



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología

**Programa de Doctorado  
en Fisiología**

**TESIS DOCTORAL**

Análisis de la expresión de miRNA circulantes en pacientes con infarto agudo de miocardio y su relación con citoquinas. Repercusión funcional en cultivos de células endoteliales humanas.



**DOCTORANDA**

Ana Mompeón Campos

**DIRECTORES**

Dra. Susana Novella del Campo  
Dr. Carlos Hemenegildo Caudevilla



# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología

TESIS DOCTORAL

**Análisis de la expresión de miRNA circulantes en  
pacientes con infarto agudo de miocardio y su  
relación con citoquinas. Repercusión funcional en  
cultivos de células endoteliales humanas.**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA

Doctoranda:

**Ana Mompeón Campos**

Directores:

Dra. Susana Novella del Campo

Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla

Valencia, diciembre 2018





# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología

Dra. Susana Novella del Campo, Profesora Ayudante Doctor del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Valencia y Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Catedrático del Dpto. de Fisiología de la Universidad de Valencia.

## CERTIFICAN:

Que Dña. Ana Mompeón Campos, Licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Análisis de la expresión de miRNA circulantes en pacientes con infarto agudo de miocardio y su relación con citoquinas. Repercusión funcional en cultivos de células endoteliales humanas”** para alcanzar el Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, 3 de diciembre de 2018

Susana Novella del Campo

Carlos Hermenegildo Caudevilla





## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas importantes en el desarrollo de una tesis, por lo que quiero dar las gracias a aquellas que me han ayudado, de una forma u otra, a conseguir llegar hasta aquí.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, la Dra. Susana Novella y el Dr. Carlos Hermenegildo. Gracias por confiar en mí y por toda vuestra ayuda, tiempo, ánimo y consejos. También por crear un ambiente de trabajo inmejorable y conseguir que los linceos seamos más que un grupo. Susana, gracias por aconsejarme y enseñarme a mirar aquello que no entiendo desde otra perspectiva. Carlos, gracias por confiar en mí desde el primer momento y darme la oportunidad de formar parte de tu grupo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio y amigos, los linceos. Gracias por toda vuestra ayuda y todos esos buenos momentos. A Dani y Xavi, por estar dispuestos a ayudarme siempre y por hacer que todas las horas que hemos pasado en el laboratorio hayan sido geniales. A Carlos Bueno, por toda tu ayuda y consejos, sin los que creo que todavía seguiría luchando con las ECAs. Gracias también a Maca y Natalia, y al resto de linceos: Maria Oltra, Christian Alite, Ana Ballestar y Sara Puig.

A la Dra. Ana Paula Dantas del Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Gracias por toda tu ayuda y paciencia resolviendo mis miles de preguntas.

A los pacientes y al Biobanco IBSP-CV (PT13/0010/0064) integrado en la Red Nacional de Biobancos y en la Red Valenciana de Biobancos, por su colaboración.

A Juan Sanchis, Anna Mollar y al servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, por su colaboración en la obtención de muestras y en la recopilación de datos clínicos. Gracias también a los pacientes por participar en el estudio.

A las donantes y al servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, por su colaboración.

Al Prof. Francisco J. Santonja Gómez del Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la Universitat de València. Gracias por tu ayuda y asesoramiento con la parte estadística.

A Guadalupe Herrera, del Servicio de Citometría de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM). Gracias por tu ayuda y paciencia conmigo y el citómetro.

A la Dra. Gloria Segarra y al Dr. Pascual Medina por estar siempre dispuestos a ayudar y por todos los buenos momentos entre tartas y celebraciones. A Isabel, por tu risa contagiosa y tu amabilidad.

A las secretarias del Dpto. de Fisiología, Mari y Elena, por vuestra paciencia y ayuda con todas mis dudas.

A Inma, por tu humor en esas pequeñas conversaciones cuando pasas por el laboratorio.

A nuestros vecinos, el grupo de los “raros”. Gracias en especial a Isa, Ester, Marta y Santi, por compartir momentos tan divertidos y estar siempre dispuestos a prestarnos lo necesario.

Al grupo “Freshage”, gracias a todos por compartir esos buenos momentos a la hora de comer.

Thanks to Prof. Jennifer Gamble from the Centenary Institute in Sydney, for letting me join your lab and thanks for all your help. I would also like to thank Ka Ka, Paul, Jia, Jinbiao, Julie, Angelina, Lisa, Jade, Maryam and special thanks to Yang, for making my stay so nice and for all your help.

Thanks to Dr. Katey Rayner from the University of Ottawa Heart Institute, for giving me the chance to join your lab and thanks for your help and advice. Thanks also to the other lab members: Denuja, My-Anh, Michele, Leah, Hailey, Josh and Zach, for all your help and making my stay so funny and enjoyable.

A Jessica Portero, por contagiarme tu alegría, por tus consejos y por ayudarme a encontrar la “verdad reveladora”.

A Elisa, Jeny, Nuria y Tamara. Gracias por esos ratitos de reencuentros y estar siempre ahí a pesar de la distancia, animándome a continuar.

A David, gracias por tu toque creativo.

A Sergio, por tu apoyo y por ayudarme a desconectar con esas cenas y paseos por el monte.

A mis “cotorros”: Paula, Soraya, Concha y Pablo, porque esta historia empezó con vosotros. Gracias en especial a mis “doctoras por amor al arte”, por compartir este duro camino y por toda vuestra ayuda, consejos y ánimos.

A mi “Nury”, por comprender mi esfuerzo, confiar en mí y no dejar de animarme. Gracias por conseguir que desconecte, hacerme reír y por sacarme de casa y que se nos olvide volver.

A “Elenica”, por compartir este camino, siempre dispuesta a ayudarme y por darme tanta fuerza.

A mis “Cherokees”, por ser tan especiales, por las risas interminables y por tanto cariño. “Pitu”, gracias por ser una *persona caricia*, por ese respeto y admiración y por enseñarme tanto. “Mellis”, gracias por ser tan geniales, por acompañarme todos estos años y por ser capaces de aguantarme. María Soler, gracias por hacerme reír siempre y por aportarme tanta sabiduría. Gracias a ti sabemos qué hacer en momentos de agobio.

A Javi, por acompañarme y volar conmigo. Gracias por todo tu apoyo, ayuda y aguante. También por no dejar de buscar mi sonrisa y por hacer que crea en mí.

A mi “tatica”, por ser lo mejor que tengo y entenderme solo con mirarme. Gracias por tu ayuda, confianza y admiración infinita. Gracias también por no dejar de animarme y conseguir que lllore de la risa en cada momento, por desesperante que sea.

A mis yayos, gracias por todo lo que me enseñasteis y por vuestro amor infinito.

Por último, quiero agradecer de forma especial a mis padres. Gracias por vuestra confianza, apoyo en todas mis decisiones y por permitirme llegar hasta aquí. Si he sido capaz, es porque sois mi ejemplo de trabajo y esfuerzo desde pequeña.

*“Un sueño cumplido siempre  
debe ser impulso” – María Garcés*





**Este trabajo ha sido financiado por:**

Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU13/02235) de los subprogramas de Formación y de Movilidad dentro del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 en I+D+I del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Proyectos FIS-ISCI III PI13/00617 y FIS-ISCI III PI16/00229, Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad.





## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**Ago:** argonauta

**Ang-1:** angiopoyetina-1

**AT1R:** receptor tipo 1 de angiotensina II

**Bcl-2:** B-cell lymphoma 2

**c-myc:** v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

**CCND1:** ciclina D1

**CK-MB:** creatina kinasa isoenzima MB

**CRP:** proteína C reactiva

**cTnl:** troponina I cardiaca

**cTnT:** troponina T cardiaca

**DGCR8:** Di George Syndrome Critical Region gene 8

**ECG:** electrocardiograma

**eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial

**ET-1:** endotelina 1

**ETS-1:** E26 transformation-specific sequence

**FIH-1:** Factor Inhibiting HIF-1 $\alpha$

**fM:** femtomolar

**GATA2:** gata binding protein 2

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HIF-1:** Hypoxia-Inducible Factor 1

**hs-cTnT:** troponina T cardiaca de alta sensibilidad

**IAMCEST:** infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST

**IAMSEST:** infarto agudo de miocardio sin elevación del segmento ST

**ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular

**ICP:** intervención coronaria percutánea

**IFN- $\gamma$ :** interferón gamma

**IL-1 $\beta$ :** interleuquina 1 beta

**IL-6:** interleuquina 6

**IRAK1:** IL-1 receptor associated kinase

**ITGA5:** Integrina  $\alpha$ -5

**JAK-1:** Janus kinase 1

**KLF:** Kruppel-like Factor

**KPNA4:** importin- $\alpha$ 3

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**lncRNA:** RNA largos no codificantes

**MAP3K7:** Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7

**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos

**MCP-1:** Monocyte Chemoattractant Protein 1

**MCP-3:** Monocyte Chemoattractant Protein 3

**miRISC:** complejo silenciador inducido por miRNA

**miRNA:** microRNA

**mRNA:** RNA mensajero

**ncRNA:** RNA no codificante

**NF- $\kappa$ B:** nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

**NO:** óxido nítrico

**nt:** nucleótido

**oxLDL:** lipoproteínas de baja densidad oxidadas

**p65:** nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit

**PAK4:** p21-activated kinase

**PI3K:** phosphatidylinositol 3-kinase

**PIK3R2:** phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2

**pM:** picomolar

**RNA pol II:** RNA polimerasa II

**RNA:** ácido ribonucleico

**RNAse:** ribonucleasa

**ROBO1:** roundabout 1

**RUNX1:** runt-related transcription factor 1

**SCA:** síndrome coronario agudo

**SCASEST:** síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST

**SEMA6A:** semaphorin-6a

**SPRED1:** sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1

**SPRY2:** sprouty 2

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TRAF6:** TNF receptor associated factor 6

**TRBP:** TAR RNA-binding protein

**VCAM-1:** molécula de adhesión celular vascular

**VE-cadherina:** cadherina vascular endotelial

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

**$\beta$ -TCR:** beta-transducin repeat containing



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Desarrollo de la lesión aterosclerótica.....   | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Síndrome coronario agudo.....  | 8  |
| <b>Figura 3.</b> Contribución del RNA codificante y ncRNA en el<br>genoma humano.....   | 13 |
| <b>Figura 4.</b> Ruta de biosíntesis de miRNA.....  | 17 |
| <b>Figura 5.</b> miRNA e inflamación vascular.....  | 43 |
| <b>Figura 6.</b> qRT-PCR.....   | 61 |
| <b>Figura 7.</b> Inmunoensayo sobre la superficie de microesferas<br>magnéticas codificadas mediante fluorescencia.....   | 66 |
| <b>Figura 8.</b> Diseño de los inhibidores y mimicos de miRNA.....  | 70 |
| <b>Figura 9.</b> Imágenes representativas de la evaluación de la<br>eficiencia de transfección mediante citometría de flujo.....                                    | 71 |
| <b>Figura 10.</b> Transfección celular.....   | 73 |
| <b>Figura 11.</b> Imágenes representativas del análisis de ciclo<br>celular mediante citometría de flujo.....   | 77 |
| <b>Figura 12.</b> Imágenes representativas de la cantidad de miRNA en<br>una población total de RNA de pequeño tamaño aislado en muestras<br>de suero y plasma..... | 88 |
| <b>Figura 13.</b> Concentración de miRNA en muestras de suero y<br>plasma.....  | 89 |
| <b>Figura 14.</b> Niveles de expresión (Ct) de 8 miRNA candidatos a<br>controles endógenos en suero y plasma de pacientes con SCASEST<br>y sujetos control.....     | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 15.</b> Niveles de expresión de miRNA descritos como potenciales biomarcadores para SCA.....  | 94  |
| <b>Figura 16.</b> miRNA relacionados con el SCASEST.....  | 101 |
| <b>Figura 17.</b> Expresión de los miRNA relacionados con SCASEST comparando individuos control y pacientes con SCASEST en su manifestación aguda.....                                      | 104 |
| <b>Figura 18.</b> Expresión de los miRNA relacionados con SCASEST comparando pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.....                             | 108 |
| <b>Figura 19.</b> Expresión de los miRNA relacionados con SCASEST comparando individuos control y pacientes con SCASEST después de un año de evolución clínica.....                         | 110 |
| <b>Figura 20.</b> Representación del <i>cluster</i> miR-99b/let-7e/miR-125a en el cromosoma humano y el homólogo de ratón.....  | 111 |
| <b>Figura 21.</b> Expresión de los componentes del <i>cluster</i> miR-99b/let-7e/miR-125a comparando individuos control y pacientes con SCASEST.....  | 113 |
| <b>Figura 22.</b> Expresión de los componentes del <i>cluster</i> miR-99b/let-7e/miR-125a comparando pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.....     | 114 |
| <b>Figura 23.</b> Expresión de los componentes del <i>cluster</i> miR-99b/let-7e/miR-125a comparando individuos control y pacientes con SCASEST después de un año de evolución clínica..... | 115 |
| <b>Figura 24.</b> Viabilidad celular.....   | 118 |
| <b>Figura 25.</b> Adhesión celular.....   | 120 |
| <b>Figura 26.</b> Proliferación celular.....  | 122 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 27.</b> Capacidad vasculogénica de las HUVEC transfectadas con inhibidores de los miRNA del cluster<br>miR-99b/let-7e/miR-125a.....  | 124 |
| <b>Figura 28.</b> Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas por las células sobre la matriz de Matrigel de las transfecciones con los inhibidores de miRNA del <i>cluster</i><br>miR-99b/let-7e/miR-125a..... | 124 |
| <b>Figura 29.</b> Capacidad vasculogénica de las HUVEC transfectadas con mímicos de los miRNA del <i>cluster</i><br>miR-99b/let-7e/miR-125a.....   | 125 |
| <b>Figura 30.</b> Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas por las células sobre la matriz de Matrigel de las transfecciones con los mímicos de miRNA del <i>cluster</i><br>miR-99b/let-7e/miR-125a.....     | 125 |
| <b>Figura 31.</b> Niveles de citoquinas en suero comparando individuos control y pacientes con SCASEST.....  | 128 |
| <b>Figura 32.</b> Niveles de citoquinas en suero comparando pacientes con SCASEST en el momento de su manifestación aguda y al año de evolución clínica.....   | 130 |





## ÍNDICE DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> miRNA circulantes específicos de miocardio y/o altamente expresados en músculo esquelético descritos como potenciales biomarcadores de SCA.....                  | 26  |
| <b>Tabla 2.</b> miRNA circulantes no específicos de músculo descritos como potenciales biomarcadores de SCA.....   | 30  |
| <b>Tabla 3.</b> miRNA en la función y disfunción endotelial.....   | 36  |
| <b>Tabla 4.</b> Sondas TaqMan específicas utilizadas para la determinación de la expresión de miRNA mediante qRT-PCR.....  | 64  |
| <b>Tabla 5.</b> Características basales de los grupos de estudio.....  | 83  |
| <b>Tabla 6.</b> Características clínicas de los pacientes SCASEST en el momento de su inclusión.....   | 85  |
| <b>Tabla 7.</b> Expresión diferencial de miRNA en pacientes con SCASEST en el momento del infarto.....   | 98  |
| <b>Tabla 8.</b> Expresión diferencial de miRNA en pacientes con SCASEST después de un año de evolución clínica.....  | 100 |
| <b>Tabla 9.</b> Comparación de los niveles de expresión de miRNA relacionados con SCASEST en individuos control y en pacientes con SCASEST.....                                  | 105 |
| <b>Tabla 10.</b> Comparación de los niveles de expresión de miRNA relacionados con SCASEST en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica..... | 109 |
| <b>Tabla 11.</b> Comparación de los niveles de expresión de los componentes del <i>cluster</i> miR-99b/let-7e/miR-125a en individuos control y pacientes con SCASEST.....        | 113 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 12.</b> Comparación de los niveles de expresión de los componentes del <i>cluster</i> miR-99b/let-7e/miR-125a en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica..... | 115 |
| <b>Tabla 13.</b> Comparación de los niveles de citoquinas en suero de individuos control y pacientes con SCASEST en su manifestación aguda.....  | 129 |
| <b>Tabla 14.</b> Comparación de los niveles de citoquinas en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.....   | 131 |
| <b>Tabla 15.</b> Correlación entre los niveles de expresión de miRNA y los niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en todos los individuos participantes en el estudio.....               | 134 |
| <b>Tabla 16.</b> Correlación entre los niveles de expresión de miRNA y los niveles de quimioquinas en todos los individuos participantes del estudio.....  | 135 |





# **RESUMEN/SUMMARY**



Las enfermedades cardiovasculares, en concreto el síndrome coronario agudo (SCA), son la principal causa de muerte en hombres y mujeres en todo el mundo. El SCA es la manifestación clínica de la isquemia miocárdica, producida por la reducción del aporte sanguíneo al miocardio como consecuencia de una disminución del calibre de las arterias coronarias.

