacitat per diferenciar les diverses etiologies d'ictus encara no està del tot clara⁴. Tot i això, pel que fa a la MMP-9 s'ha observat que la seva expressió augmenta quan es produeix un ictus isquèmic i que aquesta proteïna presenta un paper dual: a la fase aguda del procés presenta efectes perjudicials responsables de la ruptura de la barrera hematoencefàlica, mort neural i hemorràgia; per altra banda en el procés regeneratiu i de remodelació vascular posterior presenta efectes beneficiosos⁶.

En els darrers anys, molts estudis han relacionat els miRNAs amb el control de la regulació de diversos gens implicats en les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus. D'aquesta manera se'ls ha proposat com a biomarcadors de pronòstic de les malalties cerebrovasculars⁷. Si més no, el seu paper en la regulació dels gens implicats en les vies de recuperació funcional encara no està del tot clar.

1.7. Mecanismes cel·lulars i moleculars que es produeixen en un ictus isquèmic

L'encèfal depèn d'un reg sanguini continu per rebre l'oxigen i els nutrients necessaris, a més d'eliminar el diòxid de carboni i els residus cel·lulars. D'aquesta manera, quan el teixit cerebral és incapaç de mantenir el transport dels lípids essencials, proteïnes, nutrients i residus cel·lulars es produeixen alteracions en la seva homeòstasi⁵.

La isquèmia cerebral inicia una cascada d'esdeveniments que provoquen danys neuronals irreversibles. L'excitotoxicitat és un procés patològic en el qual les neurones són danyades per la sobreactivació dels receptors de diversos neurotransmissors i es produeix després de minuts de l'inici de l'ictus. Posteriorment es produeix la resposta inflamatòria i finalment la mort cel·lular o apoptosi, la qual es desenvolupa passades unes hores o fins i tot, dies⁵. D'aquesta manera tots aquests esdeveniments moleculars posteriors al procés isquèmic provoquen el pas d'un estat quiescent a un inflamatori de l'endoteli vascular. L'alliberació de citoquines pro-inflamatòries, tals com la interleuquina-6, i la posterior inducció de molècules d'adhesió per part de l'endoteli vascular provoquen la disrupció de la barrera hematoencefàlica i l'entrada de leucòcits. Tot això, potencia l'estat inflamatori del teixit, el qual es veu acompanyat d'un augment del nombre de radicals lliures d'oxigen, un edema cerebral i una creixent alliberació d'enzims citotòxics⁵.

1.8. Els microRNAs com a biomarcadors

Els miRNAs són molècules curtes, d'entre 21 i 23 nucleòtids de longitud⁸, de RNA no codificant implicades en la regulació post-transcripcional de l'expressió gènica, d'aquesta manera poden intervenir en la modulació de múltiples processos⁷. Estan presents en els animals, plantes, virus i recentment també s'han trobat en determinades estructures unicel·lulars eucariotes⁹. La major part d'ells es localitzen a regions intergèniques, si més no, també els podem trobar a introns i exons de RNAs no codificants o a introns de RNAs codificants¹⁰. Aquestes molècules estan implicades en la regulació de molts processos, entre els quals s'inclouen: el desenvolupament, la proliferació cel·lular, l'apoptosi, el metabolisme, la morfogènesi i el progrés de determinades patologies, com per exemple el càncer⁹.

El seu mecanisme d'actuació es basa en la unió a la seva diana present al RNA missatger (mRNA) a través d'una seqüència complementària d'aproximadament 7 parells de bases⁷. Aquesta interacció pot provocar una inhibició de la traducció o una reducció de l'estabilitat del mRNA, disminuint o inhibint així l'expressió de la proteïna diana, la qual era codificada pel mRNA⁷.

És important destacar que molts mRNA contenen múltiples dianes d'unió de miRNAs, així aquestes molècules intervenen en la regulació de molts processos. Es poden produir canvis en l'afinitat dels miRNAs per les seves dianes en els mRNA com a conseqüència d'una sobre-expressió, deleció, alteracions epigenètiques o mutacions en els mateixos; per altra banda, també es poden produir mutacions en els mRNA. Tots aquests processos alteren les unions dels miRNA als mRNA, provocant alteracions en l'expressió de la proteïna per la qual codifiquen, la qual cosa en general ocasiona problemes en el manteniment de l'homeòstasi cel·lular⁷.

Així, el fet de que siguin molècules que intervenen en la regulació de múltiples processos, les fa interessants per ser estudiades com a dianes terapèutiques de determinades patologies⁷.

El seu procés de maduració es duu a terme en diverses etapes. Inicialment la RNA polimerasa II transcriu els miRNAs primaris o pri-miRNAs al nucli, posteriorment aquests són tallats per dues

RNases III endonucleases. En primer lloc, un complex format per l'endonucleasa *Drosha* i la proteïna *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8) reconeix la conformació de *stem-loop* dels pri-miRNAs i els talla donant lloc a molècules d'entre 70 i 80 nucleòtids¹⁰ anomenades pre-miRNAs. Després, aquestes molècules són transportades al citoplasma a través de l'exportina 5, la qual està situada a la membrana nuclear. Aquesta proteïna reconeix la conformació característica dels pre-miRNAs i permet el seu transport de manera dependent de Ran-GTP. Finalment, una altra endonucleasa, la *Dicer*, la qual es troba al citoplasma, acaba de processar-los i els converteix en molècules madures. Aquestes s'hauran d'incorporar al complex *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) per poder-se unir a les dianes específiques dels mRNAs, les quals es solen localitzar als extrems 3'UTR no traduïts. Cal recalcar que aquest complex és recolzat per una sèrie de proteïnes, entre les quals trobem: *Argonaute 1* (AGO1), *Argonaute 2* (AGO2), *Pumilio 2* (Pum2) i *Moloney leukemia virus* (MOV10)¹⁰.

Com s'ha explicat, aquestes unions complementaries provocaran una inhibició o un decreixement de l'expressió de la proteïna com a conseqüència de la repressió o degradació del seu mRNA codificant⁸. Per tenir una major estabilitat, els mRNAs de les cèl·lules eucariotes es troben circularitzats mitjançant diversos de factors d'iniciació, entre els quals trobem: el *Eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) i la *poly(A)-binding protein 1*. Les proteïnes AGO competeixen amb aquests factors per unir-se als mRNAs, dificultant així la circularització de les molècules i estimulants la inhibició o decreixement de la seva traducció¹⁰.

És important dir que existeixen altres tipus de biomarcadors, si més no, els miRNAs són més estables als fluids corporals i els seus mètodes de detecció són més barats. A més, la majoria d'ells es conserven entre les distintes espècies i la seva expressió sol ser específica de determinats teixits o estats biològics⁷. Si ens centrem amb l'encèfal, la seva expressió pot ser ubiqua o específica de determinades regions¹⁰.

Cal dir que perquè un miRNA sigui un bon biomarcador la seva detecció ha de ser: sensible, predictiva, específica, robusta i s'ha de poder detectar a través d'un mètode no invasiu. Tanmateix, també existeixen determinats problemes derivats de la utilització dels miRNAs com a biomarcadors, com per exemple la falta d'estandarització dels procediments, la qual cosa pot provocar interpretacions errònies en els resultats⁷.

Els estudis preliminars relacionats amb la utilització dels miRNAs com a biomarcadors en els processos d'ictus isquèmic es centraven en el seu paper en la regulació de les respostes agudes posteriors a l'ictus, les quals inclouen les respostes inflamatòries, la ruptura de la barrera hematoencefàlica, entre d'altres. Concretament, un d'aquests estudis es va centrar en la identificació dels miRNAs implicats en la regulació de les respostes inflamatòries, immunològiques i de proliferació cel·lular i dels seus gens diana¹¹. Si més no, en aquest estudi no es va tenir en compte l'etiologia de l'ictus. Per altra banda, un altre estudi relacionat també es va centrar en la identificació de miRNAs implicats en les respostes agudes posteriors a l'ictus isquèmic tanmateix en aquest cas sí que es va tenir en compte l'etiologia de la patologia⁴.

Partint d'aquesta base, l'objectiu d'aquest treball va ser la identificació de miRNAs implicats en la recuperació funcional i la dependència posterior a l'ictus isquèmic a través de la comparació dels perfils d'expressió de miRNAs de pacients control (*good-outcome*) i pacients problema (*bad-outcome*) per així poder-los usar com a biomarcadors de pronòstic funcional. D'aquesta manera, a diferència dels treballs anteriors, els quals es centraven amb la regulació de les respostes agudes posteriors al

procés isquèmic; aquest es centra amb la implicació dels miRNAs en la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic, com són: l'angiogènesi, la neurogènesi, la neuritogènesi i la sinaptogènesi.

L'angiogènesi és un procés fisiològic on es generen nous vasos sanguinis a partir dels preexistents. En aquest procés les cèl·lules endotelials quiescents són activades per factors pro-angiogènics i d'aquesta manera comencen a migrar, proliferar i organitzar-se en estructures tubulars¹². Per altra banda, la neurogènesi és el procés pel qual es generen noves neurones a partir de cèl·lules mare i cèl·lules progenitores. La neuritogènesi és el procés de formació de noves neurites i finalment, la sinaptogènesi és el procés que genera noves connexions sinàptiques.

2. Hipòtesi i objectius

2.1. Hipòtesi:

Existeix una correlació directa entre el pronòstic funcional després de patir un ictus i l'activació de processos regeneratius controlats per miRNAs, com són: l'angiogènesi, la neurogènesi, la neuritogènesi i la sinaptogènesi.

2.2. Objectiu principal:

Identificació dels miRNAs associats tant amb la modulació de les vies de recuperació funcional (angiogènesi, neurogènesi, neuritogènesi i sinaptogènesi) com amb la dependència posterior a l'ictus isquèmic amb la finalitat d'usar-los com a biomarcadors de pronòstic funcional.

2.3. Objectius secundaris

1. Determinar els perfils d'expressió de miRNAs dels diversos pacients control (amb bona recuperació funcional o *good-outcome*) i problema (marcada discapacitat o *bad-outcome*) als 0 i 3 mesos mitjançant *arrays* d'expressió.
2. Comparar els perfils d'expressió de miRNAs obtinguts.
3. Identificar els miRNAs que presenten canvis més significatius, tant a nivell de sobre-expressió com d'infra-expressió.
4. Cercar bibliografia relacionada i determinar els potencials gens diana regulats per aquests miRNAs per així poder entendre el seu paper en la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic i poder-los proposar com a biomarcadors de pronòstic funcional.

3. Materials i mètodes

3.1. Disseny

Al servei de Neurologia de l'Hospital Universitari de Son Espases (HUSE) es va recollir una mostra de sang perifèrica als 10 dies posteriors a l'ictus (perfils que s'anomenaren com a 0 mesos) i als 3 mesos de tots els pacients que complien els criteris d'inclusió de l'estudi i que no complien els d'exclusió (aquests criteris estan explicats *a posteriori*: veure apartat 3.2. de materials i mètodes), i que a més havien signat el consentiment informat aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de les Illes Balears (CEIC-IB).

Posteriorment, es varen extreure els miRNA de les mostres de sang i es congelaren a -80°C fins que es va procedir al seu anàlisi genètic i estadístic.