La enfermedad subyacente al SCA más frecuente es la aterosclerosis, un proceso inflamatorio iniciado por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial en arterias de mediano y gran calibre a lo largo del sistema cardiovascular. El primer cambio funcional detectable en la lesión aterosclerótica es la disfunción endotelial provocada por la modificación mediante oxidación y agregación de las LDL que estimulan una respuesta inmune innata y adaptativa, dando lugar a la activación del endotelio.

El endotelio activado induce la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas, dando lugar a la adhesión de monocitos y a su migración a través de la pared vascular, donde se diferencian a macrófagos y células dendríticas. Conforme avanza el proceso inflamatorio, se genera una capa fibrosa, cuya rotura es la causa más frecuente de trombosis coronaria. El trombo puede ocluir parcial o totalmente la arteria coronaria, dando lugar a la isquemia miocárdica y necrosis del tejido perfundido por esa arteria. Como consecuencia de esta necrosis, se desencadena una respuesta inflamatoria sistémica inicial que posteriormente es suprimida, en parte, por citoquinas antiinflamatorias, dando lugar a la transición desde la inflamación a la reparación cardíaca. Por tanto, la inflamación ejerce un papel central en la fisiopatología del SCA.



## Resumen

La sintomatología clínica no permite una diferenciación precisa de los diferentes síndromes, por lo que es imprescindible la realización de un electrocardiograma (ECG), cuyos resultados permiten agrupar a los pacientes con SCA en dos grandes grupos: infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) y aquellos que no presentan una elevación del ST (SCA sin elevación del segmento ST, SCASEST). Éste último término (SCASEST) hace referencia tanto al infarto agudo de miocardio sin elevación del ST (IAMSEST) como a la angina inestable.

La necrosis de cardiomiocitos asociada al daño cardiaco provocado por el SCA da lugar a la liberación de proteínas a la circulación, como las troponinas I y T (cTnI y cTnT) que actualmente se utilizan como biomarcadores de necrosis miocárdica de referencia. Por lo tanto, en el diagnóstico de los diferentes síndromes, se complementa el resultado del ECG con la medida plasmática de cTnI o cTnT. De esta manera, los pacientes IAMCEST (elevación del segmento ST y con aumento de troponinas cardiacas) son diagnosticados con certeza y precocidad. La medida de las troponinas cardiacas es asimismo un aspecto importante en el diagnóstico de los pacientes IAMSEST, ya que no muestran una elevación del ST pero sí una elevación de troponinas en sangre. Sin embargo, su uso en el diagnóstico de pacientes con angina inestable no está tan claro, ya que no muestran elevación del ST y tampoco un aumento de troponinas dificultando un diagnóstico temprano.

Es probable que el tejido cardiaco dañado genere una liberación de RNA no codificantes (ncRNA), entre ellos microRNA (miRNA), similar a la liberación de troponinas cardiacas. Los miRNA son pequeñas moléculas monocatenarias (~19-23 nt) de RNA no

codificante que desempeñan importantes funciones en la regulación postranscripcional de la expresión génica.

El interés actual en los miRNA circulantes radica en la posibilidad de utilizarlos como biomarcadores clínicos para distintas enfermedades, entre ellas las cardiovasculares. Sin embargo, la falta de estandarización de los métodos pre-analíticos y analíticos, ha derivado en la imposibilidad de comparar los diferentes estudios publicados. El resultado de estas dificultades metodológicas es la falta de consenso sobre el potencial de los miRNA como biomarcadores de SCA.

El suero y el plasma son los tipos de muestra más frecuentemente utilizados en los estudios de expresión de miRNA circulantes. Sin embargo, el tipo de muestra de partida podría ser una fuente de variación en el análisis del perfil de miRNA circulantes en SCA. Por ello, el primer objetivo de este estudio ha sido determinar las diferencias en la concentración de miRNA en suero y plasma y si bien, la fracción de miRNA entre suero y plasma era similar, los pacientes con SCASEST presentaron concentraciones de miRNA más elevadas que las muestras de sujetos sanos.

Entre las dificultades metodológicas del análisis de la expresión de miRNA circulantes mediante qRT-PCR también se encuentra la normalización de los valores de expresión. Por ello, para seleccionar un control endógeno adecuado para nuestros estudios de qRT-PCR en muestras de suero y plasma de pacientes con SCASEST e individuos sanos, analizamos la expresión de los miRNA circulantes utilizados como controles endógenos en diferentes estudios. El miR-484 resultó ser el miRNA que, además de no mostrar diferencias significativas entre suero y plasma en nuestra muestra, tampoco mostró diferencias en los coeficientes de variación. Por lo tanto, los valores de expresión

## Resumen

de los miRNA de este estudio fueron normalizados tomando como referencia la expresión de miR-484.

Por otra parte, suero o plasma podrían influir en el nivel de expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCA y para determinarlo, analizamos la expresión de miRNA que previamente habían sido descritos como posibles biomarcadores de SCA. De hecho, el patrón de expresión de los miRNA resultó ser diferente en suero y plasma y también se observaron diferencias en la variabilidad de expresión. El suero ofreció una mayor sensibilidad en la detección de miRNA y una menor variabilidad en la expresión, sugiriendo que el tipo de muestra más adecuado para realizar estudios de miRNA circulantes en pacientes con SCA es el suero.

La desregulación de la biogénesis de miRNA se ha asociado a diversas enfermedades cardiovasculares. Numerosos estudios han descrito diferentes patrones de expresión de miRNA en el SCA, especialmente en pacientes IAMCEST, sugiriendo su posible uso como herramientas moleculares para su diagnóstico y pronóstico. Sin embargo, debido a la mayor incertidumbre a la hora de diagnosticar pacientes con SCASEST (IAMSEST y angina inestable), el análisis del patrón de expresión de miRNA circulantes en este tipo de pacientes sería de especial interés, siguiente objetivo de este estudio. Para ello, mediante *arrays* de expresión analizamos el perfil de miRNA de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y también después de un año de evolución clínica, para determinar los miRNA relacionados directamente con el momento agudo del infarto. Se observó una desregulación de 54 miRNA en el momento agudo del SCA, de los que 10 aumentaron y 44 disminuyeron su expresión. Después de un año de evolución clínica, había 42 miRNA desregulados, de los que 35 aumentaron y 7 disminuyeron su expresión.

Con la finalidad de identificar los miRNA que podrían estar relacionados con el momento agudo del infarto, se seleccionaron del array aquellos miRNA cuya expresión variaba en la manifestación aguda del SCA y revertía a niveles control después de un año de evolución clínica. Estos miRNA se comprobaron posteriormente en una población de SCASEST más amplia y se confirmó la desregulación de la expresión de let-7e, miR-28, miR-130b, miR-523, miR-874, miR-92a, miR-26a y miR-320b en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda. De ellos, la expresión de let-7e y miR-26a revirtió hasta niveles control tras un año de evolución clínica.

El miRNA let-7e forma parte del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a y para comprobar si estos miRNA se comportaban de manera coordinada, también analizamos la expresión de miR-99b y miR-125a. Al igual que let-7e, la expresión de miR-99b y miR-125a disminuyó en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda, revirtiendo a niveles control después de un año de evolución clínica.

La comunicación intercelular a través de miRNA circulantes es especialmente importante para las células endoteliales, donde se ha descrito una alta expresión del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a. Sin embargo, se desconoce su papel en la biología vascular. Por ello, después de comprobar los niveles circulantes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en pacientes con SCASEST, estudiamos su implicación en la modulación de la función endotelial en cultivo celular. Para ello, utilizando células endoteliales de vena umbilical humana, HUVEC, se realizaron transfecciones con inhibidores y mimicos de los 3 miRNA del *cluster*, analizando su capacidad funcional mediante estudios de adhesión, proliferación y vasculogénesis. Sólo el let-7e y miR-125a tuvieron efectos sobre la función endotelial. Las células transfectadas con el mimico de let-7e incrementan su capacidad de adhesión y con el inhibidor de let-7e aumentan la vasculogénesis, mientras que la

## Resumen

transfección celular con el inhibidor de miR-125a disminuye la proliferación celular.

También se ha demostrado la contribución de los miRNA en gran variedad de procesos biológicos incluyendo la disfunción endotelial y la inflamación vascular, y la inflamación tiene un papel destacado en la patogénesis del SCA. Un mediador clave de la inflamación es el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B, el cual se activa en respuesta a estímulos inflamatorios e induce la expresión de genes inflamatorios como moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias. La activación de NF- $\kappa$ B también regula la expresión de miRNA que a su vez pueden controlar la inflamación regulando esta vía de señalización. Además, los miRNA pueden regular postranscripcionalmente factores inflamatorios como citoquinas o moléculas de adhesión tanto de forma directa como indirecta. Para determinar si la expresión de miRNA circulantes relacionados con el SCA estaban asociados a los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias y de quimioquinas implicadas en la patología del SCA se realizó un análisis de correlación en todos los individuos del estudio. Como resultado, la expresión de todos los miRNA previamente relacionados con la manifestación aguda del SCA, excepto el miR-125a, mostraron una asociación con los niveles de citoquinas y quimioquinas implicadas en la patología del SCA.

Los resultados obtenidos en la presente tesis destacan la importancia del tipo de muestra de partida al analizar la expresión de miRNA circulantes y se sugiere el suero como la muestra adecuada en pacientes con SCA, así como el miR-484 como control endógeno. Por primera vez se analiza el perfil de expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y después de un año de evolución clínica y se han identificado varios miRNA circulantes

que podrían actuar como posibles biomarcadores de SCASEST. Entre ellos, dos de los componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a también se han visto implicados en la modulación de la función endotelial. Finalmente, la asociación existente entre la expresión de los miRNA relacionados con el SCASEST y los niveles séricos de citoquinas y quimioquinas implicadas en la patología del SCA, refuerza su posible uso como biomarcadores de SCASEST.



Cardiovascular diseases, specifically acute coronary syndrome (ACS), are the leading cause of death in the world for both men and women. ACS is the clinical manifestation of myocardial ischemia, caused by myocardial blood flow decrease as a result of reduced coronary artery size.

Atherosclerosis is the most common underlying disease of ACS, an inflammatory disease primarily driven by low density lipoprotein (LDL) accumulation in the subendothelial layer of large and medium-sized arteries along the cardiovascular system. Endothelial dysfunction appears as the first functional change in atherosclerotic lesions, due to LDL modification and aggregation, and the resulting stimulation of the innate and adaptive immune response, giving rise to endothelial activation.

Vascular endothelial cell activation induces cell adhesion molecule and chemokine expression, leading to monocyte adhesion and transmigration across the vascular wall, where monocytes differentiate into macrophages and dendritic cells. Both cell types can serve as deposits of lipids and become foam cells. As the inflammatory process advances, a fibrous cap is formed, whose rupture is the most frequent cause of thrombosis. The thrombus may partially or totally occlude the coronary artery, resulting in myocardial ischemia and necrosis. As a consequence, a systemic inflammatory response is triggered and subsequently partially suppressed by anti-inflammatory cytokines, resulting in a transition from inflammation toward cardiac repair. Therefore, inflammation has a central role in ACS pathophysiology.

Clinical symptoms caused by ACS do not permit an accurate differentiation between distinct syndromes, making essential to get an electrocardiogram (ECG). Patients with ACS are divided into two major



## Summary

categories based on the ECG results: ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients and non-ST-segment elevation ACS (NSTEMI-ACS). The latter term (NSTEMI-ACS) encompasses both non-ST elevation myocardial infarction (NSTEMI) and unstable angina.

Cardiomyocyte necrosis is associated to myocardial damage caused by ACS, leading to a protein release into the circulation such as cardiac troponin I and T (cTnI and cTnT), biomarkers of myocardial necrosis currently used. Thus, ACS diagnosis requires the ECG result in conjunction with the traditional markers cTnI or cTnT. STEMI patients (ST elevation and troponin-positive) are diagnosed, therefore, in an early and more accurate manner. The measurement of cardiac troponins is also an important aspect for the diagnosis of NSTEMI (non-ST elevation and troponin-positive). However, the diagnosis of unstable angina patients is hampered because they are negative to cardiac troponin and present non-ST elevation.

It is likely that the damaged heart tissue causes a release of non-coding RNAs (ncRNAs), including microRNAs (miRNAs), analogous to the release of cardiac troponins. miRNAs are small single-stranded molecules (~19-23 nt) that functions as important post-transcriptional regulators of gene expression.

The increasingly recent interest in circulating miRNAs lies in their potential use as clinical biomarkers for multiple diseases, especially cardiovascular diseases. However, the lack of a methodological standardization has led to the inability of comparison between different studies. These methodological issues result in a lack of consensus about the potential use of miRNAs as ACS biomarkers.

Serum and plasma are the most widely used type of sample in studies of circulating miRNA expression. Nevertheless, the sample of choice could be a source of variation and influence the analysis of

circulating miRNA expression in ACS. For that reason, we initially determined the differences in miRNA enrichment and yield in serum and plasma, and while no differences were found when miRNA fraction between serum and plasma were compared, the miRNA concentration in both sample types in NSTEMI-ACS patients was higher than in healthy subjects.

Among the methodological challenges in analyzing miRNA expression by qRT-PCR is data normalization. In this regard, we examined the most frequently used miRNA as endogenous controls, to establish an appropriate endogenous control to be used in the qRT-PCR studies performed in both serum and plasma of NSTEMI-ACS patients and healthy subjects. miR-484 showed no significant differences between means and coefficients of variation in both serum and plasma. Therefore, in this study the values of miRNAs were normalized to the expression of miR-484.