Per altra banda, es va dur a terme una exploració neurològica dels pacients per avaluar la severitat de l'ictus a través de l'escala de *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) a l'ingrés, als 7 dies i a l'alta (la interpretació dels valors establerts per la NIHSS i les seves bases estan explicades *a posteriori*: veure apartat 3.3. de materials i mètodes).

Passats tres mesos després de l'ictus isquèmic, es va tornar a avaluar clínicament als pacients i es va determinar la seva evolució funcional a través de la *Modified Rankin Scale* (mRS) (la interpretació dels valors establerts per la mRS i les seves bases estan explicades *a posteriori*: veure apartat 3.3. de materials i mètodes). Els valors establerts per aquesta escala van permetre separar els pacients amb dos grups: els pacients que havien tingut una bona recuperació funcional (grup control o *good-outcome*), que eren aquells que presentaven un valor inferior o igual a 2 de mRS; i els pacients que no havien experimentat una bona recuperació funcional (grup problema o *bad-outcome*), que eren els que se'ls havia establert uns valors de 4 o 5 de mRS.

A més, es va calcular el volum de l'infart per ressonància magnètica cerebral a les primeres 72 hores i als 3 mesos posteriors a l'ictus, seguint el protocol de neuroimatge de patologia cerebrovascular del centre HUSE. Es va determinar el volum de l'infart en fase aguda utilitzant les seqüències de *Diffusion Weighted Imaging* (DWI) i *Fluid Attenuation Inversion Recovery* (FLAIR) a les 72 hores i es va comparar amb el volum de l'infart obtingut amb les mateixes seqüències als 3 mesos posteriors a l'ictus (la interpretació i les bases de les seqüències DWI i FLAIR explicades *a posteriori*: veure apartat 3.3. de materials i mètodes). Per calcular-lo es va aplicar el mètode ABC/2. Es va seleccionar la imatge on l'infart presentava una mida més gran i es va mesurar el major diàmetre antero-posterior (A) i el seu diàmetre perpendicular (B). També es va determinar el diàmetre vertical sumant el gruix dels talls on es veia l'infart (C). Finalment es va calcular el volum amb la següent fórmula: $0,5 \times A \times B \times C$.

Després de dur a terme l'extracció i posterior anàlisi dels perfils d'expressió dels miRNA del grup control i del grup problema als 0 mesos i 3 mesos es varen dur a terme una sèrie de comparacions:

1. Patrons d'expressió de miRNA del grup de pacients control als 0 mesos envers els grup de pacients problema als 0 mesos.
2. Patrons d'expressió de miRNA del grup de pacients problema als 3 mesos envers el mateix grup als 0 mesos.
3. Patrons d'expressió de miRNA del grup de pacients control als 3 mesos envers el mateix grup als 0 mesos.

Posteriorment es va dur a terme una recerca bibliogràfica exhaustiva dels miRNAs que presentaven uns majors nivells de sobre-expressió o infra-expressió significatius, a més de la identificació dels potencials gens diana que regulen per així entendre quines implicacions tenen en la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors al procés isquèmic.

3.2. Individus

Els criteris de selecció dels individus es basaren en les següents llistes de criteris d'inclusió i d'exclusió, les quals es realitzaren tenint en compte una sèrie de consideracions (les consideracions

que es varen tenir en compte per establir els criteris d'inclusió i exclusió estan explicades *a posteriori*: veure apartat 3.2.3. de materials i mètodes).

3.2.1. Criteris d'inclusió

- Pacients d'ambdós sexes amb edat igual o inferior a 55 anys.
- Ictus isquèmic al territori anterior irrigat per l'artèria cerebral mitjana (ACM) o l'artèria cerebral anterior (ACA).
- Etiologia indeterminada o criptogènica segons la classificació de TOAST després d'haver dut a terme un estudi exhaustiu.
- Severitat inicial de l'ictus segons l'escala de NIHSS entre 7 i 14 punts.
- Valor de mRS previ de 0.
- Demostració de la presència de l'infart mitjançant una ressonància magnètica cerebral dins les primeres 72 hores.
- El pacient o el seu representant legal han d'haver firmat el consentiment informat aprovat pel CEIC-IB.
- Demostració de l'absència d'una patologia concomitant que pugui comprometre la supervivència a curt termini de l'individu o pugui dificultar la interpretació dels resultats.

3.2.2. Criteris d'exclusió

- Pacients amb una puntuació igual o superior a 2 a l'ítem 1a (nivell de consciència) de l'escala de NIHSS.
- Ictus isquèmic de territori posterior.
- Etiologia aterotrombòtica, cardioembòlica, lacunar, inhabitual o indeterminada per coexistència de factors o per estudi incomplet.
- Evidència en la ressonància magnètica cerebral d'hemorràgia o neoplàsia.
- Recurrència de l'ictus en el període de seguiment.

3.2.3 Consideracions relacionades amb els criteris de selecció

Es seleccionaren pacients relativament joves per intentar que l'edat no fos un factor determinant en la patologia i d'aquesta manera que la major part dels factors que influïssin fossin genètics. D'altra banda, es varen triar els pacients que havien patit un ictus isquèmic en el territori anterior perquè els del territori posterior solen tenir conseqüències molt més severes. A banda d'això, s'elegiren els pacients que havien experimentat un ictus de severitat moderada segons l'escala de NIHSS i que no presentessin cap símptoma anterior al succés, per la qual cosa s'establia que el valor previ de l'escala de mRS havia de ser 0.

3.3. Variables clíniques

Les variables basals que inclouen l'edat, el sexe i els factors de risc vascular, varen ser recollides per a cada individu. S'ha de tenir en compte que els factors de risc vascular més importants són: la hipertensió arterial, la diabetis *mellitus*, la hiperlipèmia, les malalties de l'artèria coronària, la fibril·lació auricular i el fet d'haver patit un ictus previ (per a més informació veure apartat 1.5. de la introducció).

D'altra banda, les variables clíniques i de resultats es refereixen al fet de que els resultats clínics i de recuperació han estat avaluats segons els criteris de les escales de NIHSS i mRS. La *Modified Rankin Scale* (mRS) s'usa per determinar el resultat funcional posterior a un ictus. Es basa en adjudicar un valor determinat per a cada pacient, el qual s'estableix en funció d'una entrevista estructurada. El valor 0 s'estableix als pacients que no presenten símptomes ni limitacions. El valor 1, a aquells que no

tenen discapacitats significatives (presenten alguns símptomes però sense limitacions per dur a terme les seves activitats habituals i el seu treball). El 2, als que presenten una discapacitat lleu (limitacions en les seves activitats habituals i laborals prèvies, encara que són independents en les Activitats Bàsiques de la Vida Diària (ABVD)). Els pacients que presenten una discapacitat moderada s'inclouran dins el valor 3 (necessiten assistència per algunes activitats instrumentals però no per dur a terme les ABVD). Per altra banda, el valor 4 inclou a aquells pacients que presenten una discapacitat moderada/severa (requereixen assistència per dur a terme les ABVD però no necessiten cuidats de manera continuada). Finalment, el valor 5 engloba a aquells pacients que presenten una discapacitat severa (necessiten cuidats durant tot el dia)¹³. Per contra, l'escala de *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) puntua de manera numèrica la gravetat o severitat de l'íctus (lleu <4, moderat <16, greu <25, molt greu ≥25), s'aplica a l'inici i durant l'evolució del mateix, pot indicar la necessitat d'un tractament revascularitzador (quan la puntuació es situa entre 4 i 25) i presenta un valor pronòstic. La seva puntuació mínima és 0 i la màxima 42, tanmateix també presenta una sèrie de limitacions¹⁴. Per acabar, la classificació de *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST) es va usar per agrupar els pacients en funció de l'etiologia de l'íctus que havien presentat: aterotrombòtic, cardioembòlic, lacunar, inhabitual i indeterminat (per a més informació de les diverses etiologies d'íctus veure apartat 1.2. de la introducció)¹.

Així mateix, també es va tenir en compte si el pacient havia seguit un tractament de rehabilitació posterior a l'íctus. En la pràctica clínica habitual i en recerca, en general s'observa el valor de l'escala mRS als 90 dies, és a dir, als tres mesos d'haver patit l'íctus. A més, una puntuació de ≤2 segons aquesta escala distingeix entre la independència i la dependència funcional, que és el que ens ha permès classificar als pacients en els dos grups d'estudi: grup control i grup problema.

A banda d'això, és important destacar que la tècnica de difusió per ressonància magnètica DWI es basa en la detecció *in vivo* del moviment de molècules d'aigua, la qual cosa restringeix la seva utilització a determinades patologies com la isquèmia, els tumors i abscessos¹⁵. Per altra banda, la seqüència FLAIR és aquella on s'anul·la la senyal que prové del líquid cefaloraquídi¹⁶.

3.4. Anàlisi genètic

Per dur a terme l'anàlisi dels perfils d'expressió dels miRNAs es va utilitzar la tecnologia *Chip Affymetrix miRNA 3.0*, el qual analitza 1733 microRNAs humans a més d'altres molècules petites de RNA, tals com *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) i *non-coding RNAs* (ncRNAs) seguint el protocol amb petites modificacions. El protocol d'hibridació i posterior lectura de l'*array* va ser dut a terme pels tècnics de l'Institut d'Investigació Sanitària de Palma (IdISPa) de l'Hospital Universitari de Son Espases.

1. Inicialment es varen extreure els miRNAs de les mostres de sang perifèrica dels diversos pacients. Per dur a terme les extraccions del RNA total, on s'inclouen els miRNAs, es va usar el *PureLink miRNA Isolation Protocol* (*Invitrogen*), seguint les instruccions del fabricant. Posteriorment es va determinar la concentració del RNA resultant a través de l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000. També es va analitzar la qualitat del RNA usant gels desnaturalitzants composts per un 15% d'acrilamida i un 1% d'agarosa.
2. Posteriorment es va procedir a la poli-adenilació dels miRNAs aïllats a través de l'addició de múltiples adenines (>18 bases) a l'extrem 3'.
3. Després es sintetitzaren els DNA còpia (cDNA) dels miRNAs usant oligo-dT biotinitats a l'extrem 5' de la seqüència universal.

4. A continuació es va procedir a la hibridació dels oligos de l'assaig amb el cDNA sintetitzat. D'aquesta manera el cDNA biotinitat es va adherir a un suport sòlid i es va hibridar amb un *pool* d'oligos específics de miRNA.
5. Es va dur a terme una *Primer Extension* específica de miRNAs amb la intervenció d'una DNA polimerasa. Posteriorment es duigué a terme una PCR universal, s'el·luïren els productes estesos i es duigué a terme una PCR amb oligos universals marcats fluorescentment. Després els productes de PCR de cadena doble s'uniren a una fase sòlida i els productes de cadena senzilla es prepararen per la hibridació.
6. Es va realitzar la hibridació de la cadena senzilla del DNA a l'*array*. D'aquesta manera el producte de PCR es va hibridar amb les sondes de captura universals de l'*array*.
7. Finalment es va dur a terme la lectura de l'*array* a la Unitat de Genòmica de les noves instal·lacions de l'IdISPa, on es disposa d'un escàner d'*arrays* amb el corresponent software d'anàlisi.