On the other hand, to determine the influence of serum and plasma on circulating miRNA profile expression in NSTEMI-ACS patients, we analyzed the expression of the most described miRNAs as potential biomarkers of ACS. Indeed, serum and plasma showed a different miRNA expression pattern and a significant difference in variance was also found. Serum demonstrated a higher sensitivity and lower variability in miRNA expression, suggesting that serum may be the appropriate sample type in circulating miRNA studies.

Dysregulation of miRNA biogenesis has been associated with many cardiovascular diseases. Several studies have shown different circulating miRNA profile expression in ACS, particularly in STEMI patients, suggesting their potential use as a molecular tool for the diagnosis and prognosis of ACS. However, the analysis of the miRNA profile expression would be of particular interest in NSTEMI-ACS patients

## Summary

(NSTEMI and instable angina) because of the higher uncertainty in the diagnosis, and thus it was the following aim of this study. For that purpose, we assessed the miRNA expression in patients with acute manifestation of NSTEMI-ACS and one-year follow-up, to select the miRNAs related to ACS. 54 miRNAs were dysregulated in ACS, including 10 up-regulated and 44 down-regulated miRNAs. After one-year follow-up, 42 miRNAs were dysregulated, including 35 up-regulated and 7 down-regulated miRNAs.

In order to identify miRNAs involved with acute manifestation of ACS, we selected those miRNAs dysregulated in NSTEMI-ACS patients whose expression reverted to control levels after one-year follow-up. Changes in miRNA expression of let-7e, miR-28, miR-130b, miR-523, miR-874, miR-92a, miR-26a and miR-320b were then confirmed in serum of a larger number of NSTEMI-ACS patients. Among them, let-7e and miR-26a expression was reverted to control levels after one-year follow-up.

Let-7e miRNA is a member of miR-99b/let-7e/miR-125a cluster, so in order to assess if the cluster is expressed coordinately, we also determined miR-99b and miR-125a expression. miR-99b and miR-125a were down-regulated in NSTEMI-ACS patients in the same way that let-7e, reverting to control levels after one-year follow-up.

Intercellular communication involving circulating miRNAs is especially relevant to endothelial cells, where the cluster miR-99b/let-7e/miR-125a is highly expressed. However, its role in vascular biology is unknown. In this regard, after confirming the cluster miR-99b/let-7e/miR-125a expression in NSTEMI-ACS patients, we studied its involvement in endothelial function. We cultured human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, and we analyze the adhesion, proliferation and vasculogenesis capacity of cells transfected with miRNA inhibitors

and mimics of the cluster constituents, assessing the endothelial function. Endothelial function was only affected by let-7e and miR-125a transfection. HUVEC transfected with let-7e mimic and let-7e inhibitor show an increased adhesion capacity and an increased vasculogenesis capacity, respectively, whereas miR-125a transfection decrease HUVEC proliferation.

Great diversity of biological processes has been demonstrated to be affected by miRNAs, including endothelial dysfunction and vascular inflammation, and inflammation has a leading role in ACS pathogenesis. The NF- $\kappa$ B transcription factor is a key mediator of inflammation, being activated in response to inflammatory stimulus, and leading to the induction of adhesion molecule and proinflammatory cytokine expression. NF- $\kappa$ B activation also regulates miRNA expression, which in turn can regulate inflammation through modulation of NF- $\kappa$ B signaling pathway. miRNAs can also directly and indirectly control cytokine and adhesion molecule expression in a post transcriptional manner. To determine the association between circulating miRNAs related to ACS and pro and anti-inflammatory cytokine levels involved in ACS, we performed a correlation analysis considering all the participants in the study. As a result, miRNA expression of every miRNA previously selected regarding to ACS manifestation, excluding miR-125a, was related to the levels of cytokine and chemokine implicated in ACS.

In conclusion, our results highlight the importance of the sample of choice for detecting circulating miRNA expression, suggesting that serum may be the appropriate sample type and miR-484 could be used as reference gene in circulating miRNA studies of NSTEMI-ACS. The obtained results provide for the first time the circulating miRNA profile in NSTEMI-ACS patients at acute manifestation and after one-year follow-

## Summary

up, identifying several miRNAs as potential biomarkers of NSTEMI-ACS. Among them, two components of miR-99b/let-7e/miR-125a cluster has been implicated in the modulation of endothelial function. Finally, the association between the expression of miRNAs related to NSTEMI-ACS and cytokine and chemokine serum levels involved in ACS enhance the potential use of miRNAs as NSTEMI-ACS biomarkers.





# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1. SÍNDROME CORONARIO AGUDO.....</b>                                      | <b>4</b>  |
| 1.1.1. FISIOPATOLOGÍA.....   | 4         |
| 1.1.2. CLASIFICACIÓN .....   | 10        |
| 1.1.3. BIOMARCADORES CARDIACOS .....   | 10        |
| <b>1.2. microRNA EN EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO .....</b>                      | <b>13</b> |
| 1.2.1. microRNA .....  | 13        |
| 1.2.2. BIOGÉNESIS DE LOS miRNA.....  | 15        |
| 1.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS miRNA .....                                  | 20        |
| 1.2.4. miRNA CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE SCA<br>.....                    | 22        |
| 1.2.5. miRNA EN LA FUNCIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ....                        | 33        |
| 1.2.5.1. CONTROL DEL TONO VASCULAR.....  | 34        |
| 1.2.5.2. CONTROL DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR.....                             | 37        |
| 1.2.5.3. CONTROL DE LA ANGIOGÉNESIS.....                                       | 38        |
| 1.2.5.4. CONTROL DE LA INFLAMACIÓN VASCULAR Y EL<br>TRÁFICO LEUCOCITARIO ..... | 40        |
| <b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>3.1. ESTUDIO EN PACIENTES .....</b>   | <b>56</b> |
| 3.1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRA... 56                        |           |
| 3.1.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y SEGUIMIENTO..... 57                        |           |



|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.3. EXTRACCIÓN DE RNA .....   | 57        |
| 3.1.4. PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA .....  | 58        |
| 3.1.4.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....  | 59        |
| 3.1.4.2. PREAMPLIFICACIÓN .....  | 60        |
| 3.1.4.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL .....   | 60        |
| 3.1.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....  | 62        |
| 3.1.5.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....  | 62        |
| 3.1.5.2. PREAMPLIFICACIÓN .....  | 63        |
| 3.1.5.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL .....   | 64        |
| 3.1.6. INMUNOENSAYO MULTIPLEX DE CITOQUINAS .....  | 65        |
| <b>3.2. ESTUDIO EN CÉLULAS ENDOTELIALES .....</b>  | <b>68</b> |
| 3.2.1. CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA<br>UMBILICAL HUMANA.....  | 68        |
| 3.2.2. TRANSFECCIÓN CELULAR .....  | 69        |
| 3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR .....  | 74        |
| 3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL.....   | 75        |
| 3.2.4.1. ADHESIÓN CELULAR .....  | 75        |
| 3.2.4.2. PROLIFERACIÓN CELULAR.....  | 75        |
| 3.2.4.3. VASCULOGÉNESIS.....   | 78        |
| <b>3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>   | <b>79</b> |
| <br>   |           |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>   | <b>81</b> |
| 4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....   | 83        |
| 4.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE miRNA EN<br>SUERO Y PLASMA DE PACIENTES CON SCASEST Y<br>CONTROLES SANOS..... | 86        |
| 4.2.1. CONCENTRACIÓN DE miRNA.....   | 86        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.2.2. SELECCIÓN DEL CONTROL ENDÓGENO PARA LA NORMALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNA MEDIANTE qRT-PCR.....   | 89         |
| 4.2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE miRNA DESCRITOS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES DE SÍNDROME CORONARIO AGUDO EN SUERO Y PLASMA .....                      | 92         |
| <b>4.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO DE PACIENTES CON SCASEST EN SU MANIFESTACIÓN AGUDA Y TRAS UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA .....</b> | <b>95</b>  |
| 4.3.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES EN LA MANIFESTACIÓN AGUDA DEL SCASEST Y DESPUÉS DE UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA.....                        | 95         |
| 4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNA CIRCULANTES RELACIONADOS CON LA MANIFESTACIÓN AGUDA DEL SCASEST .....   | 100        |
| <b>4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS miRNA CIRCULANTES RELACIONADOS CON EL SCASEST EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....</b>                                  | <b>102</b> |
| 4.4.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNA EN EL GRUPO CONTROL Y EN PACIENTES CON SCASEST .....  | 103        |
| 4.4.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES EN PACIENTES CON SCASEST Y DESPUÉS DE UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA.....                                    | 106        |
| <b>4.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL CLUSTER miR-99b/let-7e/miR-125a EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO .....</b>  | <b>111</b> |
| 4.5.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DEL CLUSTER miR-99b/let-7e/miR-125a EN EL GRUPO CONTROL Y EN PACIENTES CON SCASEST .....                                       | 112        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.5.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DEL <i>CLUSTER</i> miR-99b/let-7e/miR-125a EN PACIENTES CON SCASEST Y DESPUÉS DE UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA .....             | 114        |
| <b>4.6. PAPEL DEL <i>CLUSTER</i> miR-99b/let-7e/miR-125a EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL .....</b>   | <b>116</b> |
| 4.6.1. VIABILIDAD CELULAR.....   | 118        |
| 4.6.2. ADHESIÓN CELULAR.....   | 119        |
| 4.6.3. PROLIFERACIÓN CELULAR .....   | 120        |
| 4.6.4. CAPACIDAD VASCULOGÉNICA .....   | 123        |
| <b>4.7. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS CON LA EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES .....</b>   | <b>126</b> |
| <b>5. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>137</b> |
| 5.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO Y PLASMA DE PACIENTES CON SCASEST .....  | 139        |
| 5.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO DE PACIENTES CON SCASEST EN LA MANIFESTACIÓN AGUDA Y TRAS UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA.....         | 147        |
| 5.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL <i>CLUSTER</i> miR-99b/let-7e/miR-125a EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. PAPEL EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL ..... | 168        |
| 5.4. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS CON LA EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES .....  | 175        |
| <b>6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>   | <b>187</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>195</b> |





# **1. INTRODUCCIÓN**



Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebrovascular, la hipertensión y la enfermedad periférica vascular (Mendis et al., 2011). Más de 17 millones de personas murieron por enfermedad cardiovascular en 2016 (WHO, 2018), tratándose de la principal causa de muerte de hombres y mujeres en todo el mundo (Mendis et al., 2011). Dentro de las enfermedades cardiovasculares, el síndrome coronario agudo es la principal causa de mortalidad en ambos sexos (Mendis et al., 2011).

La enfermedad cardiovascular se asocia al envejecimiento, el cual se relaciona a su vez con alteraciones de la estructura y función a nivel vascular. Con el incremento de la esperanza de vida y el consiguiente envejecimiento de la población, se estima que el número de personas con riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares aumentará en los próximos años (Kovacic et al., 2011).



## **1.1. SÍNDROME CORONARIO AGUDO**

El miocardio recibe el aporte sanguíneo a partir de un sistema de arterias coronarias y la regulación de este flujo coronario es determinante para el normal funcionamiento del corazón. Cuando tiene lugar una disminución del calibre de las arterias coronarias se produce una reducción del aporte de sangre al miocardio, con el consiguiente déficit de oxígeno y nutrientes en las células miocárdicas. Este fenómeno se denomina isquemia miocárdica y su manifestación clínica es el síndrome coronario agudo (SCA).

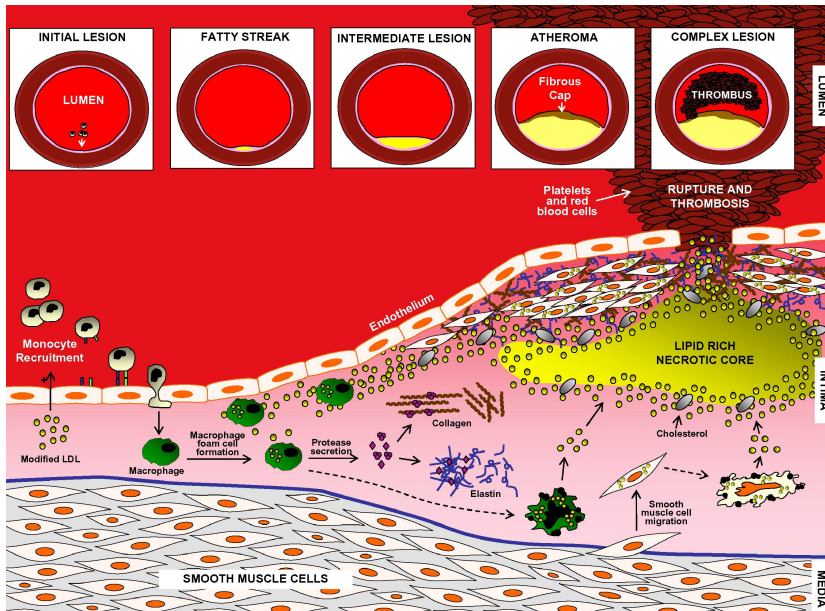
### **1.1.1. FISIOPATOLOGÍA**

Etiológicamente, la aterosclerosis es la enfermedad subyacente al SCA más frecuente. Se trata de un proceso inflamatorio que afecta a las arterias de mediano y gran calibre a lo largo del sistema cardiovascular. Se inicia por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial (Tabas et al., 2007). Estas LDL pueden ser modificadas mediante oxidación y agregación, alterando las funciones del endotelio y provocando una disfunción endotelial (Figura 1). Esta disfunción endotelial se manifiesta con un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, a la vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (Aird, 2008, Davignon and Ganz, 2004, Gimbrone and Garcia-Cardena, 2016). La disfunción endotelial se manifiesta en regiones propensas a desarrollar aterosclerosis, tratándose del primer cambio funcional detectable en la lesión aterosclerótica (Gimbrone and Garcia-Cardena, 2016).

Las LDL modificadas actúan como estimuladores crónicos de la respuesta inmune innata y adaptativa (Bentzon et al., 2014). En primer lugar, citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) e IL-1 $\beta$  (Interleuquina 1 beta) procedentes de macrófagos tisulares activan el endotelio de forma transitoria (Gerhardt and Ley, 2015). El endotelio induce la expresión de moléculas de adhesión y la presentación de quimioquinas en la superficie luminal y se estimula la adhesión de monocitos a las células endoteliales y su migración a través de la pared vascular (Gerhardt and Ley, 2015) donde se diferencian a macrófagos y células dendríticas, activándose y amplificando la inflamación a nivel local (Ley et al., 2011) e iniciando la formación de la placa de ateroma.

El sistema inmune adaptativo reconoce las LDL modificadas, así como antígenos endógenos relacionados con el proceso aterosclerótico, de manera que otros tipos de leucocitos (linfocitos T y B) participan asimismo en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Bentzon et al., 2014).