3.5. Anàlisi de dades

Per dur a terme el processament de la imatge i l'extracció de les dades procedents de l'*array* es va usar el software iScan Control. Per altra banda, l'anàlisi de la quantificació de l'expressió gènica es va realitzar amb el software GenomeStudio, el qual també ens va permetre analitzar l'expressió diferencial entre els pacients que constitueixen el grup control o *good-outcome* (mRS ≤ 2) i els que constitueixen el grup problema o *bad-outcome* (mRS = 4-5). També es dugueren a terme anàlisis de t de Student (t-test) per establir les diferències estadístiques entre aquests dos grups. Cal dir que els valors t varen ser calculats per a cada miRNA diferencial. Els valors p es varen computeritzar a partir de cada distribució t teòrica. Els miRNA amb un p-valor $< 0,01$ foren seleccionats per l'anàlisi de *cluster* posterior. A més cal dir que per dur a terme l'anàlisi estadístic es varen dur a terme ANOVA aparellades quan es comparaven els perfils d'expressió de 3 mesos dels pacients problema envers els dels mateixos als 0 mesos i quan es comparava els perfils d'expressió de 3 mesos dels pacients control envers els dels mateixos als 0 mesos. Per altra banda, quan comparàvem els perfils d'expressió als 0 mesos dels pacients control envers els perfils d'expressió dels pacients problema als 0 mesos es dugueren a terme ANOVA no aparellades. Finalment, per dur a terme l'anàlisi de dades es varen seguir les pautes establertes per la *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME). La interrelació entre els miRNAs identificats en els diferents perfils d'expressió es va realitzar mitjançant un anàlisi per diagrama de Venn amb el suport informàtic Venny 2.1 (BioInfoGP, CNB-CSIC).

Posteriorment, es va dur a terme una recerca bibliogràfica exhaustiva dels miRNAs que presentaven uns majors nivells de sobre-expressió o infra-expressió significatius, a més d'una identificació dels potencials gens diana regulats pels mateixos per així entendre quines implicacions poden tenir en la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors al procés isquèmic. La recerca dels potencials gens diana sobre els quals actuen els miRNAs es va dur mitjançant la base de dades *MicroRNA target prediction and funcional study DataBase* (miRDB). El gens diana eren seleccionats en funció del seu percentatge d'homologia de seqüència amb el miRNA, tenint en compte els que presentaven un valor pròxim a 100, i de la seva possible relació amb la modulació de les vies de recuperació funcional.

4. Resultats

Les característiques dels pacients control i dels pacients problema implicats en aquest estudi apareixen a la **Taula 1**. Els individus es dividiren en dos grups segons el valor establert per la mRS als tres

mesos després de l'ictus en funció de la seva recuperació funcional. El primer grup estava constituït per 8 individus, els quals presentaven una bona recuperació funcional; d'aquesta manera s'anomenaven pacients control (*good-outcome*) i el valor de l'escala de mRS que se'ls havia establert passats 3 mesos després de l'ictus era ≤ 2 . Per altra banda, el segon grup estava format per 7 individus els quals en aquest cas no presentaven una bona recuperació funcional; així s'anomenaven pacients problema (*bad-outcome*) i el valor de l'escala de mRS que se'ls havia establert passats els 3 mesos després de l'ictus va ser de 4 o 5. La mitjana d'edat dels pacients control era de 49 anys, 5 eren homes (62,5%), 6 eren fumadors (75%), 4 presentaven hipertensió arterial (50%), cap presentava diabetis *mellitus* (0%) ni fibril·lació auricular (0%), 2 presentaven dislipèmia (25%), tots havien patit l'ictus en el territori ACM (100%), 4 l'havien sofert de lateralitat esquerra (50%), 5 d'etiologia criptogènica (62,5%) segons la classificació de TOAST i el valor de mitjana que se'ls havia establert segons l'escala de NIHSS era de 7. Per altra banda, la mitjana d'edat dels pacients problema era de 51 anys, 4 eren homes (57%), 6 eren fumadors (85,7%), 3 presentaven hipertensió arterial (42,85%), 1 presentava diabetis *mellitus* (14,28%), 1 presentava fibril·lació auricular (14,28%), 5 presentaven dislipèmia (71,42%), tots havien patit l'ictus en el territori ACM (100%), 4 l'havien sofert de lateralitat esquerra (57%), 4 d'etiologia criptogènica (57%) segons la classificació de TOAST i el valor de mitjana que se'ls havia establert segons l'escala de NIHSS era de 10.

Factors de risc vascular implicats		
Factors de risc vascular	Pacients control (n=8)	Pacients problema (n=7)
Mitjana d'edat (anys)	49	51
Sexe (homes)	5 (62,5%)	4 (57%)
Fumadors	6 (75%)	6 (85,7%)
Hipertensió arterial	4 (50%)	3 (42,85%)
Diabetis <i>mellitus</i>	0 (0%)	1 (14,28%)
Dislipèmia	2 (25%)	5 (71,42%)
Fibril·lació auricular	0 (0%)	1 (14,28%)
Mitjana de NIHSS	7	10
Territori ACM	8 (100%)	7 (100%)
Lateralitat (esquerra)	4 (50%)	4 (57%)
TOAST (criptogènics)	5 (62,5%)	4 (57%)

Taula 1. Factors de risc vascular implicats. Característiques dels pacients control (*good-outcome*) i problema (*bad-outcome*) implicats en l'estudi acompanyats dels percentatges corresponents de cada paràmetre respecte el total de pacients.

A la **Taula 2** es poden apreciar els miRNAs, snoRNAs i ncRNAs que presentaven diferències significatives (p -valor $< 0,05$) quan es comparaven els patrons d'expressió dels pacients que havien tingut una bona recuperació funcional (grup control o *good-outcome*) als 0 mesos amb els patrons d'expressió dels pacients que havien tingut una mala recuperació funcional (grup problema o *bad-outcome*) als 0 mesos. Concretament es detectaren 21 miRNA, snoRNAs i ncRNAs amb diferències significatives. Per ser més exactes, s'identificaren 11 miRNAs (hsa-miR-1275, hsa-miR-3201, hsa-miR-3609, hsa-miR-941, hsa-miR-625, hsa-miR-17*, hsa-miR-4321, hsa-miR-181b, hsa-miR-647, hsa-miR-4746-5p, hsa-miR-675*) i 10 snoRNAs i ncRNAs (U35A, ENSG00000252543, U57, U91, HBII-429, mgU12-22-U4-8, snR38C, HBII-85-8, U41, U84). A més també es va veure que 2 d'aquests miRNA estaven infra-expressats (hsa-miR-4746-5p i hsa-miR-675*). Per contra, els altres 9 es trobaven sobre-expressats (hsa-miR-1275, hsa-miR-3201, hsa-miR-3609, hsa-miR-941, hsa-miR-625, hsa-miR-17*, hsa-miR-4321, hsa-miR-181b, hsa-miR-647). Pel que fa als snoRNAs i ncRNAs, es va veure que tots estaven sobre-expressats.

Grup de pacients control als 0 mesos envers grup de pacients problema als 0 mesos					
miRNA	p-valor	Fold change	miRNA	p-valor	Fold change
hsa-miR-1275	0,014	6,68	hsa-miR-4321	0,029	1,83
hsa-miR-3201	0,008	3,66	mgU12-22-U4-8	0,017	1,77
hsa-miR-3609	0,033	3,34	snR38C	0,014	1,7
hsa-miR-941	0,048	3,13	HBII-85-8	0,010	1,69
hsa-miR-625	0,026	2,88	hsa-miR-181b	0,048	1,63
U35A	0,026	2,83	U41	0,031	1,58
hsa-miR-17*	0,048	2,59	U84	0,007	1,56
ENSG00000252543	0,049	2,13	hsa-miR-647	0,035	1,51
U57	0,010	2,01	hsa-miR-4746-5p	0,011	-1,69
U91	0,038	1,9	hsa-miR-675*	0,043	-1,76
HBII-429	0,033	1,9			

Taula 2. MiRNAs, snoRNAs i ncRNAs que presenten diferències significatives quan es comparen els perfils d'expressió del grup de pacients control (*good-outcome*) als 0 mesos envers el grup pacients problema (*bad-outcome*) als 0 mesos. MiRNAs, snoRNAs i ncRNAs, amb els seus respectius p-valors i nivells de sobre o infra-expressió (*fold change*), que presenten diferències significatives (p-valor <0,05) quan es comparen els perfils d'expressió dels pacients del grup control (*good-outcome*) als 0 mesos envers els perfils d'expressió dels pacients del grup problema (*bad-outcome*) als 0 mesos.

Per altra banda, a la **Taula 3** s'aprecien els miRNAs, snoRNAs i ncRNAs que presentaven diferències significatives (p-valor <0,05) quan es compararen els patrons d'expressió dels pacients que havien tingut una mala recuperació funcional (grup problema o *bad-outcome*) als 3 mesos amb els perfils d'expressió dels mateixos pacients als 0 mesos. En aquest es varen detectar 57 miRNA, snoRNAs i ncRNAs amb diferències significatives. Per ser més exactes, s'identificaren 46 miRNAs (hsa-let-7g, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-29b-2*, hsa-miR-126, hsa-miR-363, hsa-miR-1909*, hsa-miR-433, hsa-miR-346, hsa-miR-4322, hsa-miR-200c, hsa-miR-106b*, hsa-miR-943, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-4539, hsa-miR-4321, hsa-miR-3135b, hsa-miR-4655-5p, hsa-miR-3130-5p, hsa-miR-378g, hsa-miR-1229, hsa-miR-941-3, hsa-miR-941-4, hsa-miR-4461, hsa-miR-1299, hsa-miR-4537, hsa-miR-3200, hsa-miR-1913, hsa-miR-2392, hsa-miR-663, hsa-miR-4525, hsa-miR-1538, hsa-miR-432*, hsa-miR-4676-5p, hsa-miR-4312, hsa-miR-663b, hsa-miR-4255, hsa-miR-500a, hsa-miR-574, hsa-miR-501, hsa-miR-4474-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-1302-3, hsa-miR-548h-2, hsa-miR-4706, hsa-miR-4668-5p, hsa-miR-3613-3p) i 11 snoRNAs i ncRNAs (ENSG00000238612, ENSG00000239005, ENSG00000238893, mgU12-22-U4-8, HBII-52-44, ENSG00000251838, U14B, ENSG00000202537, ACA32, U30, spike_in-control-36). A més també es va veure que 39 d'aquests miRNA estaven sobre-expressats (hsa-let-7g, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-29b-2*, hsa-miR-126, hsa-miR-363, hsa-miR-1909*, hsa-miR-433, hsa-miR-346, hsa-miR-4322, hsa-miR-200c, hsa-miR-106b*, hsa-miR-943, hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-4539, hsa-miR-4321, hsa-miR-3135b, hsa-miR-4655-5p, hsa-miR-3130-5p, hsa-miR-378g, hsa-miR-1229, hsa-miR-941-3, hsa-miR-941-4, hsa-miR-4461, hsa-miR-1299, hsa-miR-4537, hsa-miR-3200, hsa-miR-1913, hsa-miR-2392, hsa-miR-663, hsa-miR-4525, hsa-miR-1538, hsa-miR-432*, hsa-miR-4676-5p, hsa-miR-4312, hsa-miR-663b, hsa-miR-4255, hsa-miR-500a, hsa-miR-574, hsa-miR-501). Per contra, els altres 7 es trobaven infra-expressats (hsa-miR-4474-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-1302-3, hsa-miR-548h-2, hsa-miR-4706, hsa-miR-4668-5p, hsa-miR-3613-3p). Pel que fa als snoRNAs i ncRNAs, es va veure que n'hi havia 4 que estaven sobre-expressats (ENSG00000238612, ENSG00000239005, ENSG00000238893, mgU12-22-U4-8). D'aquesta manera, els altres 7 estaven infra-expressats (HBII-52-44, ENSG00000251838, U14B, ENSG00000202537, ACA32, U30, spike_in-control-36).