Los macrófagos son la población de leucocitos más numerosa dentro de la placa aterosclerótica. Actúan como depósitos de lípidos y se convierten en células espumosas, cuya acumulación evoluciona hacia lesiones ateroscleróticas (Figura 1). Además, se produce una migración de células musculares lisas hacia la capa íntima inflamada, induciendo su proliferación y la síntesis de componentes de matriz extracelular dentro de la capa íntima y generando así una capa fibromuscular (Bentzon et al., 2014, McLaren et al., 2011).



**Figura 1. Desarrollo de la lesión aterosclerótica.** La acumulación subendotelial de LDL modificadas activa el endotelio, induciendo la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas que estimulan la adhesión de monocitos y su migración a través de la pared vascular diferenciándose en macrófagos. Los macrófagos actúan como depósitos de lípidos y se convierten en células espumosas. Se produce la migración de células musculares lisas, proliferando y sintetizando componentes de matriz extracelular, generando una placa fibromuscular. Conforme avanza el proceso inflamatorio, la necrosis de células espumosas y células musculares lisas junto con LDL oxidadas y cristales de colesterol constituyen el núcleo necrótico envuelto por la capa fibrosa. El SCA se manifiesta como consecuencia de la rotura de la capa fibrosa y la consiguiente formación de un trombo en la luz arterial. Imagen tomada de (McLaren et al., 2011).

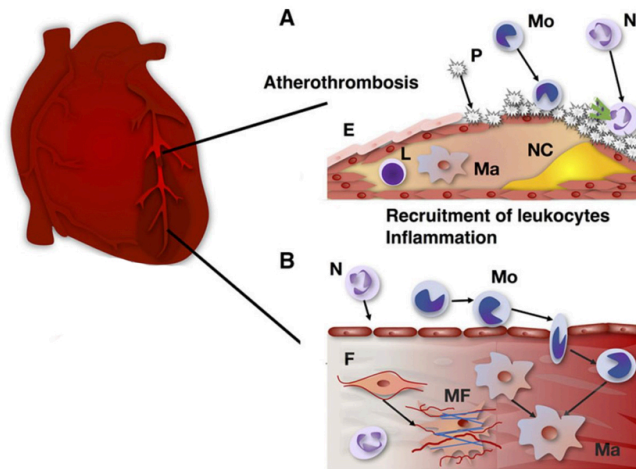
Conforme avanza el proceso inflamatorio, la apoptosis y necrosis de células espumosas y células musculares lisas son una causa importante del desarrollo del núcleo necrótico de la placa aterosclerótica (Figura 1). La inflamación de la placa promueve la formación de ese núcleo necrótico constituido por lipoproteínas oxidadas, cristales de colesterol y restos celulares y, a su vez, la necrosis puede agravar la inflamación. El tejido conectivo circundante

del núcleo necrótico se reemplaza por tejido fibroso rico en colágeno, formando la capa fibrosa. Tras décadas de evolución asintomática, el síndrome coronario agudo se manifiesta por lo general como consecuencia de la rotura de la capa fibrosa de la placa aterosclerótica y la consiguiente formación de un trombo en la luz arterial (Figura 1) (Bentzon et al., 2014, Libby et al., 2014).

Las placas que se rompen y causan el SCA suelen tener una capa fibrosa muy fina, a lo que contribuye la inflamación. La inflamación regula el metabolismo del colágeno, el principal constituyente de la capa fibrosa. Así, señales inflamatorias como el IFN- $\gamma$  afectan la capacidad de las células musculares lisas para sintetizar el nuevo colágeno requerido para reparar y mantener la matriz extracelular de la capa fibrosa. A ello se añade la muerte de las células musculares lisas que tiene lugar en la placa de ateroma inflamada (Libby et al., 2014). La rotura de la placa es la causa más frecuente de trombosis, debido a la exposición del núcleo necrótico altamente trombogénico a la circulación, lo que provoca una combinación de agregados plaquetarios activados, fibrina y eritrocitos (Bentzon et al., 2014, Libby et al., 2014).

El trombo puede ocluir la arteria coronaria, dando lugar a la isquemia miocárdica y necrosis del tejido perfundido por esa arteria (Figura 2). La necrosis produce la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular patterns*) que desencadenan la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los leucocitos. Como resultado tiene lugar una inflamación sistémica que se caracteriza por niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y proteína C reactiva (CRP) (Thomas and Lip, 2017).

## Introducción



**Figura 2. Síndrome coronario agudo.** **A)** La rotura de la capa fibrosa desencadena la formación de un trombo en la luz arterial como consecuencia de la exposición del núcleo necrótico (NC) altamente trombogénico a la circulación. Desencadena la adhesión de plaquetas (P), monocitos (Mo) y neutrófilos (N). **B)** La isquemia miocárdica, causada por la obstrucción de la arteria coronaria, da lugar al reclutamiento y trans migración de neutrófilos y monocitos. Los monocitos se diferencian en macrófagos (Ma) dentro del tejido miocárdico. Los fibroblastos (F) proliferan y se diferencian en miofibroblastos (MF). Imagen editada de (Thomas and Lip, 2017).

El daño cardíaco agudo induce la extravasación de neutrófilos en el tejido miocárdico que fagocitan el tejido necrótico, así como la proliferación de fibroblastos residentes, los cuales se diferencian en miofibroblastos (Figura 2) (Thomas and Lip, 2017). Por tanto, la siguiente fase proliferativa implica muchas poblaciones celulares diferentes, incluyendo monocitos, fibroblastos y células progenitoras endoteliales, y da lugar a la transición desde la inflamación a la reparación cardíaca (Prabhu and Frangogiannis, 2016, Thomas and Lip, 2017). La respuesta inflamatoria inicial es posteriormente suprimida, en parte, por citoquinas antiinflamatorias. Entre ellas destaca el TGF- $\beta$ , que activa los miofibroblastos y promueve la síntesis de colágeno, por lo que tiene un papel fundamental en la formación de

la cicatriz de colágeno y el desarrollo de fibrosis miocárdica (Frangogiannis, 2008, Prabhu and Frangogiannis, 2016, Thomas and Lip, 2017).

Por tanto, la inflamación ejerce un papel central en la fisiopatología del SCA, tanto por su contribución en la formación de la placa aterosclerótica como por su implicación en los mecanismos que dan lugar a su rotura y en la modulación de sus consecuencias clínicas (Libby et al., 2014).

El riesgo de desarrollar SCA ha sido evaluado clásicamente utilizando el score de Framingham. Desde una perspectiva epidemiológica, el *Framingham Heart Study* introdujo el término “factor de riesgo cardiovascular” (Kannel et al., 1961) para definir las características clínicas asociadas al SCA. Los factores de riesgo cardiovascular clásicos, relacionados con la disfunción endotelial (Hadi et al., 2005) y que predisponen al desarrollo de aterosclerosis y, por tanto, de SCA se clasifican en no modificables (sexo, edad y factores genéticos) y modificables (tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes, hipercolesterolemia y obesidad) (Ruff and Braunwald, 2011). Algunos de estos factores de riesgo están a su vez interrelacionados y tienden a acumularse, aumentando el riesgo de padecer un SCA (Yusuf et al., 2004)

### **1.1.2. CLASIFICACIÓN**

La sintomatología clínica no permite una diferenciación precisa de los diferentes síndromes, por lo que resulta imprescindible la realización precoz de un electrocardiograma (ECG). Los resultados del ECG permiten agrupar a los pacientes con SCA en dos grandes grupos: aquellos que en el ECG tienen una elevación del segmento ST por oclusión total de la arteria coronaria y que son diagnosticados como infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST); y aquellos en los que el trombo ocluye parcialmente la arteria y no presentan una elevación del segmento ST pero que, en cambio, pueden presentar otras alteraciones en el ECG (SCA sin elevación del segmento ST, SCASEST). Éste último término comprende tanto el infarto agudo de miocardio sin elevación del ST (IAMSEST) como la angina inestable (Morrow et al., 2007). Específicamente el IAMSEST se diferencia de la angina inestable por tratarse de una isquemia suficientemente severa en intensidad y duración como para causar un daño cardíaco irreversible (necrosis de los cardiomiocitos), y que puede ser reconocida clínicamente mediante la detección de biomarcadores de daño miocárdico. Por lo tanto, a pesar de que el ECG es una herramienta indispensable, carece de suficiente precisión para el diagnóstico diferencial de los pacientes con SCASEST (Mueller, 2014).

### **1.1.3. BIOMARCADORES CARDIACOS**

A través del torrente sanguíneo, diferentes moléculas generadas y liberadas localmente pueden ser distribuidas a distintos órganos y tejidos. Existen moléculas cuyas concentraciones anormales se han relacionado con diversos estados patológicos, incluyendo el SCA, y se consideran biomarcadores o herramientas de información útil en el

diagnóstico y monitorización de diversas patologías (Viereck and Thum, 2017).

El daño cardíaco provocado por el SCA se asocia con una pérdida progresiva de cardiomiocitos y conduce a la liberación de varias proteínas a la circulación a partir de las células cardíacas dañadas. Estos biomarcadores de necrosis miocárdica incluyen las troponinas I y T cardíacas (cTnI y cTnT), la isoenzima MB de la creatina quinasa (CK-MB), la mioglobina y la lactato deshidrogenasa, entre otras (Kemp et al., 2004, Morrow et al., 2007). En la actualidad, las troponinas cardíacas son los biomarcadores más utilizados debido a su sensibilidad y especificidad en la detección de necrosis cardíaca (Fuster and Kovacic, 2014, Viereck and Thum, 2017). Por lo tanto, para el diagnóstico de los diferentes síndromes coronarios agudos el resultado del ECG se complementa con la medida plasmática de cTnI o cTnT (Morrow et al., 2007).

Tras un IAMCEST la concentración de troponinas cardíacas aumenta considerablemente en sangre. Este aumento de troponinas junto a los signos y síntomas clínicos y a la detección de un aumento del segmento ST en el ECG, permite diagnosticar con certeza y precocidad a los pacientes con IAMCEST. La medida de las troponinas cardíacas también es un aspecto importante en el diagnóstico de los pacientes con IAMSEST, al tratarse de pacientes que no muestran una elevación del ST pero sí una elevación de troponinas en sangre. Sin embargo, en el diagnóstico de pacientes con angina inestable su uso no está tan claro, debido a que no muestran elevación del ST y tampoco un aumento de troponinas. Además, estos biomarcadores cardíacos no se encuentran constantemente elevados en las primeras horas tras el inicio de los síntomas, requiriendo medidas repetidas y dificultando un diagnóstico temprano (Dekker et al., 2010, Morrow et al., 2007, Mueller, 2014). Al mismo tiempo y pese a ser utilizado como



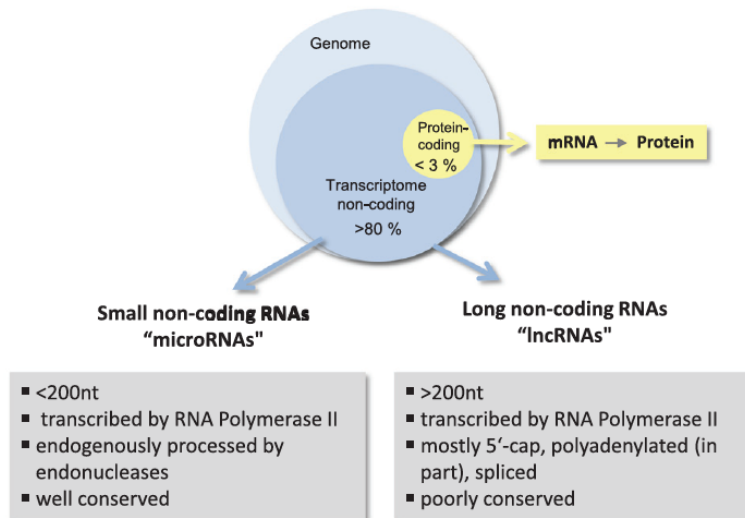
## Introducción

biomarcador de referencia, en ocasiones se detectan falsos positivos correspondientes a pacientes con enfermedad coronaria estable u otras patologías (Tanindi and Cemri, 2011). Como resultado, actualmente no se dispone de un biomarcador ideal para un diagnóstico rápido y fiable del SCA que además permita distinguir entre los diferentes síndromes (Paiva and Agbulut, 2017).

## 1.2. microRNA EN EL SÍNDROME CORONARIO AGUDO

### 1.2.1. microRNA

Los genomas eucariotas transcriben hasta el 90% del DNA genómico. Sorprendentemente, solo un 1-2% de estos transcritos codifican para proteínas, mientras que la gran mayoría se transcriben como RNA no codificante (ncRNA, del inglés *non-coding RNAs*) (Figura 3) (Uchida and Dimmeler, 2015). Evolutivamente, el repertorio de genes codificantes de proteínas ha permanecido relativamente estático, mientras que la cantidad de secuencias no codificantes se ha incrementado considerablemente de forma paralela a la complejidad del organismo (Kaikkonen et al., 2011). La base biológica de esta observación se apoya en la creciente evidencia de la funcionalidad de estos transcritos (Kaikkonen et al., 2011, Uchida and Dimmeler, 2015).



**Figura 3. Contribución del RNA codificante y ncRNA en el genoma humano.** Los RNA codificantes representan menos del 3% del genoma, mientras que la mayoría de los transcritos son ncRNA. Imagen tomada de (Uchida and Dimmeler, 2015).

## Introducción

Los ncRNA pueden dividirse atendiendo a su longitud en RNA pequeños no codificantes (del inglés, *small non-coding RNAs*) con menos de 200 nucleótidos (nt) y que incluyen los microRNA (miRNA) y RNA largos no codificantes (del inglés, *long non-coding RNAs*) (Figura 3).

Los miRNA son pequeñas moléculas monocatenarias (~19-23 nt) de RNA no codificante, evolutivamente conservadas, que desempeñan importantes funciones en la regulación postranscripcional de la expresión génica. El primer miRNA descubierto, lin-4, fue descrito por primera vez en *Caenorhabditis elegans* como regulador de un gen esencial para el desarrollo larvario (Lee et al., 1993, Wightman et al., 1993). Hasta el año 2000 se creyó que este nuevo nivel de regulación era exclusivo de nematodos. Todo esto cambió con el descubrimiento del let-7, un pequeño RNA de 21nt similar a lin-4 pero que, a diferencia de éste, se ha conservado evolutivamente en todos los metazoos (Pasquinelli et al., 2000). Este descubrimiento desencadenó una revolución en la investigación de esta nueva clase de ncRNA (Lagos-Quintana et al., 2001, Lau et al., 2001, Lee and Ambros, 2001). El resultado fue el hallazgo de numerosos miRNA en diferentes especies de plantas y animales. Actualmente, se han identificado miles de miRNA en humanos y otras especies. Un registro de miRNA creado en 2002, la base de datos miRBase, se utiliza como el principal repositorio en línea para todas las posibles secuencias de miRNA, nomenclatura e información sobre la predicción de secuencias dianas (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). La versión actual (miRBase 22) contiene 38589 registros que representan precursores de miRNA, los cuales expresan 48885 miRNA maduros en 271 especies. La información es de libre acceso a través de la web [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org).