Grup de pacients problema als 3 mesos envers grup de pacients problema als 0 mesos					
miRNA	p-valor	Fold change	miRNA	p-valor	Fold change
hsa-let-7g	0,035	21,59	ENSG00000239005	0,035	1,77
hsa-miR-331-5p	0,027	10,69	ENSG00000238893	0,027	1,72
hsa-miR-29b-2*	0,017	9,84	hsa-miR-663	0,027	1,72
hsa-miR-126	0,016	8,77	hsa-miR-4525	0,049	1,7
hsa-miR-363	0,045	6,79	mgU12-22-U4-8	0,026	1,65
hsa-miR-1909*	0,002	5,37	hsa-miR-1538	0,046	1,64
hsa-miR-433	0,047	4,99	hsa-miR-432*	0,037	1,62
hsa-miR-346	0,020	4,4	hsa-miR-4676-5p	0,003	1,57
hsa-miR-4322	0,014	3,99	hsa-miR-4312	0,031	1,56
hsa-miR-200c	0,030	3,88	hsa-miR-663b	0,011	1,56
hsa-miR-106b*	0,046	3,5	hsa-miR-4255	0,049	1,56
hsa-miR-943	0,030	2,79	hsa-miR-500a	0,021	1,55
hsa-miR-3187-3p	0,022	2,73	hsa-miR-574	0,001	1,53
hsa-miR-4539	0,044	2,69	hsa-miR-501	0,030	1,52
hsa-miR-4321	0,007	2,62	HBII-52-44	0,048	-1,51
hsa-miR-3135b	0,008	2,41	ENSG00000251838	0,020	-1,52
hsa-miR-4655-5p	0,040	2,39	U14B	0,031	-1,52
hsa-miR-3130-5p	0,035	2,3	hsa-miR-4474-5p	0,029	-1,52
hsa-miR-378g	0,013	2,27	hsa-miR-19a	0,041	-1,54
hsa-miR-1229	0,004	2,27	hsa-miR-1302-3	0,044	-1,55
ENSG00000238612	0,006	2,24	hsa-miR-548h-2	0,010	-1,59
hsa-miR-941-3	0,039	2	ENSG00000202537	0,019	-1,61
hsa-miR-941-4	0,049	2	ACA32	0,029	-1,75
hsa-miR-4461	0,010	1,96	U30	0,012	-2,2
hsa-miR-1299	0,044	1,94	spike_in-control-36	0,046	-2,56
hsa-miR-4537	0,034	1,82	hsa-miR-4706	0,048	-2,57
hsa-miR-3200	0,005	1,81	hsa-miR-4668-5p	0,040	-4,08
hsa-miR-1913	0,038	1,8	hsa-miR-3613-3p	0,035	-10,52
hsa-miR-2392	0,024	1,78			

Taula 3. MiRNAs, snoRNAs i ncRNAs que presenten diferències significatives quan es comparen els perfils d'expressió del grup de pacients problema (*bad-outcome*) als 3 mesos envers el grup pacients problema als 0 mesos. MiRNAs, snoRNAs i ncRNAs, amb els seus respectius p-valors i nivells de sobre o infra-expressió (*fold change*), que presenten diferències significatives (p-valor <0,05) quan es comparen els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients del grup problema (*bad-outcome*) als 3 mesos envers els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients del mateix grup (*bad-outcome*) als 0 mesos.

Finalment, a la **Taula 4** es representen els miRNAs, snoRNAs i ncRNAs que presentaven diferències significatives (p-valor <0,05) quan es compararen els patrons d'expressió dels pacients que havien tingut una bona recuperació funcional (grup control o *good-outcome*) als 3 mesos amb els patrons d'expressió dels mateixos pacients als 0 mesos. En aquest cas, es varen detectar 19 miRNAs, snoRNAs i ncRNAs amb diferències significatives. Per ser més exactes, s'identificaren 13 miRNAs (hsa-miR-183, hsa-miR-15b, hsa-miR-4492, hsa-miR-4634, hsa-miR-4498, hsa-mir-579, hsa-let-7d-*, hsa-miR-223, hsa-miR-1470, hsa-miR-149, hsa-miR-9-3, hsa-miR-191*, hsa-miR-127-3p) i 6 snoRNAs i ncRNAs (U35B, ENSG00000252138, ENSG00000238383, ENSG00000239188, ENSG00000238851, ENSG00000252277). A més es va veure que 8 d'aquests miRNA estaven sobre-expressats (hsa-miR-183, hsa-miR-15b, hsa-miR-4492, hsa-miR-4634, hsa-miR-4498, hsa-mir-579, hsa-let-7d-*, hsa-miR-223). Per contra, els altres 5 es trobaven infra-expressats (hsa-miR-1470, hsa-miR-149, hsa-miR-9-3, hsa-miR-191*, hsa-miR-127-3p). Per altra banda, pel que fa als snoRNAs i

ncRNAs veiem que només 1 estava sobre-expressat (U35B). D'aquesta manera els altres 5 estaven infra-expressats (ENSG00000252138, ENSG00000238383, ENSG00000239188, ENSG00000238851, ENSG00000252277).

Grup de pacients control als 3 mesos envers grup de pacients control als 0 mesos					
miRNA	p-valor	<i>Fold change</i>	miRNA	p-valor	<i>Fold change</i>
hsa-miR-183	0,036	2,25	ENSG00000238383	0,024	-1,61
U35B	0,020	2,06	hsa-miR-1470	0,011	-1,66
hsa-miR-15b	0,001	1,94	hsa-miR-149	0,032	-1,66
hsa-miR-4492	0,031	1,94	ENSG00000239188	0,021	-1,68
hsa-miR-4634	0,009	1,81	ENSG00000238851	0,017	-1,71
hsa-miR-4498	0,013	1,77	hsa-miR-9-3	0,032	-1,73
hsa-mir-579	0,013	1,59	hsa-miR-191*	0,014	-1,95
hsa-let-7d*	0,002	1,56	ENSG00000252277	0,041	-2
hsa-miR-223	0,025	1,53	hsa-miR-127-3p	0,047	-2,09
ENSG00000252138	0,003	-1,59			

Taula 4. MiRNAs, snoRNAs i ncRNAs que presenten diferències significatives quan es comparen els perfils d'expressió del grup de pacients control (*good-outcome*) als 3 mesos envers el grup pacients control als 0 mesos MiRNAs, snoRNAs i ncRNAs, amb els seus respectius p-valors i nivells de sobre o infra-expressió (*fold change*), que presenten diferències significatives (p-valor <0,05) quan es comparen els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients del grup control (*good-outcome*) als 3 mesos envers els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients del mateix grup (*good-outcome*) als 0 mesos.

Posteriorment, i tal com apareix representat a la **Figura 1** es cercaren miRNAs que fossin significatius a més d'una comparació. Es va veure que només hi havia coincidències quan es comparaven els miRNAs que presentaven diferències significatives a la comparació dels patrons d'expressió del grup de pacients control als 0 mesos envers el grup de pacients problema als 0 mesos amb els perfils d'expressió dels pacients del grup de problema als 3 mesos envers els mateixos als 0 mesos. Concretament coincidia 1 miRNAs (**hsa-miR-4321**); aquest estava sobre-expressat a les dues comparacions, tant quan comparàvem els patrons d'expressió dels pacients control envers el problema als 0 mesos (*fold change* 1,83, p-valor: 0,029) com quan comparàvem els patrons d'expressió dels pacients problema als 3 mesos envers els patrons d'expressió dels mateixos als 0 mesos (*fold change* 2,62, p-valor: 0,007).

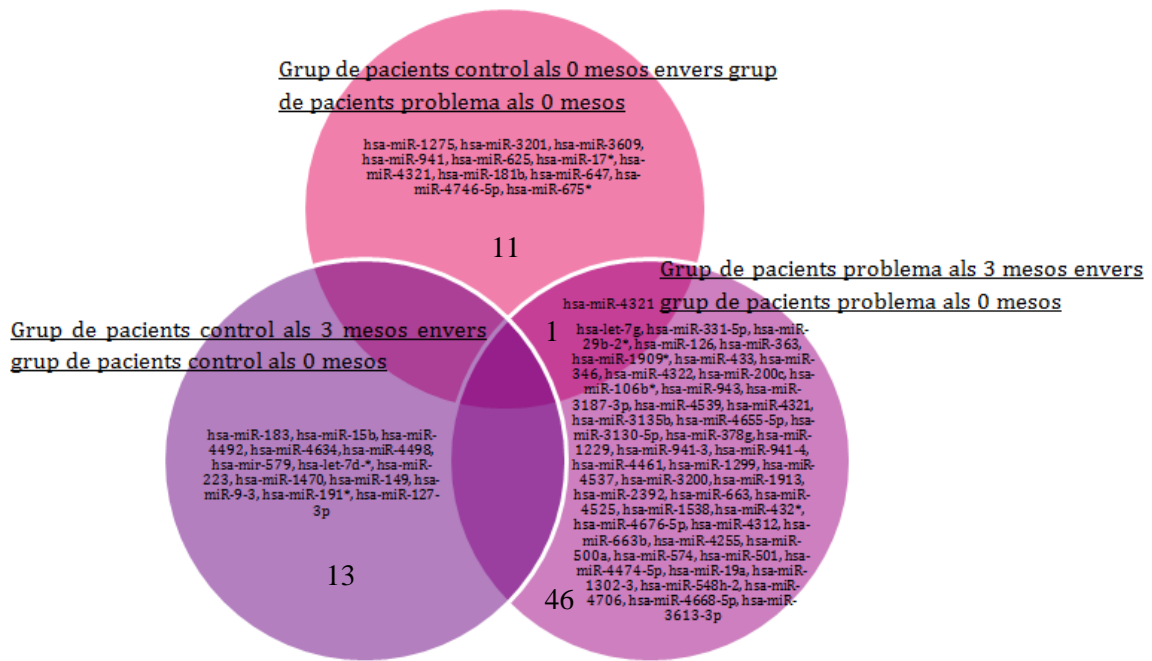


Figura 1. Representació en forma de diagrama de Venn dels miRNAs amb diferències significatives. Representació en forma de diagrama de Venn i nombre de miRNAs que presenten diferències significatives quan es comparen els perfils d'expressió del grup de pacients control als 0 mesos envers el grup de pacients problema als 0 mesos, els perfils d'expressió del grup de pacients problema als 3 mesos envers els mateixos als 0 mesos i els perfils d'expressió del grup de pacients control als 3 mesos envers els mateixos als 0 mesos. A més també es representen els miRNAs que coincideixen entre les diverses comparacions.

Per altra banda, i tal com apareix representat a la **Figura 2** es cercaren snoRNAs i ncRNAs que fossin significatius a més d'una comparació. Es va veure que només hi havia coincidències quan es comparaven els snoRNAs i ncRNAs que presentaven diferències significatives a la comparació dels patrons d'expressió del grup de pacients control als 0 mesos envers el grup de pacients problema als 0 mesos amb els perfils d'expressió dels pacients del grup de problema als 3 mesos envers els mateixos als 0 mesos. Concretament en coincidia 1 ncRNA (*mgU12-22-U4-8*); aquest estava sobre-expressat a les dues comparacions, tant quan comparàvem els patrons d'expressió dels pacients control envers el problema als 0 mesos (*fold change*: 1,77, *p*-valor: 0,017) com quan comparàvem els patrons d'expressió dels pacients problema als 3 mesos envers els patrons d'expressió dels mateixos als 0 mesos (*fold change*: 1,65, *p*-valor: 0,026).

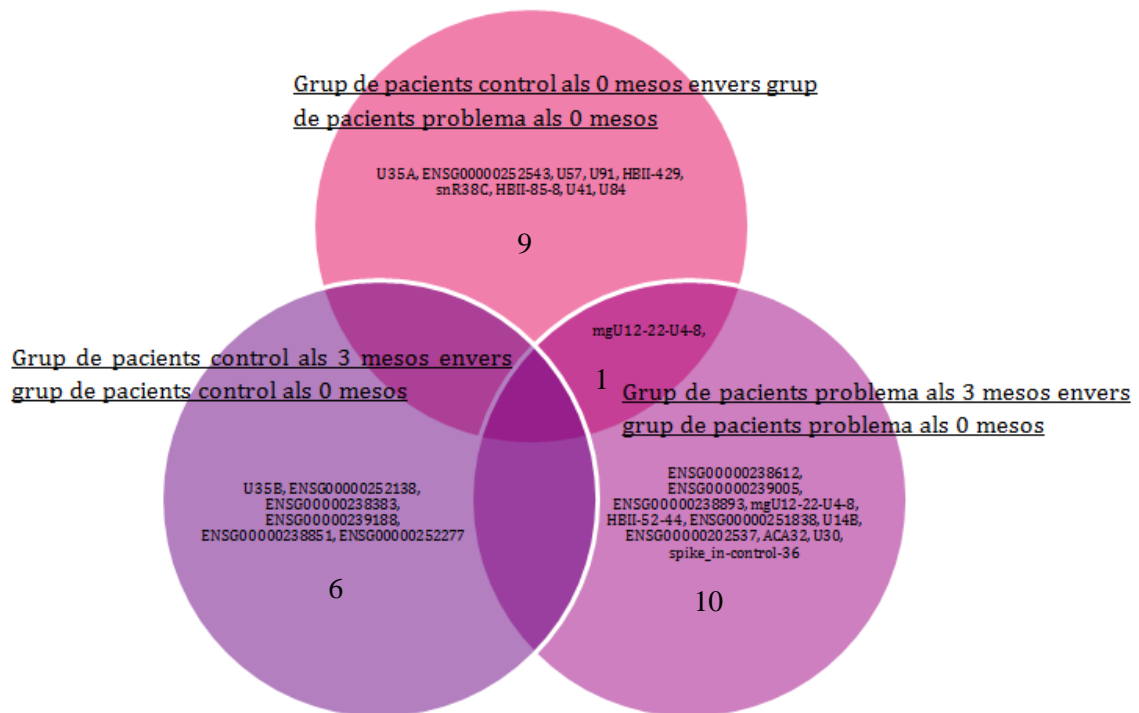


Figura 2. Representació en forma de diagrama de Venn dels snoRNAs i ncRNAs amb diferències significatives. Representació en forma de diagrama de Venn i nombre de snoRNAs i ncRNAs que presenten diferències significatives quan es comparen els perfils d'expressió del grup de pacients control envers el grup de pacients problema als 0 mesos, els perfils d'expressió del grup de pacients problema als 3 mesos envers els mateixos als 0 mesos i els perfils d'expressió del grup de pacients control als 3 mesos envers els mateixos als 0 mesos. A més també es representen els snoRNAs i ncRNAs que coincideixen entre les diverses comparacions.

Posteriorment es va realitzar una comparació dels perfils d'expressió de miRNAs, snoRNAs i ncRNAs dels pacients control als 0 mesos envers els perfils d'expressió del mateix grup als 3 mesos (*good 3m*), els perfils d'expressió del grup problema als 0 mesos (*bad 0m*) i els perfils d'expressió del grup problema als 3 mesos (*good 3m*). Els miRNAs que estan sobre-expressats o infra-expressats apareixen a la **Figura 3** on es pot veure una representació dels *clusters* jeràrquics de miRNAs, snoRNAs i ncRNAs.

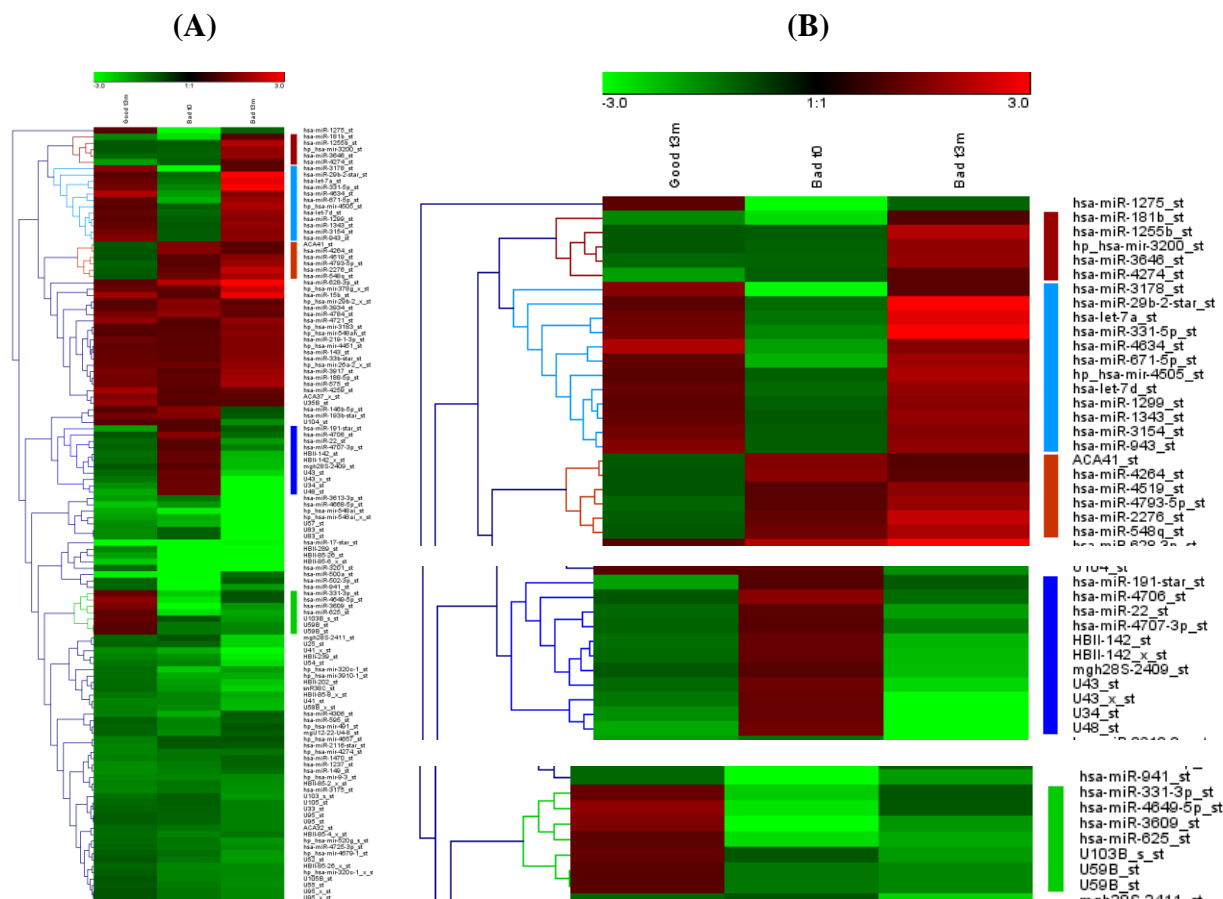


Figura 3. Representació dels clusters jeràrquics de miRNAs, snoRNAs i ncRNAs (A) Representació dels clusters jeràrquics de miRNAs, snoRNAs i ncRNAs on es comparen els perfils d'expressió de dels pacients control als 0 mesos amb els perfils d'expressió del mateix grup als 3 mesos (*good 3m*), els perfils d'expressió del grup problema als 0 mesos (*bad 0m*) i els perfils d'expressió del grup problema als 3 mesos (*good 3m*). (B) Amplificació de determinades zones de la figura anterior. Els miRNAs representats de color verd són els que es troben infra-expressats i els representats de color vermell els que estan sobre-expressats a les dues figures.

5. Discussió

A través d'estudis previs realitzats amb organismes *knockout* per determinats components que intervien en les vies de biogènesi dels miRNAs, tals com són DGCR8 i *Dicer*, s'ha demostrat el paper essencial d'aquestes molècules en el desenvolupament del sistema nerviós central¹⁷. Moltes vegades els miRNAs es transcriuen en *clusters*, així la deleció d'un miRNA determinat que forma part d'un *cluster* pot alterar l'expressió d'altres miRNAs que formen part del mateix. Així, també es duen a terme altres estudis on es suprimeixen *clusters* de miRNAs determinats per estudiar funcions més específiques¹⁷.

Els miRNAs també intervien en la regulació de la proliferació, migració i morfogènesi de les cèl·lules endotelials, d'aquesta manera presenten un paper essencial en l'angiogènesi¹⁸. Els podem separar en dos grups segons els efectes que presenten sobre aquest procés: existeixen miRNAs pro-angiogènics, que són els que promouen l'angiogènesi; i miRNAs anti-angiogènics, els quals l'eviten o dificulten¹⁸.

Per altra banda, els miRNAs també intervenen en la regulació de la neurogènesi. D'aquesta manera juntament amb els factors epigenètics i determinades senyals extrínseques cel·lulars permeten la formació de noves neurones funcionals a partir de les cèl·lules mare neuronals, la renovació de les mateixes, l'especificació del destí de les noves cèl·lules i la seva migració, maduració i integració¹⁹.