### 1.2.2. BIOGÉNESIS DE LOS miRNA

Los miRNA derivan de transcritos primarios nucleares (pri-miRNA) con una estructura secundaria en forma de horquilla. La mayoría de los pri-miRNA de animales se transcriben mediante la RNA polimerasa II (RNA pol II) (Lee et al., 2004).

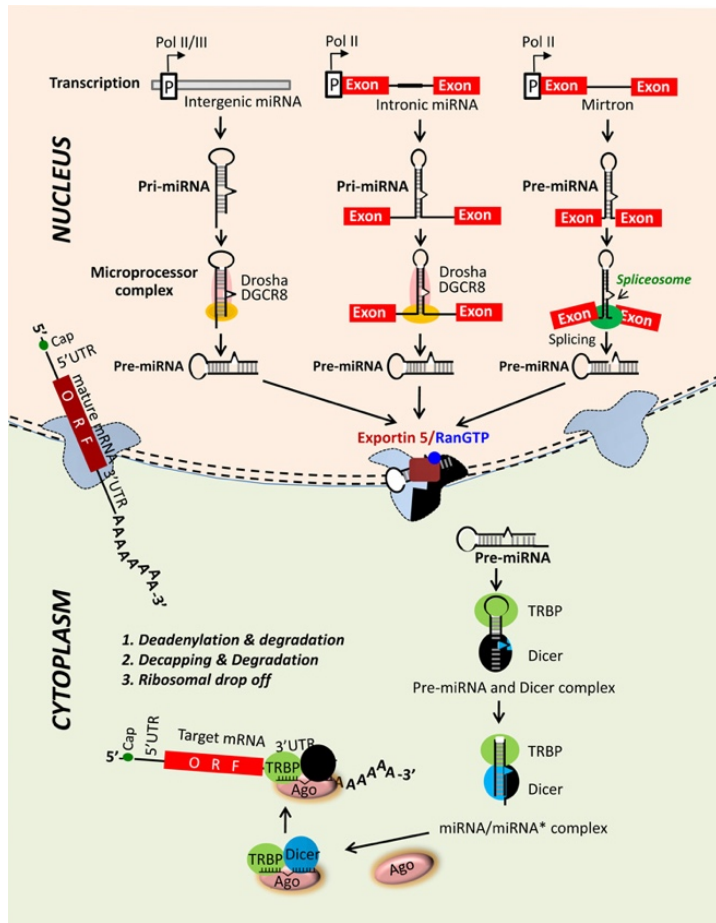
Las secuencias de miRNA se localizan en regiones genómicas diversas (Figura 4). Más de dos tercios de todos los miRNA humanos están localizados en transcritos de intrones procedentes de genes codificantes de proteínas, así como de lncRNA. En algunos casos, pueden localizarse tanto en exones como en intrones, según el *splicing* alternativo del transcrito. Además, los miRNA pueden ser de origen intergénico (Shukla et al., 2011). Su principal localización en intrones sugiere que la expresión de estos miRNA está regulada coordinadamente con la expresión del mRNA flanqueante, compartiendo regiones reguladoras. Sin embargo, dado que varios miRNA intrónicos se encuentran en orientación antisentido con respecto al mRNA flanqueante, es posible que algunos miRNA sean transcritos mediante su propio promotor (Cullen, 2004).

Mientras que la mayor parte de los miRNA humanos están genómicamente aislados, a menudo se organizan en forma de *clusters*. Se transcriben como un pri-miRNA policistrónico que posteriormente es procesado en varios miRNA funcionales que se expresan coordinadamente (Altuvia et al., 2005, Cullen, 2004, Hausser and Zavolan, 2014). Normalmente hay entre dos o tres secuencias de miRNA en un cluster, las cuales suelen mostrar una alta similitud. Este agrupamiento podría estar relacionado con los mecanismos evolutivos responsables de la propagación de los genes de miRNA en el genoma humano, probablemente involucrando duplicaciones de genes (Altuvia et al., 2005, Hausser and Zavolan, 2014). También podría sugerir que

## Introducción

su expresión coordinada desempeña un papel conjunto dentro de un proceso molecular común, bien compartiendo genes diana individuales o regulando diferentes componentes de la misma vía molecular (Altuvia et al., 2005, Hausser and Zavolan, 2014).

Al igual que otros transcritos generados mediante la RNA Pol II, los pri-miRNA tienen una caperuza 5' y una cola poli(A) en el extremo 3', formando estructuras en horquilla que contienen el miRNA maduro. En la ruta canónica de biosíntesis de miRNA (Figura 4), estas estructuras son reconocidas por el complejo microprocesador, un complejo multiproteico con dos componentes principales: una ribonucleasa III (RNAsa III) conocida como Drosha y su cofactor DGCR8 (del inglés, *Di George Syndrome Critical Region gene 8*). Drosha produce una escisión alrededor de 11 pares de bases a partir del inicio de la horquilla. Esta escisión libera una molécula de RNA con estructura en horquilla de 70-100 pares de bases que es el precursor del miRNA o pre-miRNA (Bartel, 2004, Cullen, 2004, Shukla et al., 2011, Treiber et al., 2012).



**Figura 4. Ruta de biosíntesis de miRNA.** Los miRNA se procesan a partir de transcritos de genes independientes o a partir de intrones de genes codificantes de proteínas generados mediante la RNA pol II. En la vía canónica, el complejo microprocesador que contiene la subunidad catalítica Drosha y su cofactor DGCR8, escinde el pri-miRNA liberando un miRNA precursor con estructura en forma de horquilla (pre-miRNA). Los pre-miRNA son exportados al citoplasma mediante el receptor Exportina 5. Algunos pre-miRNA se producen a partir de intrones muy cortos (mirtrons) generados mediante la maquinaria de *splicing*, eludiendo el paso Drosha-DGCR8. En ambos casos, Dicer escinde la molécula de pre-miRNA y selecciona la hebra guía, que es incorporada al complejo miRISC, mientras que la otra hebra es degradada. El miRNA maduro interacciona con un miembro de la familia proteica Argonauta (Ago) dando lugar a la escisión del mRNA (cuando existe una complementariedad perfecta miRNA-mRNA) o a la supresión de la traducción (cuando hay una complementariedad parcial). Imagen tomada de (Shukla et al., 2011).

## Introducción

Los pre-miRNA son reconocidos y exportados específicamente por el receptor nuclear de exportación Exportina 5 mediante un proceso dependiente de Ran-GTP. En el citosol, el pre-miRNA es escindido mediante la RNAsa III Dicer dando lugar a un RNA de doble cadena de 22 nt de longitud. Una de las hebras (el miRNA maduro) se transfiere a la proteína Argonauta (Ago2 en mamíferos), el efector de miRISC (complejo silenciador inducido por miRNA, del inglés *miRNA-induced silencing complex*), mientras que la otra normalmente es degradada (Figura 4) (Bartel, 2004, Shukla et al., 2011, Treiber et al., 2012).

En mamíferos, la selección de la hebra y el ensamblaje de miRISC se logra mediante un complejo formado por Dicer, Ago2 y la proteína de unión a RNA de doble cadena TRBP (del inglés, *TAR RNA-binding protein*) (Figura 4). La selección de la hebra viene dictada por la estabilidad termodinámica de los dos extremos del dúplex: se escoge la hebra cuyo extremo 5' es menos estable en cuanto al apareamiento de bases (Treiber et al., 2012). El miRNA acoplado en el complejo miRISC guía a la proteína Ago2 hasta sus dianas de mRNA, seleccionadas por complementariedad de secuencia, y lleva a cabo la regulación de su expresión a nivel post-transcripcional mediante dos mecanismos: escisión del mRNA o represión de su traducción (Bartel, 2004, Huntzinger and Izaurralde, 2011, Shukla et al., 2011).

Curiosamente, existe un nuevo subconjunto de miRNA intrónicos denominados como "mirtrons" cuya biogénesis implica variaciones en la ruta canónica de biosíntesis (Figura 4). Son generados mediante la maquinaria de *splicing*, eludiendo el paso Drosha-DGCR8 pero continuando el procesado del pre-miRNA a través de la ruta canónica (Curtis et al., 2012, Krol et al., 2010, Shukla et al., 2011). Asimismo, existen rutas independientes de Drosha que

no implican *splicing*, como es el caso de miR-320 y miR-484, cuyos pre-miRNA son procesados directamente por Dicer. Por otro lado, también se han descrito miRNA cuya biogénesis es independiente de Dicer. Es el caso de los simtrons (*splicing-independent mirtrons*), cuyo procesamiento implica a Drosha pero es independiente de la maquinaria de *splicing*, DGCR8 o Dicer (Curtis et al., 2012).

La nomenclatura de los miRNA ha ido evolucionando desde su descubrimiento dando lugar a confusión. La mayoría de los miRNA se nombran con el prefijo de la especie y un número que indica el miRNA específico (por ejemplo, hsa-miR-28 indica *Homo sapiens* microRNA número 28). Sin embargo, muchos estudios no incluyen los prefijos de las especies. Los prefijos también pueden añadirse al nombre para indicar información sobre los transcritos primarios (por ejemplo, pri-miR-28 y pre-miR-28). Además, en ocasiones se añaden sufijos para designar si el miRNA maduro deriva de la hebra 3' o 5' del pre-miRNA. Por ejemplo, miR-28-3p indica la forma de miRNA maduro que deriva del brazo 3' de la horquilla pre-miRNA. Los miRNA relacionados por secuencia que forman parte de familias, pueden incluir letras minúsculas a continuación del nombre (por ejemplo, miR-125a y miR-125b). En algunos casos, unidades transcripcionales situadas en diferentes *loci* a lo largo del genoma codifican miRNA que son idénticos en secuencia en su forma madura. En este caso, se añade un sufijo numérico tras un guion que indica diferentes *loci* de origen (por ejemplo, miR-26a-1 y miR-26a-2).



### 1.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS miRNA

Los miRNA median el silenciamiento génico post transcripcional guiando a las proteínas Ago2 hasta sus dianas de mRNA, las cuales reconocen por complementariedad de secuencia con su región 3'UTR (del inglés, *untranslated region*) (Figura 4). En los metazoos, numerosas dianas de mRNA muestran una clara complementariedad en su región 3' UTR con 6-8 nt del extremo 5' del miRNA. Esta región, correspondiente a los nucleótidos 2-7 del extremo 5' del miRNA, se denomina secuencia "semilla" del miRNA (del inglés, *seed sequence*) y lleva a cabo la interacción del miRNA con el mRNA diana (Lewis et al., 2003). En los mRNA diana, las regiones complementarias a la secuencia semilla se denominan sitios canónicos (Bartel, 2009, Hausser and Zavolan, 2014). Estos sitios canónicos muestran una fuerte evidencia de selección evolutiva, por lo que constituyen el enfoque principal de los métodos computacionales para la predicción de dianas como las bases de datos TargetScan, EIMMo y otras incluidas en miRBase. La importancia de la región semilla para la selección de dianas destaca aún más por el hecho de que miRNA con secuencias casi idénticas en sus extremos 5', los cuales forman familias, comparten las mismas dianas. El 64% de los miRNA humanos actualmente listados en miRBase forman parte de familias cuyos miembros pueden tener una expresión diferente específica de tejido. Por tanto, debido a la similitud de secuencia en sus extremos 5' podrían llevar a cabo la represión de dianas comunes en diferentes tejidos (Hausser and Zavolan, 2014).

Se ha sugerido que los apareamientos de bases guanina·uracilo son tolerados en la región semilla y que el apareamiento del extremo 3' del miRNA podría compensar esa reducida complementariedad en la región semilla (Hausser and Zavolan, 2014). Estudios recientes han

mostrado que hay una alta prevalencia de interacciones miRNA-mRNA no canónicas, es decir, aquellas que forman bucles de un solo nucleótido en la región semilla del miRNA o que se emparejan exclusivamente con 6 nucleótidos de la región semilla. Debido a su menor afinidad por miRISC, los sitios no canónicos parecen ser, en general, menos efectivos en la desestabilización del mRNA (Hausser and Zavolan, 2014).

En los animales, el mecanismo que los miRNA utilizan para regular la expresión génica puede ser la degradación del mRNA o la represión de su traducción, dando lugar a una disminución en los niveles de las proteínas codificadas en ambos casos. La elección del mecanismo de regulación post transcripcional viene determinada por la identidad de la diana: una vez incorporado al complejo miRISC citoplasmático, el miRNA inducirá la escisión y degradación si el mRNA tiene suficiente complementariedad de secuencia o, por el contrario, dirigirá su represión traduccional (más común en células animales). La represión traduccional se ha propuesto que ocurre de 4 formas diferentes: inhibición del inicio de la traducción, inhibición de la elongación de la traducción, degradación proteica co-traduccional y terminación prematura de la traducción (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

En el caso de secuencias totalmente complementarias, los miRNA dirigen sus dianas a la vía de degradación celular 5'-3' afectando las estructuras que les capacitan para ser traducidos. Así, el mRNA es primero deadenilado, posteriormente se retira su caperuza 5' y son finalmente degradados mediante la actividad exonucleasa 5'-3' citoplasmática (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Tras la escisión del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar el reconocimiento y destrucción de mRNAs adicionales (Bartel, 2004).

## Introducción

Se estima que los miRNA regulan alrededor del 60% de los mRNA en humanos, inhibiendo su traducción a proteínas (Friedman et al., 2009). Además, un único miRNA puede tener como diana varios mRNA y a su vez, cada mRNA puede ser diana de varios miRNA (Lewis et al., 2005). Hasta la fecha, se han identificado alrededor de 1880 miRNA humanos y se predice que la mayoría puede inhibir cientos de genes (Jones Buie et al., 2016). Como consecuencia, los patrones de expresión de miRNA pueden ofrecer valiosa información biológica, ya que la variación en la expresión de cientos de mRNA puede, en cierta medida, estar reflejada en los perfiles de expresión de unos pocos miRNA que los regulan (Pritchard et al., 2012).

### **1.2.4. miRNA CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE SCA**

La detección en la circulación sanguínea de concentraciones alteradas de biomarcadores proteicos, como las troponinas cardíacas indicadas anteriormente, proporciona información útil para el diagnóstico de los pacientes con SCA. Pero también es probable que el tejido cardíaco dañado genere una liberación adicional de ncRNA similar a la liberación de proteínas (Viereck and Thum, 2017). Recientemente se ha generado un creciente interés en los miRNA no solo porque suponen la mayor parte del transcriptoma humano, sino porque a diferencia de la mayor parte del RNA, los miRNA son estables en la circulación y su desregulación se ha asociado con la fisiopatología de varias enfermedades, entre ellas las enfermedades cardiovasculares (Thum et al., 2008, Thum and Condorelli, 2015, Viereck and Thum, 2017). Estas características, junto con su accesibilidad mínimamente invasiva, hacen de los miRNA circulantes

unos buenos candidatos a biomarcadores para parámetros clínicamente relevantes (Viereck and Thum, 2017).