A més, els miRNAs també intervenen en la regulació de la neuritogènesi i la sinaptogènesi, processos essencials en la recuperació funcional posterior a l'ictus isquèmic. El desenvolupament de les sinapsis i de la plasticitat cerebral són processos fonamentals per l'aprenentatge, la memòria i el coneixement¹⁰. Els mRNAs que intervenen en els mecanismes de sinaptogènesi solen estar localitzats a les dendrites neuronals i codifiquen per diverses proteïnes implicades en la transducció de senyals, la remodelació del citoesquelet i el transport i la degradació de proteïnes, entre altres. Així algunes de les proteïnes implicades en les vies de senyalització necessàries perquè es produeixin els canvis morfològics en les connexions sinàptiques són: *Mitogen-activated Protein Kinase C* (MAPK), *Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase* (CaMK) i *Protein Kinase C* (PKC)¹⁰. Per altra banda, en els processos de neuritogènesi també es requereixen mecanismes de remodelació del citoesquelet, on hi intervé la *Microtubule-Associated Protein 2* (MAP2), entre d'altres¹⁰.

D'aquesta manera veiem que els miRNAs són molècules que presenten papers essencials en els processos de modulació de les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic ja que intervenen en els mecanismes d'angiogènesi, neurogènesi, neuritogènesi i sinaptogènesi.

A partir dels resultats anteriors, es seleccionaren una sèrie de miRNAs per ser estudiats amb més profunditat. La major part de la recerca es va centrar en els miRNAs que presentaven uns valors de sobre-expressió o infra-expressió (*fold change*) molt alts o molt baixos, respectivament i uns p-valors molt significatius a la comparació dels perfils d'expressió del grup de pacients control als 0 mesos envers els perfils d'expressió del grup de pacients problema als 0 mesos. Posteriorment, es va dur a terme una recerca bibliogràfica exhaustiva sobre les possibles implicacions de la desregulació d'aquests miRNAs en relació a la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic, a més de la identificació dels potencials gens diana regulats per aquests miRNAs i la seva relació amb la modulació dels mecanismes de recuperació funcional posteriors al procés isquèmic.

Inicialment es va dur a terme una recerca bibliogràfica exhaustiva sobre els miRNAs que estaven sobre-expressats de manera significativa a la comparació del grup de pacients control als 0 mesos envers el grup de pacients problema als 0 mesos i dels seus potencials gens diana.

Pel que fa al hsa-miR-1275 (*fold change*: 6,68, p-valor: 0,014) es va veure que la seva desregulació està molt relacionada amb processos cancerígens, d'aquesta manera ens fa pensar que aquest miRNA pugui tenir papers essencials amb la regulació del cicle cel·lular, influint així també amb la modulació de la proliferació i apoptosi cel·lular. Un estudi va demostrar que aquest miRNA, juntament amb altres, es troba altament expressat a les mitocondries, la qual cosa el fa molt interessant ja que aquest orgànuls són altament importants pel que fa a la regulació de la supervivència i/o apoptosi cel·lular²⁰. Així, la modulació post-transcripcional a nivell mitocondrial permetria una regulació molt sensible, ràpida i adaptada a les condicions i demandes metabòliques cel·lulars²⁰. Posteriorment, en aquest estudi es cercaren els potencials gens diana dels miRNAs que abundaven a les mitocondries, els quals se'ls va anomenar mitomiRs, per conèixer amb més profunditat les seves implicacions a nivell cel·lular²⁰. Per altra banda, un altre estudi dut a terme amb dones embarassades va relacionar una desregulació dels nivells d'expressió d'aquest miRNA amb defectes del tub neural al fetus, tals com anancefàlia i espina bífida, oferint així noves possibilitats de diagnòstic prenatal no invasiu i suggerint

la seva possible implicació en els processos de neurodesenvolupament²¹. En aquest estudi es va veure que el sèrum extret de les dones embarassades de fetus amb defectes del tub neural presentava uns baixos nivells d'expressió del hsa-mi-1275 tant a nivell d'*array* com en la posterior validació a través de la PCR quantitativa²¹, confirmant així les seves implicacions a nivell de neurodesenvolupament. Per altra banda, un altre estudi indica que aquest miRNA intervé en la regulació de la traducció dels gens que codifiquen per tres *Insulin-like Growth Factor-2-mRNA-Binding Proteins* (*IGF2BP1*, *IGF2BP2*, *IGF2BP3*)²². A més també es va veure que aquest miRNA es trobava infra-expressat als teixits amb hepatocarcinoma cel·lular, per la qual cosa podria actuar com a supressor tumoral pel seu paper regulador sobre determinats oncògens: *IGF2BPs* i *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor* (*IGF1R*)²².

Posteriorment, es va fer una recerca dels potencials gens diana regulats per aquest miRNA que tenien un major percentatge d'homologia i que poguessin estar relacionats amb la modulació de les vies de recuperació funcional posteriors al procés isquèmic. Se'n destacaren els següents: *Glutamate Receptor Interacting Protein 2* (*GRIP2*), *Vesicle-Associated Membrane Protein 2* (*VAMP*) o *Synaptobrevin 2*, *Interleukin 13 Receptor- α 1* (*IL13RA1*), *Actin- β* (*ACTB*), *Neurofascin* (*NFASC*), *Microtubule-Associated Protein 1A* (*MAP1A*), *Syntaxilin* (*SNPH*), *Matrix Metalloproteinase 24* (*MMP24*) o *Matrix Type-5 Metalloproteinase* (*MT5-MMP*), *Neuroigin 2* (*NLGN2*), *Neuronal Differentiation 2* (*neuroD2*), *NFKB Activating Protein-Like* (*NKAPL*), *Integrin- α 11* (*ITGA11*). Així aquest miRNA possiblement intervé en els mecanismes de neurogènesi on s'han de coordinar els mecanismes de remodelació del citoesquelet i d'exocitosi cel·lular. Les vesícules exocítiques de les cèl·lules es desplacen a través del citoesquelet per arribar a la perifèria cel·lular on es fusionaran amb la membrana per així incrementar la mida de l'àrea de la superfície neuronal²³. Aquesta fusió es duu a terme mitjançant l'acció de les proteïnes SNARE: *vesicle* SNARE (*v-SNARE*) i *target* SNARE (*t-SNARE*), entre les quals a nivell neuronal destaca la *Vesicle-Associated Membrane Protein 2* (*VAMP*) o *Synaptobrevin 2* que forma part de les *v-SNARE*²³. Per altra banda, també seran necessàries les remodelacions a nivell de citoesquelet on hi estaran implicades les següents proteïnes: *Actin- β* (*ACTB*), *Microtubule-Associated Protein 1A* (*MAP1A*) i *Integrin- α 11* (*ITGA11*), entre d'altres. Per altra banda, les interaccions entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular també són imprescindibles per establir les característiques pròpies del teixit neuronal durant la regeneració. En aquest punt les *Matrix Metalloproteinases* (*MMPs*) tenen papers essencials; aquestes proteïnes són una família d'endopeptidases dependents de zinc responsables de la degradació dels components de la matriu extracel·lular. Concretament les *Matrix Type-Metalloproteinases* (*MT-MMPs*) es troben ancorades a les membranes cel·lulars a través d'un domini transmembrana i presenten funcions implicades amb la proliferació i migració cel·lular. La *MT5-MMP* és la *MT-MMP* que mostra una expressió més específica, concretament es troba molt expressada al cervell, d'aquesta manera podria intervenir en els processos de desenvolupament i manteniment del sistema nerviós; tanmateix el seu paper encara no està del tot clar²⁴. Un altre gen que pareix estar implicat en els processos de neurogènesi és el *neuroD2* ja que s'ha vist que la seva expressió induïx la neurogènesi en les cèl·lules ectodèrmiques dels embrions de *Xenopus*²⁵. A més també es suggereix que aquest miRNA també intervé en processos de transducció de senyals i activació de vies pro-inflamatòries (*IL13RA1*, *NKAPL*) i en els mecanismes de neuritogènesi (*NFASC*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23114>) i sinaptogènesi (*NLGN2*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57555>). D'aquesta manera veiem que aquest miRNA presenta una gran importància pel que fa a múltiples processos relacionats amb la modulació de les vies de recuperació funcional: regulació del cicle cel·lular, neurodesenvolupament, remodelació del citoesquelet, entre d'altres. Així podria ser un bon candidat per estudis funcionals posteriors com a conseqüència de les seves possibles implicacions en la recuperació funcional posterior al procés isquèmic.

Per altra costat, es va veure que la desregulació del hsa-miR-3201 (*fold change*: 3,66, p-valor: 0,008) també està relacionada amb processos cancerosos, suggerint també el seu paper amb la regulació del cicle cel·lular i la modulació de la proliferació i apoptosi cel·lular. Pel que fa als gens diana relacionats amb les vies de recuperació funcional que presentaven un major percentatge d'homologia, es destacaren els següents: *SLIT and NTRK Like Family Member 1 (SLITRK1)* i *Neurofascin (NFASC)*, els quals també estaven implicats en els mecanismes de neuritogènesi (SLITRK1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114798>) i (NFASC) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23114>). Diversos articles relacionen les proteïnes de la família SLITRK (1-6), les quals estan altament expressades en el sistema nerviós, amb certs trastorns psiquiàtrics²⁶, tals com el trastorn obsessiu compulsiu, el trastorn bipolar i l'esquizofrènia. Concretament el gen *SLITRK1* codifica per una proteïna integral de membrana implicada amb els processos de neuritogènesi²⁷. A més, un estudi del metiloma a nivell cerebral va determinar que aquest gen es troba pròxim a determinades *tissue-specific differentially methylated regions (TS-DMRs)*, per la qual cosa és susceptible de patir modificacions epigenètiques les quals també poden intervenir en la modulació de la seva expressió²⁷. Per altra banda, també es relaciona una disminució de l'expressió d'aquest gen amb la distròfia miotònica de tipus I²⁸, insinuant així la seva importància a nivell del sistema nerviós. A més, als cultius cel·lulars dels pacients que patien aquesta patologia s'apreciaren alteracions de la sinaptogènesi i neuritogènesi, suggerint així el seu important paper en la regulació d'aquestes vies²⁸. Per altra banda, la neurofascina (NFASC) és una proteïna implicada amb l'adhesió cel·lular que presenta diverses isoformes, les quals tenen diferents patrons d'expressió espacial i temporal. La seva funció es relaciona amb el creixement i la fasciculació de les neurites; a més de l'organització del nòdul de Ranvier en les primeres etapes del desenvolupament²⁹.

Pel que fa al hsa-miR-3609 (*fold change*: 3,34, p-valor: 0,033) es va veure que els gens diana que presentaven un percentatge d'homologia més alt i que podien estar implicats amb les vies de recuperació funcional eren: *Cytoskeleton Associated Protein 2 (CKAP2)*, *Fibronectin type III and SPRY Domain containing 1-Like (FSD1L)*, *ADAM Metallopeptidase domain 22 (ADAM22)*, *Glutamate Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1)*, *Neuroregulin 3 (NRG3)*, *Fibronectin Leucine Rich Transmembrane protein 3 (FLRT3)* i *Integrin-β8 (ITGB8)*. Així es suggereix que aquest miRNA podria intervenir en la regulació dels mecanismes de remodelació del citoesquelet (CKAP2, FSD1L, FLRT3, ITGB8), del teixit i en la ruptura de les matrius extracel·lulars (ADAM22) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53616>) essencials per a neurogènesi. Per altra banda, també es proposen les seves implicacions en la regulació de la proliferació, migració, diferenciació i supervivència o apoptosi de les cèl·lules neuronals (NRG3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10718>). La neuroregulina 3 (NRG3) és una proteïna de la família de les neuroregulines que presenta múltiples funcions a nivell de desenvolupament. A més, determinades variacions de la mateixa s'associen amb molts trastorns del neurodesenvolupament, tals com l'autisme o l'esquizofrènia³⁰, d'aquesta manera es suggereix el seu important paper a nivell de desenvolupament del sistema nerviós.