Se ha demostrado que los miRNA son capaces de atravesar la membrana plasmática, por lo que su contenido informativo podría ser transmitido y propagarse entre células adyacentes y distantes. De hecho, se han descrito miRNA en diferentes fluidos corporales humanos como la sangre, suero/plasma, orina y leche materna (Chen et al., 2008, Fritz et al., 2016, Mitchell et al., 2008, Weber et al., 2010a). Aunque estos ambientes contienen gran cantidad de RNAsas, la existencia de miRNA indica que son relativamente resistentes a la degradación (Tsui et al., 2002). Los mecanismos de transporte de los miRNA circulantes intervienen en su estabilidad e incluyen (1) encapsulación en vesículas extracelulares, incluyendo exosomas, micropartículas y cuerpos apoptóticos, y (2) asociación con proteínas de unión a RNA: nucleofosmina, Ago2 o complejos lipoproteicos como lipoproteínas de alta densidad, HDL (Chen et al., 2012, Turchinovich et al., 2013, Vickers et al., 2011, Viereck and Thum, 2017).

Los exosomas son vesículas pequeñas (30-100 nm) que se originan a partir de endosomas intracelulares y se liberan mediante fusión con la membrana plasmática. Las micropartículas son por lo general más grandes (100-1000 nm) y se originan a partir de evaginaciones de la membrana plasmática. La clase de vesículas extracelulares de mayor tamaño son los cuerpos apoptóticos (500-2000 nm) que se liberan de las células durante la apoptosis (Viereck and Thum, 2017). La idea de la transferencia de miRNA mediante vesículas extracelulares surgió en 2007 cuando Valadi et al. cultivaron diferentes líneas celulares de mastocitos y recogieron sus vesículas extracelulares secretadas (Valadi et al., 2007). Se ha observado que el contenido de las vesículas extracelulares puede diferir del contenido

## Introducción

de la célula donadora (Valadi et al., 2007), lo que sugiere mecanismos específicos de selección y empaquetado (Fritz et al., 2016).

El origen celular específico de los miRNA en fluidos extracelulares se desconoce. Con excepción de algunos miRNA que poseen una expresión específica de tejido, no está claro qué células, tejidos y órganos contribuyen específicamente a la liberación de estos miRNA (Fritz et al., 2016). El conocimiento de su origen sería interesante sobretodo en el contexto de enfermedades, donde conocer el origen de determinados miRNA permitiría comprender el mecanismo molecular subyacente (Fritz et al., 2016). En general, la presencia de miRNA circulantes puede ser resultado de una fuga pasiva a partir de células muertas o apoptóticas (Zernecke et al., 2009), de la secreción en respuesta a un estímulo (Hergenreider et al., 2012, Laffont et al., 2013, Wang et al., 2010b) o de la utilización de canales o receptores en la membrana celular (Fritz et al., 2016, Viereck et al., 2014).

Las vesículas extracelulares, así como su contenido, pueden ser captados por las células receptoras, permitiendo una comunicación intercelular (De Rosa et al., 2011, Hergenreider et al., 2012, Valadi et al., 2007, Zernecke et al., 2009). Se desconoce cómo las vesículas extracelulares se dirigen específicamente a las células receptoras, pero podría estar mediado por receptores de membrana (Fritz et al., 2016). Varios estudios sugieren que esta comunicación intercelular mediante miRNA podría desempeñar un papel importante en las enfermedades cardiovasculares (Bang et al., 2014, Barile et al., 2014, Hergenreider et al., 2012, Ong et al., 2014, Zernecke et al., 2009).

La presencia de miRNA en el espacio extracelular y en la circulación sanguínea indica que estas moléculas podrían ejercer una función señalizadora actuando de forma autocrina, paracrina y posiblemente endocrina (Viereck et al., 2014). Es probable que la

presencia de altas concentraciones de miRNA circulantes procedentes de una célula donadora tengan impacto sobre una célula receptora vecina y, por tanto, sean fisiológicamente relevantes (Fritz et al., 2016). Aunque varios estudios han evaluado su función en la comunicación intercelular de forma paracrina, la consecuencia y el efecto biológico de la liberación de miRNA a nivel sistémico sigue siendo una cuestión a resolver. Además, se desconoce si estos miRNA circulantes están presentes a concentraciones fisiológicamente relevantes que permitan una actividad funcional (Fritz et al., 2016). De hecho, un estudio de secuenciación de RNA ha revelado que la concentración total de miRNA en plasma se encuentra en un rango de 100 fM y que la concentración de cualquier miRNA individual es solo una fracción de este número (Williams et al., 2013). Por tanto, se desconoce si estas cantidades de miRNA circulantes podrían permitir una actividad funcional en las células receptoras, tejidos y órganos análoga a la que por ejemplo ejercen las hormonas, las cuales están generalmente presentes en el rango de pM (Fritz et al., 2016, Williams et al., 2013). Sin embargo, se han asociado patrones de expresión de miRNA en fluidos corporales con estados patológicos y, por tanto, los transcritos extracelulares podrían tener potencial para futuras aplicaciones pronósticas y diagnósticas (Fichtlscherer et al., 2010, Kumarswamy and Thum, 2013, Navickas et al., 2016, Thum et al., 2008, Wang et al., 2010a).

En los últimos años, gran cantidad de estudios han evaluado los miRNA como indicadores tempranos de daño cardíaco a causa de SCA. En general, los miRNA específicos de miocardio y/o altamente expresados en músculo esquelético: miR-1, miR-133, miR-208 y miR-499 han resultado encontrarse siempre elevados en el torrente sanguíneo de pacientes con enfermedad cardiovascular, particularmente con SCA (Tabla 1). Esto sugiere su utilidad potencial

## Introducción

como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de SCA (Kondkar and Abu-Amero, 2015, Navickas et al., 2016, Viereck et al., 2014, Wang et al., 2010a, Widera et al., 2011).

| miRNA   | Expresión | Referencia  |
|---------|-----------|---|
| miR-1   | ↑         | (Ai et al., 2010)<br>(Cheng et al., 2010)<br>(D'Alessandra et al., 2010)<br>(Gidlof et al., 2011)<br>(Kuwabara et al., 2011)<br>(Liu et al., 2015)<br>(Oerlemans et al., 2012)<br>(Wang et al., 2010a)<br>(Widera et al., 2011) |
| miR-133 | ↑         | (D'Alessandra et al., 2010)<br>(Gidlof et al., 2011)<br>(Kuwabara et al., 2011)<br>(Peng et al., 2014)<br>(Wang et al., 2010a)<br>(Wang et al., 2013a)<br>(Widera et al., 2011)   |
| miR-208 | ↑         | (Corsten et al., 2010)<br>(Devaux et al., 2012)<br>(Gidlof et al., 2011)<br>(Ji et al., 2009)<br>(Liu et al., 2015)<br>(Wang et al., 2010a)<br>(Widera et al., 2011)  |
| miR-499 | ↑         | (Adachi et al., 2010)<br>(Corsten et al., 2010)<br>(D'Alessandra et al., 2010)<br>(Devaux et al., 2012)<br>(Liu et al., 2015)<br>(Oerlemans et al., 2012)<br>(Wang et al., 2010a)<br>(Zhang et al., 2015a)                      |

**Tabla 1. miRNA circulantes específicos de miocardio y/o altamente expresados en músculo esquelético descritos como potenciales biomarcadores de SCA.**

miR-1 se encuentra muy expresado en músculo esquelético y cardiaco, y se ha relacionado con la diferenciación muscular, el desarrollo cardiaco y las enfermedades cardiovasculares (Chen et al., 2006). Varios estudios han demostrado elevados niveles circulantes de miR-1 en pacientes con SCA (Ai et al., 2010, D'Alessandra et al., 2010, Gidlof et al., 2011, Kuwabara et al., 2011, Liu et al., 2015, Oerlemans et al., 2012, Wang et al., 2010a, Widera et al., 2011) así como en modelos animales (Cheng et al., 2010, D'Alessandra et al., 2010, Gidlof et al., 2011, Wang et al., 2010a). Concretamente en ratas, la ligadura de la arteria coronaria provoca una rápida elevación de los niveles de miR-1 en suero (Cheng et al., 2010, D'Alessandra et al., 2010) mientras que sus niveles disminuyen en tejido cardiaco (D'Alessandra et al., 2010), sugiriendo una liberación al torrente sanguíneo como resultado de daño cardiaco. Curiosamente, miR-1 se ha correlacionado positivamente con el tamaño del infarto así como con los niveles en suero de CK-MB (Cheng et al., 2010) y troponina (D'Alessandra et al., 2010, Oerlemans et al., 2012, Widera et al., 2011). Cabe destacar que D'Alessandra et al. demuestran que los niveles más elevados de miR-1 se detectan incluso antes que la detección de niveles elevados de cTnI (D'Alessandra et al., 2010). Además, los niveles de miR-1 se han asociado con el riesgo de mortalidad en pacientes con SCA (Widera et al., 2011).

Al igual que ocurre con miR-1, miR-133 es un regulador crucial del desarrollo cardiaco y del músculo esquelético (Chen et al., 2006), aumentando en condiciones fisiopatológicas (D'Alessandra et al., 2010, Gidlof et al., 2011, Kuwabara et al., 2011, Peng et al., 2014, Wang et al., 2013a, Widera et al., 2011). La primera evidencia de que miR-133 es un potencial biomarcador de infarto agudo de miocardio surge a partir de estudios animales, en los que los niveles plasmáticos de miR-133a se elevan tras la ligadura de la arteria coronaria en ratas



## Introducción

(Wang et al., 2010a) y en ratones (D'Alessandra et al., 2010). También se ha demostrado su aumento en un modelo porcino de isquemia (Gidlof et al., 2011). En estudios clínicos, se ha demostrado asimismo que los niveles de miR-133 incrementan en plasma de pacientes con SCA, los cuales se correlacionan positivamente con los niveles de cTnT (D'Alessandra et al., 2010, Widera et al., 2011) y con el riesgo de mortalidad (Widera et al., 2011). Cabe destacar que D'Alessandra et al. señalan, al igual que para miR-1, que los niveles más elevados de miR-133 se detectan poco tiempo después del inicio de los síntomas de SCA e incluso antes que la detección de niveles elevados de cTnI (D'Alessandra et al., 2010). Este hallazgo ha sido confirmado por Wang et al. (Wang et al., 2013a), quienes muestran que los niveles circulantes de miR-133a se inducen en una fase temprana tras el SCA y se correlacionan positivamente con los niveles de cTnI.

miR-208 se encuentra altamente expresado y de forma específica en miocardio. Se origina a partir de un intrón del gen Myh6 (gen de la cadena pesada de  $\alpha$ -miosina). Está involucrado en la regulación génica del músculo cardíaco, así como en el remodelado cardíaco patológico y la fibrosis (Kondkar and Abu-Amero, 2015). Al igual que miR-1 y miR-133a, la expresión de miR-208 se induce de forma temprana tras la oclusión de la arteria coronaria en ratas (Wang et al., 2010a), en modelo porcino de isquemia (Gidlof et al., 2011) y tras el SCA en humanos (Corsten et al., 2010, Devaux et al., 2012, Gidlof et al., 2011, Liu et al., 2015, Wang et al., 2010a, Widera et al., 2011). Este miRNA también correlaciona con los niveles de cTnT (Corsten et al., 2010, Devaux et al., 2012, Gidlof et al., 2011, Ji et al., 2009, Widera et al., 2011). Al compararse con otros miRNA altamente expresados en miocardio y músculo esquelético, miR-208 muestra la mayor especificidad y sensibilidad para el SCA (Wang et al., 2010a).

miR-499 es un miRNA específico de miocardio codificado por un intrón de Myh7 (gen de la cadena pesada de  $\beta$ -miosina) (Kondkar and Abu-Amero, 2015). Al igual que para los anteriores miRNA cardiacos, se ha descrito un incremento de los niveles circulantes de miR-499 en pacientes con SCA (Adachi et al., 2010, Corsten et al., 2010, D'Alessandra et al., 2010, Devaux et al., 2012, Liu et al., 2015, Oerlemans et al., 2012, Olivieri et al., 2013, Wang et al., 2010a) y también en modelos animales de infarto (D'Alessandra et al., 2010, Gidlof et al., 2011, Wang et al., 2010a). Zhang et al. (Zhang et al., 2015a) demuestran que miR-499 ya se eleva 1 hora después del inicio de los síntomas de dolor torácico y se correlaciona positivamente con los niveles de cTnl y CK-MB en suero (Chen et al., 2015, Zhang et al., 2015a). Junto con miR-208, miR-499 muestra un valor predictivo más preciso en el diagnóstico del infarto agudo de miocardio en comparación con miR-1 (Corsten et al., 2010, Liu et al., 2015).

Muchos estudios han identificado asimismo miRNA no específicos de miocardio ni de músculo esquelético que se encuentran desregulados en la circulación de pacientes con SCA (Tabla 2). Por ejemplo, desde un punto de vista diagnóstico, miR-663b y miR-1291 distinguen de forma específica y sensible pacientes con SCA y controles (Peng et al., 2014), así como miR-150 y miR-486 distinguen entre IAMCEST e IAMSEST y controles (Zhang et al., 2015b). Además, se han utilizado miRNA no cardiacos para la estratificación del riesgo de infarto. Zampetaki et al. realizaron un estudio prospectivo en el que niveles elevados de miR-126 y disminuidos de miR-223 y miR-197 muestran una fuerte asociación con la aparición de SCA y otros factores de riesgo (Zampetaki et al., 2012). miR-197 y miR-223 se han confirmado como predictores de muerte en una gran cohorte de pacientes con enfermedad cardiovascular (Schulte et al., 2015), y Bye et al. proponen un panel de 5 miRNA (let-7g-5p, miR-106-5p, miR-144-

## Introducción

3p, miR-424-5p y miR-660-5p) que mejoran la estratificación del riesgo de SCA en sujetos sanos (Bye et al., 2016).

| miRNA              | Expresión | Referencia  |
|--------------------|-----------|---|
| miR-663b           | ↑         | (Peng et al., 2014)   |
| miR-1291           |           |   |
| miR-150            | ↑         | (Hsu et al., 2014)<br>(Zhang et al., 2015b)   |
| miR-486            |           |   |
| miR-328<br>miR-134 | ↑         | (He et al., 2014)   |
| miR-26a            | ↓         | (Hsu et al., 2014)<br>(Li et al., 2015a)  |
|                    | ↑         | (Icli et al., 2013)   |
| miR-191            | ↓         | (Hsu et al., 2014)<br>(Li et al., 2015a)  |
| miR-21             | ↑         | (Darabi et al., 2016)<br>(Oerlemans et al., 2012)<br>(Wang et al., 2014a)<br>(Zhang et al., 2016) |
| miR-361-5p         | ↑         | (Wang et al., 2014a)  |
| miR-519e-5p        | ↓         |   |

**Tabla 2. miRNA circulantes no específicos de músculo descritos como potenciales biomarcadores de SCA.**

También se ha relacionado la predicción de la evolución de los pacientes tras un infarto agudo de miocardio con diferentes miRNA. Así, un aumento en los niveles de miR-328 y miR-134 se correlaciona con un elevado riesgo de insuficiencia cardiaca y mortalidad dentro de los 6 meses posteriores al infarto (He et al., 2014). Por otro lado, algunos estudios respaldan el papel central que ejerce la familia miR-26 en las enfermedades cardiovasculares (Icli et al., 2014), cuya expresión se ha visto disminuida en pacientes con SCA (Hsu et al., 2014, Li et al., 2015a) sugiriendo su uso como biomarcador para el

diagnóstico y pronóstico de infarto agudo de miocardio en combinación con miR-191 y miR-208b (Li et al., 2015a), así como en la predicción de riesgo de SCA en sujetos sanos (Bye et al., 2016). Sin embargo, otro estudio demuestra un aumento de la expresión de miR-26a en pacientes con SCA (Icli et al., 2013). Se trata de un miRNA altamente expresado en el endotelio vascular descrito como un importante regulador de la angiogénesis, tanto fisiológica como patológica (Icli et al., 2014), así como de la apoptosis de células endoteliales (Zhang et al., 2015d).

Otro potencial biomarcador de SCA es el miR-21, cuyos niveles circulantes aumentan en pacientes con SCA tanto en suero como en plasma (Darabi et al., 2016, Wang et al., 2014a, Zhang et al., 2016, Oerlemans et al., 2012), y se correlacionan con los niveles de cTnl (Wang et al., 2014a). Es un miRNA que se expresa de forma generalizada en el sistema cardiovascular: en células de músculo liso vascular, en células endoteliales, en cardiomiocitos y en fibroblastos cardiacos (Cheng and Zhang, 2010) donde se ha descrito una disregulación de su expresión bajo condiciones de enfermedad cardiovascular como hipertrofia cardiaca, insuficiencia cardiaca y cardiopatía isquémica. Por otro lado, se ha detectado un incremento de los niveles de miR-361-5p y una disminución de miR-519e-5p en pacientes con SCA, los cuales se correlacionan con los niveles de cTnl (Wang et al., 2014a).

Parece que los miRNA no específicos de miocardio ni músculo esquelético tienen un potencial valor como biomarcadores de SCA comparable al de los cardiacos (Viereck and Thum, 2017). Sin embargo, se desconoce si estos miRNA reflejan un efecto secundario al daño cardiaco en lugar de una consecuencia directa y cuál es su origen (Viereck and Thum, 2017).

## Introducción

Como se acaba de indicar, un gran número de estudios sugieren que los miRNA circulantes prometen servir como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico para el SCA. Sin embargo, el estudio de miRNA circulantes se ve dificultado por varios factores metodológicos (McDonald et al., 2011, Paiva and Agbulut, 2017), lo que impide extraer una conclusión general para la introducción de los miRNA en la práctica clínica. La falta de estandarización metodológica impide la comparación entre estudios que utilizan diferentes técnicas analíticas, dando lugar a una falta de consistencia en los resultados. A pesar de que se han estado utilizando grandes cohortes para los estudios del perfil de expresión de miRNA en el SCA, los resultados sólo coinciden en cierta medida.

Entre los factores metodológicos que pueden influir en el resultado de los estudios de miRNA circulantes, el diseño experimental y la toma de muestras sanguíneas son los pasos más críticos. El sexo, la edad y otros factores de riesgo cardiovascular parecen contribuir a la variabilidad de los niveles de miRNA (Goretti et al., 2014). Además, el método de normalización utilizado para la cuantificación puede contribuir a diferencias en los resultados (Goretti et al., 2014, McDonald et al., 2011, Paiva and Agbulut, 2017). Considerando estas limitaciones, sería necesaria una estandarización de los métodos para el diseño del estudio, el manejo de las muestras y el método de cuantificación con el objetivo de eliminar la variabilidad técnica y analítica y así poder generar resultados fiables y reproducibles en los estudios de miRNA como posibles biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del SCA.

### 1.2.5. miRNA EN LA FUNCIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La mayor parte de la información disponible sobre el transcriptoma en pacientes con enfermedad cardiovascular procede de estudios en células y tejidos no cardíacos, como la sangre y células sanguíneas, debido principalmente a su accesibilidad. Sin embargo, los miRNA se han asociado con prácticamente todos los procesos cardiovasculares, desde el desarrollo del corazón hasta la regulación de la contractilidad y la fibrosis e hipertrofia cardíaca. Los miRNA también regulan procesos celulares en el endotelio y la pared vascular, desempeñando una importante función en la biología vascular (Santoro and Nicoli, 2013, Santulli, 2016, Urbich et al., 2008).

El endotelio vascular, una fina capa de células endoteliales que reviste la superficie interna de los vasos sanguíneos, es una interfaz crítica entre la sangre y los tejidos. La regulación de la función endotelial es crucial para el mantenimiento de la homeostasis vascular. El endotelio tiene funciones antitrombóticas y regula el desarrollo, crecimiento y diferenciación de los vasos sanguíneos. Además, controla el tono vascular, la barrera endotelial y el tráfico leucocitario (Aird, 2007). Diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y pueden generar una disfunción endotelial.

La aterosclerosis, la inflamación y la angiogénesis están sumamente interrelacionadas con la activación del endotelio. La activación inflamatoria crónica del endotelio de los vasos sanguíneos induce la proliferación del *vasa vasorum*, favoreciendo la progresión de la lesión. Las placas ateroscleróticas avanzadas se caracterizan por neovascularización. A medida que la capa íntima se engrosa, las zonas en hipoxia de la placa inducen aún más la angiogénesis, de forma que los nuevos vasos sanguíneos liberan más leucocitos inflamatorios a la placa que a su vez producen citoquinas, quimioquinas y factores de

## Introducción

crecimiento que median la regulación positiva de la angiogénesis (Araldi et al., 2015).

Las primeras observaciones que establecieron el papel crucial de los miRNA en la biología vascular derivaron de estudios experimentales en los que la depleción del enzima Dicer, encargado de la maduración del miRNA, daba lugar a defectos en la angiogénesis y el desarrollo cardíaco (Kuehbacher et al., 2007, Suarez et al., 2007, Suarez et al., 2008, van Rooij and Olson, 2007, Yang et al., 2005). En la Tabla 3 se presentan las principales funciones endoteliales reguladas por miRNA y sus proteínas diana.

### **1.2.5.1. CONTROL DEL TONO VASCULAR**

Las células endoteliales contribuyen a la regulación de la presión y el flujo sanguíneos mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (o prostaglandina I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) y vasoconstrictoras, como el tromboxano A<sub>2</sub>, la endotelina-1 (ET-1) y el factor activador de plaquetas (PAF). El NO es el principal vasorrelajante, generado en el endotelio mediante la conversión de L-arginina a L-citrulina por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Factores de crecimiento, como el VEGF, y fármacos, como las estatinas, incrementan la expresión de la eNOS. Por el contrario, la hipoxia, los lipopolisacáridos, el TNF- $\alpha$  y la ox-LDL reducen su expresión. El NO es una molécula ateroprotectora, ya que actúa también como antiagregante plaquetario (de forma sinérgica con la PGI<sub>2</sub>), inhibe la proliferación de las células musculares lisas, es antioxidante e inhibidor de las moléculas de adhesión celular. Por tanto, mediante la alteración de la producción de NO endotelial se perturba profundamente la homeostasis vascular y se induce el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

La primera evidencia de la regulación del tono vascular mediante miRNA se observó en células endoteliales deficientes para Dicer, en las cuales la expresión de eNOS estaba incrementada (Suarez et al., 2007). La transfección con mimicos de miR-221 y miR-222 parcialmente revertía el incremento de la eNOS en respuesta al silenciamiento de Dicer, sugiriendo que estos miRNA podrían estar involucrados en el control de la expresión de eNOS aunque de manera indirecta. Asimismo, se ha demostrado que miR-155 reduce la expresión de su diana eNOS (Sun et al., 2012a). Curiosamente, el TNF- $\alpha$  incrementa la expresión de miR-155 en células endoteliales, mientras que la inhibición de miR-155 evita la disminución de la expresión de eNOS inducida por citoquinas (Sun et al., 2012a). Por otro lado, también se ha observado que el flujo laminar induce la expresión de miR-21, el cual incrementa la producción de NO mediante la regulación de la vía PI3K/Akt (Weber et al., 2010b).

La expresión de ET-1, uno de los vasoconstrictores más potentes, también se ha visto regulada mediante mecanismos que involucran miRNA. Se ha descrito la represión de ET-1 por miR-155 y miR-199 en células endoteliales microvasculares expuestas a etanol (Yeligar et al., 2009). Además, se ha descrito una correlación inversa entre los niveles de miR-125a/b y la proteína precursora de ET-1 (prepro-ET-1) (Li et al., 2010).



## Introducción

| Función endotelial                                 | miRNA            | Proteína diana     | Referencia                                   |
|--|------------------|--------------------|--|
| <b>Tono vascular</b>                               | miR-155          | eNOS               | (Sun et al., 2012a)                          |
|  | miR-155          | ET-1               | (Yeligar et al., 2009)                       |
|  | miR-199          |                    | (Li et al., 2010)                            |
|  | miR-125a/b       |                    |  |
| <b>Permeabilidad vascular</b>                      | miR-125b         | VE-cadherina       | (Muramatsu et al., 2013)                     |
|  | miR-27           |                    | (Young et al., 2013)                         |
|  | miR-218          | ROBO1/2            | (Small et al., 2010)                         |
|  | miR-18a          | RUNX1              | (Miao et al., 2015)                          |
|  | miR-98           | FIH-1              | (Hu et al., 2015)                            |
|  | miR-184          | $\beta$ -catenina  | (Zong et al., 2016)                          |
| <b>Angiogénesis</b>                                | miR-126          | SPRED1             | (Fish et al., 2008)<br>(Wang et al., 2008)   |
|  |                  | PIK3R2             | (Fish et al., 2008)<br>(Sessa et al., 2012)  |
|  |                  | VEGF-A             | (Zhu et al., 2011b)                          |
|  | miR-17           | JAK-1              | (Doebele et al., 2010)                       |
|  | miR-19a          | CCND1              | (Qin et al., 2010)                           |
|  | miR-92a          | ITGA5              | (Bonauer et al., 2009)                       |
|  | miR-221/222      | ETS-1              | (Zhu et al., 2011a)                          |
|  | miR-23<br>miR-27 | SPRY2<br>SEMA6     | (Zhou et al., 2011)                          |
|  | miR-24           | GATA2<br>PAK4      | (Fiedler et al., 2011)                       |
| <b>Inflamación vascular y tráfico leucocitario</b> | miR-126          | VCAM-1             | (Harris et al., 2008)                        |
|  | miR-31           | E-selectina        | (Suarez et al., 2010)                        |
|  | miR-17-3p        | ICAM-1             |  |
|  | miR-181b         | KPNA4              | (Sun et al., 2012b)                          |
|  | miR-146          | TRAF6              | (Cheng et al., 2013)                         |
|  |                  | IRAK1              |  |
|  |                  | HuR                |  |
|  | miR-155          | AT1R<br>ETS-1      | (Zhu et al., 2011a)                          |
|  |                  | p65                | (Wu et al., 2014)                            |
|  | miR-10a          | MAP3K7             | (Fang et al., 2010)                          |
|  |                  | $\beta$ -TRC       |  |
|  | miR-92a          | KLF2/4             | (Fang and Davies, 2012)<br>(Wu et al., 2011) |
| miR-365  | Bcl-2            | (Qin et al., 2011) |  |

**Tabla 3. miRNA en la función y disfunción endotelial.**

### 1.2.5.2 CONTROL DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

Las células endoteliales forman una monocapa en la que se conectan unas a otras mediante diferentes tipos de uniones intercelulares. Esto hace posible el mantenimiento de una función de barrera selectiva para el transporte de moléculas entre la sangre y los tejidos. La pérdida de la función de barrera del endotelio es uno de los primeros eventos que tienen lugar durante la inflamación. Diferentes estímulos, como la histamina y la trombina, inducen un rápido y breve incremento en la permeabilidad vascular mientras que otras proteínas como TNF- $\alpha$  o VEGF, inducen una respuesta de mayor duración. La mayoría de estos mediadores se producen en situaciones de inflamación aguda o crónica.

Diferentes estudios han demostrado el papel de los miRNA en la regulación de la función de barrera (Lopez-Ramirez et al., 2016, Zhuang et al., 2016). Concretamente, miR-125b y miR-27 participan en la represión de la VE-cadherina (Muramatsu et al., 2013, Young et al., 2013). Se ha observado que miR-218 tiene como dianas los componentes de señalización Roundabout (ROBO1) involucrados en la permeabilidad endotelial (Small et al., 2010). Además, la supresión de miR-150 produce un incremento irreversible de la permeabilidad vascular en modelos celulares y de ratón (Rajput et al., 2016). Con respecto a las uniones estrechas, miR-18a y miR-98 incrementan la permeabilidad mediante una regulación negativa de la expresión de las proteínas que las constituyen, al reprimir el factor de transcripción RUNX1 (del inglés, *runt-related transcription factor*) (Miao et al., 2015) y FIH-1 (del inglés, *Factor Inhibiting HIF-1 $\alpha$* ) (Hu et al., 2015), respectivamente. Finalmente, miR-184 media una disminución en la expresión de  $\beta$ -catenina dando lugar a cambios en la estructura de las uniones adherentes en las células endoteliales (Zong et al., 2016).

### 1.2.5.3. CONTROL DE LA ANGIOGÉNESIS

La generación *de novo* y el remodelado de los vasos sanguíneos es esencial tanto para el crecimiento embrionario como durante la vida postnatal. En la edad adulta, el endotelio permanece prácticamente quiescente. De hecho, la angiogénesis en el adulto está casi exclusivamente asociada con patologías, siendo inducida mediante factores microambientales como hipoxia o inflamación (Chamorro-Jorganes et al., 2013). Las células endoteliales juegan un papel esencial en la angiogénesis, la cual depende de su proliferación, migración y diferenciación. Uno de los procesos patológicos asociados con la angiogénesis es la aterosclerosis y a su vez, la formación de nuevos vasos sanguíneos es un componente esencial en patologías como la isquemia.

El miR-126 fue el primer miRNA descrito implicado en la función endotelial. Se trata de un miRNA específico de células endoteliales donde se encuentra altamente expresado, involucrado en la regulación de la angiogénesis y en el mantenimiento de la integridad vascular (Fish et al., 2008, Wang et al., 2008). miR-126 induce la angiogénesis al reprimir la expresión de sus dianas, entre las que se encuentran SPRED1 y PIK3R2 (también conocida como p85- $\beta$ ), reguladores negativos de la señalización de VEGF mediante la vía de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) y PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), respectivamente (Fish et al., 2008, Sessa et al., 2012, Wang et al., 2008). Además, se ha demostrado que VEGF-A es otra diana importante de miR-126 (Zhu et al., 2011b). Por otro lado, se ha demostrado que miR-126 induce la señalización de angiopoyetina-1 (Ang-1) mediante la represión de PIK3R2, la cual juega un papel

esencial en la estabilización y maduración de los vasos sanguíneos (Sessa et al., 2012).