A través de la recerca bibliogràfica relacionada amb el hsa-miR-941 (*fold change*: 3,13, p-valor: 0,048) es va veure que la seva desregulació es relaciona amb processos cancerígens³¹ i colitis ulcerosa³², suggerint així també el seu paper en la regulació del cicle cel·lular i la modulació de la proliferació i apoptosi cel·lular. Un estudi relacionat amb el carcinoma hepatocel·lular va demostrar que aquest miRNA es trobava infra-expressat i hipermetilat en aquestes cèl·lules³¹. Per altra banda, també es varen dur a terme estudis *in vitro*, els quals demostraren que la seva sobre-expressió disminuïa els mecanismes de proliferació, migració i invasió cel·lular típics dels processos cancerígens³¹. A més es va identificar el gen que codifica per la *lysine (K)-specific Demethylase 6B*

(*KDM6B*) com a potencial gen diana del miRNA, el qual com el seu nom indica està relacionat amb els processos de metilació dels àcids nucleics³¹.

Per altra banda es va veure que la desregulació del *hsa-miR-625* (*fold change*: 2,88, p-valor: 0,026) també s'ha relacionat amb els processos cancerosos a més de la narcolèpsia³³, entre d'altres. Un estudi va establir una relació entre la desregulació d'aquest miRNA i els nivells de colesterol circulants³⁴, els quals constitueixen un factor de risc vascular implicat en el procés isquèmic. Respecte el gens diana que presentaven un major percentatge d'homologia, ens varem centrar amb el *Claudin 11 (CLDN11)* el qual mostra un important paper en la regulació de la proliferació i migració dels oligodendròcits. Els oligodendròcits exhibeixen papers essencials en la producció i manteniment de les beines de mielina del sistema nerviós, per així permetre una conducció més ràpida i eficient de l'impuls nerviós a través dels axons neuronals. Es va dur a terme un estudi on es determinaren els perfils d'expressió de miRNAs dels oligodendròcits en procés de diferenciació per després identificar els principals gens diana regulats pels mateixos i es va veure que un d'aquests gens implicats era el *CLDN11*, entre d'altres³⁵. D'aquesta manera es proposen les implicacions d'aquest miRNA en la regulació de l'oligodendrocitosi, procés important en la recuperació funcional posterior al procés isquèmic.

Posteriorment, es va passar estudiar amb més profunditat els miRNAs que estaven infra-expressats de manera significativa a la mateixa comparació (perfils d'expressió de miRNA als 0 mesos del grup de pacients control envers els perfils d'expressió del grup de pacients problema als 0 mesos). Pel que fa al *hsa-miR-4746-5p* (*fold change*: -1,69, p-valor: 0,011), es destacaren els següents gens diana: *Mitogen-Activated Protein Kinase kinase 7 (MAP3K7)*, amb un 86% d'homologia i *Dynein Axonemal Light chain 4 (DNAL4)*, amb un 77% d'homologia. Així es va relacionar la desregulació d'aquest miRNA amb possibles alteracions en la transducció de diverses vies de senyalització (*MAP3K7*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6885>), tals com l'apoptosi i el transport de proteïnes (*DNAL4*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10126>), suggerint així el seu possible paper en les vies de recuperació funcional posteriors al procés isquèmic.

Per altra costat, també s'ha relacionat el *hsa-miR-675** (*fold change*: -1,76, p-valor: 0,043) amb processos cancerígens a més de la regulació de vies implicades amb la supervivència de les cèl·lules esquelètiques³⁶. Concretament, un estudi relacionat amb l'osteoporsió va determinar que la inhibició d'aquest miRNA permetia una major proliferació, diferenciació i adhesió de les cèl·lules esquelètiques³⁶, proposant així el seu paper en els processos de desenvolupament i proliferació cel·lular i suggerint les seves possibles implicacions en la regulació del desenvolupament d'altres sistemes o teixits corporals, com per exemple el sistema nerviós. Pel que fa a als gens diana relacionats que presentaven un major percentatge d'homologia, es varen destacar els següents: *ADAM Metallopeptidase domain 22 (ADAM22)* i *Autophagy related 4A cysteine peptidase (ATG4)*. Així es proposa la intervenció d'aquest miRNA en la regulació dels mecanismes de remodelació dels teixits i ruptura de les matrius extracel·lulars (*ADAM22*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53616>) essencials en la neurogènesi; a més de la modulació dels mecanismes d'autofàgia cel·lular, els quals també presenten papers essencials en la determinació de la supervivència o mort cel·lular (*ATG4*)³⁷ i per tant estan relacionats amb el neurodesenvolupament. Els mecanismes d'autofàgia integren una sèrie de vies catabòliques que presenten com a objectiu primordial el reciclatge dels components citoplasmàtics a través de la formació d'autofagosomes on s'acumulen els components que es volen eliminar fins que es transporten als lisosomes on seran degradats³⁷, d'aquesta manera la desregulació d'aquests processos pot influir amb la supervivència cel·lular.

Finalment també es va fer una recerca bibliogràfica del hsa-miR-4321, el qual coincidia dues de les comparacions que es varen dur a terme. Es va veure la seva desregulació es relaciona amb la *Visceral Leishmaniasis* (VL), que és una malaltia inflamatòria multifactorial³⁸. Pel que fa als seus potencials gens diana, se'n va destacar un: *Dual specificity Tyrosine phosphorylation Regulated Kinase 1* (*DYRK1A*), amb un 88% d'homologia. Així, es suggereix que aquest miRNA presenta un paper en la transducció de diverses vies de senyalització, les quals intervenen en la regulació de la proliferació cel·lular i en el desenvolupament cerebral (*DYRK1A*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1859>). En el nostre treball, estava sobre-expressat a les dues comparacions, tant quan comparàvem els patrons d'expressió del grup de pacients control als 0 mesos envers els patrons d'expressió del grup de pacients problema als 0 mesos (*fold change* 1,83, p-valor: 0,029); com quan comparàvem els patrons d'expressió dels pacients problema als 3 mesos envers els patrons d'expressió dels mateixos als 0 mesos (*fold change* 2,62, p-valor: 0,007). Així aquests resultats ens poden fer pensar que aquest miRNA podria estar implicat amb la modulació dels processos de recuperació funcional; els quals es duen a terme a etapes primerenques en els pacients del grup control (es troba sobre-expressat als 0 mesos en els pacients del grup control) i a etapes més tardanes en els pacients del grup problema (es troba sobre-expressat als 3 mesos en els pacients del grup problema).

D'aquesta manera i tal i com s'esperava a la hipòtesi veiem que els miRNAs que estan més sobre-expressats i infra-expressats de manera significativa quan es compara el perfil d'expressió del grup de pacients control als 0 mesos envers el perfil d'expressió del grup de pacients problema als 0 mesos constitueixen potencials reguladors dels processos de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic. A la **Taula 5** es representen els principals miRNAs que presenten diferències significatives en aquesta comparació, els seus potencials gens diana i les vies de recuperació funcional relacionades amb aquests gens que són modulats pels miRNA corresponents.

Potencials miRNAs implicats amb les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus			
miRNA	<i>Fold change</i>	Gens diana	Vies de recuperació relacionades
hsa-miR-1275	6,68	<i>VAMP, IL13RA1, ACTB, NFASC, MAP1A, SNPH, MMP24, NLGN2, neuroD2, NKAPL, ITGA11</i>	Neurogènesi, neuritogènesi, sinaptogènesi
hsa-miR-3201	3,66	<i>SLITRK1, NFASC,</i>	Neuritogènesi
hsa-miR-3609	3,34	<i>CKAP2, FSD1L, ADAM22, NRG3, FLRT3, ITGB8</i>	Neurogènesi
hsa-miR-625	2,88	<i>CLDN11</i>	Oligodendrocitosi
hsa-miR-4746-5p	-1,69	<i>MAP3K7</i>	Apoptosi
hsa-miR-675*	-1,76	<i>ADAM22, ATG4</i>	Neurogènesi, autofàgia

Taula 5. Potencials miRNAs implicats amb les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus isquèmic. Potencials miRNAs que presenten diferències significatives (p-valor <0,05) quan es comparen els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients del grup control (*good-outcome*) als 0 mesos envers els perfils d'expressió de miRNAs dels pacients del grup problema (*bad-outcome*) als 0 mesos implicats amb les vies de recuperació posteriors a l'ictus isquèmic, nivells de sobre-expressió o infra-expressió (*fold change*), gens diana relacionats amb les vies recuperació funcional amb un major percentatge d'homologia i vies de recuperació funcional amb les quals podrien estar més relacionats aquests gens els quals són modulats pels miRNAs.

A banda d'això, també es proposen altres miRNAs com a biomarcadors de pronòstic funcional del procés d'ictus isquèmic. La família de miRNAs hsa-let-7 està molt relacionada amb l'estat de diferenciació cel·lular¹⁸. En el nostre treball trobem que el miRNA hsa-let-7g està significativament sobre-expressat (*fold change*: 21,59, p-valor: 0,035) quan comparem els perfils d'expressió del grup problema als 3 mesos envers els del mateix grup als 0 mesos. Per altre costat, també veiem que el miRNA hsa-let-7d* està sobre-expressat (*fold change*: 1,56, p-valor: 0,002) de manera significativa, però en aquest cas quan comparem els perfils d'expressió del grup control als 3 mesos envers el mateix grup als 0 mesos. D'aquesta manera podem dir aquests miRNAs podrien relacionar-se amb la modulació de l'estat de diferenciació cel·lular ja que la seva expressió varia amb el temps. Els gens diana del hsa-let-7g que presenten un major percentatge d'homologia i que poden estar relacionats amb les vies de recuperació funcional posteriors a l'ictus són: *ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin type 1 motif 8 (ADAMTS8)*, *Tubulin Tyrosine Ligase-Like family, member 4 (TTLL4)*. Així es suggereix la implicació d'aquest miRNA en la regulació dels mecanismes de remodelació del citoesquelet (TTLL4). Les proteïnes de la família *Tubulin Tyrosine Ligase-Like family (TTLL)* estan implicades en determinades modificacions post-traduccionals essencials, com la poliglutamilació de certes estructures, tals com les dels microtúbuls presents a les neurones³⁹. A més aquest miRNA també pareix estar implicat en la remodelació dels teixits i la ruptura de les matrius extracel·lulars (ADAMTS8), processos essencials per la neurogènesi. Un estudi ha demostrat l'alta expressió d'aquesta proteïna a tot l'encèfal i a més, l'ha relacionada amb proprietats anti-angiogèniques⁴⁰. Per altra banda, els gens diana del hsa-let-7d* que presenten un major percentatge d'homologia i que podrien estar relacionats amb les vies de recuperació funcional són: *Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase-2β (CAMKK2)* i *Protein Kinase cAMP-dependent Catalytic-β (PRKACB)*. Així es suggereix la relació d'aquest miRNA amb la modulació dels processos de transducció de senyal implicats amb la diferenciació i migració neuronal, la neuritogènesi i la sinaptogènesi (CAMKK2 i PRKACB). Els gens *PRKACA* i *PRKACB* codifiquen per les dues subunitats catalítiques de la *cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA)*, α i β respectivament. Un estudi realitzat amb ratolins va demostrar la relació d'una menor activitat de PKA amb un major risc de patir defectes posteriors del tub neural⁴¹, suggerint així els efectes de la desregulació d'aquesta proteïna a nivell de neurodesenvolupament. En aquest treball veiem que als 3 mesos el miRNAs d'aquesta família presenten una expressió molt més elevada en els pacients problema que en els control, suggerint així que el seu paper en l'estat de diferenciació cel·lular, el qual en els pacients problema es produeix a etapes més tardanes.

Un altre miRNAs molt relacionat amb els processos d'angiogènesi o formació de nous vasos sanguinis és el hsa-miR-126. Aquest miRNA intervé en la regulació de diversos aspectes de la biologia cel·lular de l'endoteli, tals com la migració cel·lular, l'organització del citoesquelet i l'estabilitat dels capil·lars. Certs estudis, els quals s'han basat amb la utilització de l'antagomir-126, per inhibir la seva transcripció, han demostrat que aquest miRNA presenta papers essencials en la resposta angiogènica i arteriogènica¹⁸. El seu paper modulador es basa en la presència de múltiples dianes del mateix en els mRNAs que codifiquen per proteïnes que intervenen en la regulació de l'angiogènesi i integritat vascular. D'aquesta manera es considera aquest miRNA com a pro-angiogènic ja que manté el desenvolupament, la regeneració i la integritat vascular¹⁸. A més, podem destacar els gens que presenten un major percentatge d'homologia amb el miRNA són els següents: *Sprouty-Related EVH1 Domain-containing protein 1 (SPRED1)*, *Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit β (PIK3R2)* o *p85-β* i *Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)*¹⁸. En el nostre treball veiem que aquest miRNA està sobre-expressat de manera significativa quan es comparen els perfils d'expressió dels pacients del grup problema als 3 mesos envers els perfils d'expressió del mateix grup als 0 mesos (*fold*

change: 8,77, p-valor: 0,016), suggerint així el seu increment en etapes tardanes per la seva implicació en les vies de recuperació funcional posteriors al procés isquèmic.

Altres miRNAs implicats en els processos d'angiogènesi que presenten diferències significatives en les comparacions que s'han dut a terme en aquest treball són els que s'inclouen en el *cluster* miRNA 17-92. Aquest *cluster* presenta els següents miRNAs: miR-17-5p, miR17-3p, miR-18a, miR-19a, miR20a, miR-19b-1 i miR-92-1. Les seves funcions són les de promoure l'angiogènesi de les cèl·lules tumorals i inhibir la seva apoptosi. El fet de que s'incrementi l'angiogènesi radica amb la supressió o decreixement de l'expressió de la proteïna *Thrombospondin-1* (Tsp-1), la qual actua com a factor anti-angiogènic¹⁸. Per altra banda, l'angiogènesi constitueix una resposta adaptativa tissular a la hipòxia, la qual promou l'actuació dels *Hypoxia Inducible Factors* (HIF), els quals també activaran altres gens pro-angiogènics¹⁸. En aquest treball el miRNA que presenta diferències significatives d'aquest *cluster* és el hsa-miR-19a. Aquest està significativament infra-expressat quan es comparen els perfils d'expressió dels pacients del grup problema als 3 mesos envers els perfils d'expressió del mateix grup als 0 mesos (*fold change*: -1,54, p-valor: 0,041) .

Per acabar, és important dir que els resultats obtinguts en aquest estudi estan pendents de validació en una cohort més àmplia de pacients i mitjançant una altra tècnica, la PCR quantitativa. També caldrà dur a terme estudis funcionals per verificar a nivell experimental el paper modulador de cada miRNA identificat en relació a les vies de recuperació funcional posteriors al procés d'ictus isquèmic. Per altra banda, també es podria analitzar de manera paral·lela el perfil d'expressió de miRNAs dels pacients a nivell de líquid cefaloraquídi, per així poder-lo comparar amb els patrons d'expressió de miRNAs en sang perifèrica.

6. Conclusions

1. Mitjançant *arrays* d'expressió s'han identificat 11 miRNAs d'expressió diferencial entre els pacients que presenten una bona recuperació funcional (*good-outcome*) respecte els pacients que evidencien una marcada discapacitat als 3 mesos després de l'ictus (*bad-outcome*), els quals podrien ser usats com a biomarcadors de pronòstic funcional en l'ictus isquèmic.
2. Els miRNAs on es varen apreciar diferències més significatives, tant a nivell de sobre-expressió com d'infra-expressió, varen ser: hsa-miR-1275, hsa-miR-3201, hsa-miR-3609, hsa-miR-941, hsa-miR-625, hsa-miR-4746-5p, hsa-miR-675*.
3. Caldrà realitzar estudis de validació amb una cohort més àmplia de pacients mitjançant PCR quantitativa per verificar els resultats obtinguts; i estudis funcionals on s'analitzin les implicacions dels miRNA sobre els seus gens diana per determinar els efectes de la desregulació de l'expressió d'aquests gens en les vies de recuperació funcional de la regió isquèmica.

Bibliografía

1. A. Arboix, J. Díaz, A. Pérez-Sempere, J. Á. S. *Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus*. (2001).
2. Matías-Guiu, J. *Estrategia en Ictus del Sistema Nacional de Salud*. (2009).
3. Gil, V. B. J., Alvarez, J. C. & Portella, E. *Sostenibilidad del sistema sanitario. 10 medidas estructurales para afrontar las causas del crecimiento del gasto*. (2010).
4. Sepramaniam, S. *et al.* Circulating MicroRNAs as biomarkers of acute stroke. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 1418–1432 (2014).
5. Rink, C. & Khanna, S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiol. Genomics* **43**, 521–528 (2011).
6. Dm, S., Ic, M. & Sori, O. Plasmatic markers for early diagnostic and treatment decisions in ischemic stroke. *J. Med. Life* **8**, 21–25 (2015).
7. Ajit, S. K. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors* **12**, 3359–3369 (2012).
8. Weiss, J. B. *et al.* MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* **2**, 237–47 (2012).
9. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* **36**, 154–158 (2008).
10. Olde Loohuis, N. F. M. *et al.* MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 89–102 (2012).
11. Jickling, G. C. *et al.* MicroRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets. *PLoS One* **9**, (2014).
12. Kuehbacher, A., Urbich, C. & Dimmeler, S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 12–15 (2008).
13. Neuro-Ictus., G. Escala de rankin modificada. 2009 (2009).
14. Neuro-Ictus., G. Escala NIHSS (National Institute of Health Stroke Score). 1–4
15. Rodriguez, M., Duh, M. M., Lacabra, A., Prades, M. A. & Rosell, J. B. Difusión por Resonancia magnética nuclear (DWI): utilidad en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad Objetivo docente. *Soc. Española Radiol. Médica* 1–40 (2012).
16. Rivera, D. M., Puentes, S. & Caballero, L. Resonancia magnética cerebral: secuencias básicas e interpretación. *Univ. Médica* **52**, 292–306 (2011).
17. Petri, R., Malmevik, J., Fasching, L., Åkerblom, M. & Jakobsson, J. MiRNAs in brain development. *Exp. Cell Res.* **321**, 84–89 (2014).
18. Wu, F., Yang, Z. & Li, G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 549–553 (2009).
19. Shi, Y. *et al.* MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *J. Neurosci.* **30**, 14931–14936 (2010).
20. Bandiera, S. *et al.* Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS One* **6**, (2011).
21. Gu, H. *et al.* Diagnostic role of microRNA expression profile in the serum of pregnant women with fetuses with neural tube defects. *J. Neurochem.* **122**, 641–649 (2012).
22. Fawzy, I. O. *et al.* MiR-1275: A single microRNA that targets the three IGF2-mRNA-binding proteins hindering tumor growth in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.* **589**, 2257–2265 (2015).

23. Gupton, S. L. & Gertler, F. B. Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Dev. Cell* **18**, 725–736 (2010).
24. Hayashita-Kinoh, H. *et al.* Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. *Cell Growth Differ.* **12**, 573–80 (2001).
25. McCormick, M. B. *et al.* NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5792–800 (1996).
26. Proenca, C. C., Gao, K. P., Shmelkov, S. V, Rafii, S. & Francis, S. Slitrks as emerging candidate genes involved in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci* **34**, 143–153 (2011).
27. Davies, M. N. *et al.* Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol.* **13**, R43 (2012).
28. Marteyn, A. *et al.* Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* **8**, 434–444 (2011).
29. Basak, S. *et al.* Differential expression and functions of neuronal and glial neurofascin isoforms and splice variants during PNS development. *Dev. Biol.* **311**, 408–422 (2007).
30. Kao, W.-T. *et al.* Common genetic variation in Neuregulin 3 (NRG3) influences risk for schizophrenia and impacts NRG3 expression in human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15619–24 (2010).
31. Zhang, P. P. *et al.* DNA methylation-mediated repression of miR-941 enhances lysine (K)-specific demethylase 6B expression in hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 24724–24735 (2014).
32. Duttagupta, R. *et al.* Genome-wide maps of circulating miRNA biomarkers for Ulcerative Colitis. *PLoS One* **7**, (2012).
33. Liu, Z. *et al.* Reproducibility of quantitative real-time PCR assay in microRNA expression profiling and comparison with microarray analysis in narcolepsy. *Springerplus* **4**, 812 (2015).
34. Raitoharju, E. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome. The cardiovascular risk in Young Finns Study. *Mol. Cell. Endocrinol.* **391**, 41–49 (2014).
35. Letzen, B. S. *et al.* MicroRNA expression profiling of oligodendrocyte differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* **5**, (2010).
36. Sun, T., Leung, F. & Lu, W. W. MiR-9-5p, miR-675-5p and miR-138-5p damages the strontium and LRP5-mediated skeletal cell proliferation, differentiation, and adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–15 (2016).
37. Kaufmann, A., Beier, V., Franquelim, H. G. & Wollert, T. Molecular mechanism of autophagic membrane-scaffold assembly and disassembly. *Cell* **156**, 469–481 (2014).
38. Mishra, A. *et al.* IL10 variant g.5311A is associated with visceral leishmaniasis in Indian population. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
39. Rogowski, K. *et al.* A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **143**, 564–578 (2010).
40. Dunn, J. R. *et al.* Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. *Br. J. Cancer* **94**, 1186–93 (2006).
41. Zhu, H. *et al.* Genes encoding catalytic subunits of protein kinase A and risk of spina bifida. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* **73**, 591–596 (2005).