El *cluster* miR-17-92 es uno de los miRNA policistronicos mejor caracterizados y codifica 6 miRNA maduros: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a y miR-92a. Se localiza en una región del DNA que es amplificada en linfomas y tumores sólidos, por lo que es considerado como un potencial oncogen (He et al., 2005). Está regulado a nivel transcripcional mediante los factores de transcripción *c-myc* (del inglés, *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) y su efector E2F, que estimula la progresión del ciclo celular (O'Donnell et al., 2005). Todos los miembros del *cluster* están altamente expresados en células endoteliales (Bonauer et al., 2009), regulando la integridad vascular y la angiogénesis (Kuhnert and Kuo, 2010). Se ha demostrado la participación del *cluster* miR-17-92 en la angiogénesis debido a su implicación en la proliferación, supervivencia y organización de las células endoteliales (Chamorro-Jorganes et al., 2016, Suarez et al., 2008). La función anti- o pro-angiogénica del *cluster* parece estar estrictamente relacionada con el contexto celular. En células endoteliales se demostró que miR-17 regula negativamente la expresión de la proteína pro-angiogénica JAK-1 (del inglés, *Janus kinase 1*) (Doebele et al., 2010), mientras que miR-19a modula la progresión del ciclo celular reprimiendo CCND1 (del inglés, *cyclin D1*) (Qin et al., 2010). Asimismo, la sobreexpresión de otro miembro del *cluster*, miR-92a, inhibió la formación de redes vasculares mediante la represión de ITGA5 (integrina  $\alpha$ -5) y suprimiendo indirectamente la expresión de eNOS (Bonauer et al., 2009). Curiosamente, los componentes del *cluster* son inducidos por VEGF, indicando su contribución a las respuestas angiogénicas (Suarez et al., 2008).

## Introducción

Otros miRNA también han sido descritos como antiangiogénicos, reprimiendo la migración celular y la proliferación. El aumento de la expresión de miR-221/222 se ha correlacionado con una disminución de la migración celular endotelial y la angiogénesis (Poliseno et al., 2006). De hecho, el *cluster* miR-221/222 tiene como diana el factor de transcripción ETS-1 (del inglés, *E26 transformation-specific sequence*), el cual regula vías pro-angiogénicas (Zhu et al., 2011a).

El *cluster* miR-23-24-27 se expresa en células endoteliales y tejidos vascularizados y está muy involucrado en angiogénesis. En concreto, miR-23 y miR-27 reprimen SPRY2 (Sprouty2) y SEMA6A (Semaphorin-6a), los cuales regulan negativamente la señalización angiogénica mediada por Ras/MAPK y VEGFR2, respectivamente (Zhou et al., 2011). El otro miembro del *cluster*, miR-24, está muy expresado en células endoteliales cardíacas y su expresión aumenta en isquemia cardíaca y bajo condiciones hipóxicas (Fiedler et al., 2011). La sobreexpresión de miR-24 potencia la apoptosis endotelial y disminuye la angiogénesis al reprimir el factor de transcripción GATA2 (del inglés, *gata binding protein 2*) y PAK4 (del inglés, *p21-activated kinase*) (Fiedler et al., 2011).

### **1.2.5.4 CONTROL DE LA INFLAMACIÓN VASCULAR Y EL TRÁFICO LEUCOCITARIO**

La inflamación se define generalmente como el reclutamiento local y activación de leucocitos. En respuesta a citoquinas inflamatorias incluyendo IL-1 y TNF- $\alpha$ , las células endoteliales pasan a estar activadas, de forma que expresan moléculas de adhesión tales como VCAM-1 (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) e ICAM-1 (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*), responsables de la

interacción con los leucocitos. Controlan así el proceso mediante el cual los leucocitos acaban siendo extravasados en los puntos donde tiene lugar la inflamación.

La primera evidencia de la regulación de la inflamación vascular mediante miRNA fue publicada por Harris et al. (Harris et al., 2008), quienes describieron el papel de miR-126 en la represión de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales expuestas a TNF- $\alpha$ , efecto que reduce la interacción de los leucocitos con las células endoteliales. El control de la expresión de miR-126 es mediado, en parte, por los factores de transcripción Ets-1 y Ets-2 los cuales regulan la diferenciación de las células endoteliales y la inflamación vascular (Harris et al., 2010). La expresión de Ets-1 se induce en respuesta a estímulos proinflamatorios, activando la expresión de genes inflamatorios como MCP-1 (del inglés, *monocyte chemoattractant protein 1*) y VCAM-1. Por tanto, es posible que la inducción de miR-126 pueda formar parte de un circuito de retroalimentación negativa para amortiguar la respuesta inflamatoria inducida por Ets-1 (Figura 5).

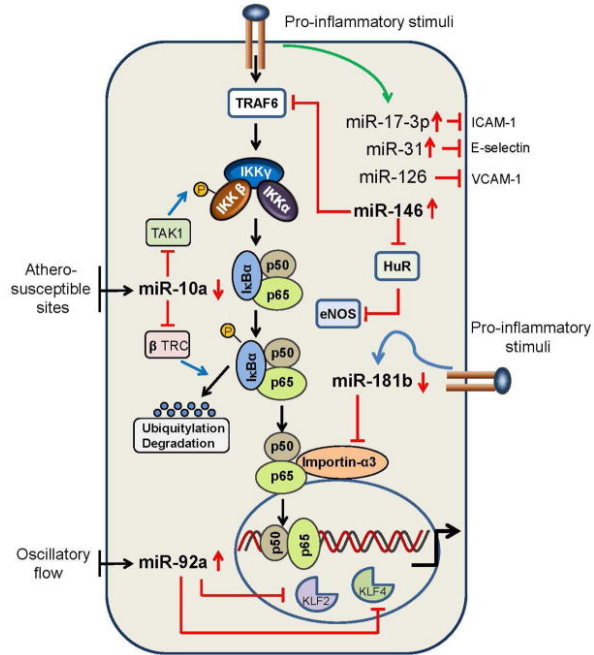
Otros reguladores de la activación endotelial inducida por citoquinas incluyen miR-31 y miR-17-3p, los cuales reducen la expresión de E-selectina e ICAM-1, respectivamente, en células endoteliales estimuladas por TNF- $\alpha$  (Figura 5). Este efecto inhibe la adhesión de los leucocitos a la monocapa de células endoteliales activadas (Suarez et al., 2010). La expresión de miR-31 y miR-17-3p es inducida mediante TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que estos miRNA también podrían constituir un mecanismo de retroalimentación negativa que regula la respuesta inflamatoria.

Un mediador clave de la disfunción endotelial es el factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B (en inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Csiszar et al., 2008,

## Introducción

Frangogiannis, 2006). Está compuesto por homo- y heterodímeros de RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1), o p52/p100 (NF- $\kappa$ B2), siendo los heterodímeros p65/p50 los activadores predominantes de la transcripción en células endoteliales. NF- $\kappa$ B es recluido en el citoplasma mediante su interacción con el I $\kappa$ B (Inhibitor of  $\kappa$ B) bajo condiciones basales. En respuesta a una señalización inflamatoria, el complejo IKK activado (I $\kappa$ B kinase) puede fosforilar I $\kappa$ B promoviendo su degradación proteasomal y por tanto, liberando NF- $\kappa$ B para entrar al núcleo y unirse a sus dianas transcripcionales, las cuales incluyen genes de supervivencia, genes que codifican citoquinas proinflamatorias y quimioquinas y moléculas de adhesión leucocitaria, como VCAM-1 y E-selectina (Brasier, 2010, Cheng et al., 2014, De Martin et al., 2000, Frangogiannis, 2006). Debido a la potente red inflamatoria de genes que se activan mediante NF- $\kappa$ B, esta vía transcripcional se encuentra estrictamente regulada, y en ella convergen multitud de circuitos reguladores para inhibir la actividad basal NF- $\kappa$ B y para resolver las respuestas inflamatorias mediadas por NF- $\kappa$ B (Boldin and Baltimore, 2012, Cheng et al., 2014).

Sun et al. identificaron el miR-181b como un regulador negativo fundamental de la inflamación vascular mediada por la activación NF- $\kappa$ B, debido a la acción sobre su diana KPNA4 (importin- $\alpha$ 3), una proteína crítica en la translocación de NF- $\kappa$ B del citoplasma al núcleo (Sun et al., 2012b). Además, se observó una disminución de su expresión en células endoteliales en respuesta al estímulo proinflamatorio TNF- $\alpha$ . Debido a que la activación de NF- $\kappa$ B es crítica para las respuestas inflamatorias inducidas por TNF- $\alpha$ , se ha observado que miR-181b reduce indirectamente genes de respuesta a NF- $\kappa$ B como VCAM-1 y E-selectina en células endoteliales (Sun et al., 2012b) (Figura 5).



**Figura 5. miRNA e inflamación vascular.** Mir-17-3p, miR-31 y miR-126 tienen como diana la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), E-selectina y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1), respectivamente. miR-181b tiene como diana la importina-α3, de forma que suprime la señalización por NF-κB al inhibir su translocación nuclear. miR-146 reprime TRAF6 y HuR, regulando la activación de NF-κB y la expresión de eNOS. La expresión de miR-10a y miR-92a es regulada por flujo laminar. miR-10a reduce la activación de NF-κB mediante represión de su diana MAP3K7, también conocida como TAK1, y β-TCR. miR-92a está involucrado en la regulación de la activación endotelial reprimiendo los factores de transcripción KLF2 y KLF4. Imagen tomada de (Sun et al., 2013a).

Estudios realizados por Cheng et al. demostraron que las citoquinas proinflamatorias inducen la expresión de miR-146a y miR-146b en células endoteliales (Cheng et al., 2013). Curiosamente, la inducción de miR-146 dependiente de NF-κB ejerce un papel crítico en la atenuación de la señalización por NF-κB. Esto se logra a través de



## Introducción

sus dianas TRAF6 (del inglés, *TNF receptor associated factor 6*) e IRAK1 (del inglés, *IL-1 receptor associated kinase*) (Cheng et al., 2013, Taganov et al., 2006), reguladores de la vía NF- $\kappa$ B (Figura 5). Además de las dianas TRAF6/IRAK1, se ha identificado a la proteína de unión a RNA, HuR, como una nueva diana de miR-146. HuR promueve la activación endotelial mediante la represión de la vía antiinflamatoria KLF2 (Kruppel-like Factor 2)/eNOS (Cheng et al., 2013).

Varios estudios han evaluado la función de miR-155 en células endoteliales vasculares, relacionándolo con un efecto antiinflamatorio. Por ejemplo, miR-155 puede reprimir la expresión del receptor tipo 1 de angiotensina II (AT1R) y ETS-1. La angiotensina II es un potente inductor de inflamación, y se ha demostrado que ETS-1 induce la expresión de VCAM-1 y MCP-1 en respuesta a la estimulación con angiotensina II. Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-155 inhibiría el efecto proinflamatorio de la angiotensina II (Zhu et al., 2011a). La expresión de miR-155 también es inducida por la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , y puede actuar como un regulador en un circuito de retroalimentación negativa mediante la represión de p65 e inhibición de la activación endotelial (Wu et al., 2014).

La dinámica del flujo sanguíneo desempeña un papel fundamental en la regulación de la biología vascular, y diferencias regionales en esta dinámica repercuten en la inflamación y progresión de la aterosclerosis. Las áreas de la vasculatura expuestas a un flujo laminar uniforme están protegidas frente a la inflamación y el desarrollo de aterosclerosis, mientras que regiones con flujo alterado (encontradas normalmente en puntos de ramificación, bifurcaciones y la curvatura inferior de vasos arqueados) son propensas a la activación inflamatoria y formación de placas. El flujo laminar pone en marcha un programa de expresión génica que incluye la activación de factores de

transcripción ateroprotectores como KLF2 (SenBanerjee et al., 2004) y la inhibición de factores de transcripción pro-inflamatorios como NF- $\kappa$ B (Dai et al., 2004). Además, el flujo sanguíneo modula la expresión de varios miRNA. Por ejemplo, miR-10a es un microRNA altamente expresado en células endoteliales cuya expresión se ve disminuida en regiones propensas a desarrollar aterosclerosis. miR-10a regula negativamente la actividad NF- $\kappa$ B en células endoteliales mediante su acción directa sobre MAP3K7 (también conocida como TAK1) y  $\beta$ -TRC, dos reguladores de la degradación proteasomal de I $\kappa$ B $\alpha$  y la translocación de p65 (Fang et al., 2010) (Figura 5).

Un flujo sanguíneo alterado induce la expresión de miR-92a en células endoteliales, mientras que el flujo laminar disminuye su expresión. Curiosamente, KLF2 y KLF4 son dianas de miR-92a (Fang and Davies, 2012, Wu et al., 2011). Estos factores de transcripción inhiben genes inflamatorios dependientes de NF- $\kappa$ B, por lo que miR-92a promovería la señalización por NF- $\kappa$ B mediante la represión de KLF2/KLF4 (Hamik and Jain, 2012) (Figura 5).

Las lipoproteínas oxidadas de baja densidad (ox-LDL) inducen la expresión de genes proinflamatorios, dando como resultado el reclutamiento de monocitos en la pared vascular y disfunción endotelial (Li et al., 2000). Se considera que la apoptosis mediada por ox-LDL en las células endoteliales juega un papel crítico en la aterosclerosis. miR-125a/b se encuentran altamente expresados en endotelio y su expresión puede ser modulada por ox-LDL (Li et al., 2010). Las ox-LDL también regulan la expresión en células endoteliales de miR-365, el cual potencia la apoptosis mediada por ox-LDL mediante la regulación de Bcl-2 (Qin et al., 2011).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La expresión de miRNA está estrictamente regulada y su alteración se ha asociado con diversas patologías, entre ellas el SCA. A pesar de la existencia de limitaciones metodológicas, se ha demostrado que en pacientes con IAMCEST, junto a los biomarcadores de referencia actuales, determinados perfiles de expresión de miRNA podrían contribuir a un diagnóstico más temprano y preciso del SCA. Sin embargo, en el caso del SCASEST existe una mayor incertidumbre en su diagnóstico, por lo que el conocimiento del perfil de expresión de miRNA circulantes podría suponer una especial contribución en la detección de esta patología. Además, los miRNA circulantes desregulados en pacientes con SCASEST podrían modular la función endotelial e incluso asociarse con los niveles de citoquinas inflamatorias implicadas en la patología del SCA, añadiendo valor a su posible utilidad como biomarcadores del SCASEST.

Por esta razón, el objetivo general de este trabajo fue analizar el perfil de expresión de los miRNA circulantes en pacientes con SCASEST e identificar aquellos que tienen una relación directa con la manifestación aguda de la patología. Asimismo, determinar en qué medida afectan a la función endotelial en células en cultivo y su posible relación con los niveles de citoquinas implicadas en la patología del SCA.

## Hipótesis y objetivos

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar en suero y plasma el control endógeno adecuado para la normalización de la expresión de miRNA circulantes mediante qRT-PCR en pacientes con SCASEST.
2. Comparar en suero y plasma mediante qRT-PCR la expresión de miRNA circulantes descritos en la bibliografía como potenciales biomarcadores de SCA en pacientes con SCASEST y seleccionar el tipo de muestra de partida más adecuado.
3. Analizar mediante *arrays* el perfil de expresión de miRNA circulantes en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y tras un año de evolución clínica.
4. Seleccionar los miRNA circulantes relacionados con la manifestación aguda del SCASEST y comprobar su expresión mediante qRT-PCR en una población de estudio más amplia.
5. Analizar mediante qRT-PCR la expresión del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y tras un año de evolución clínica.
6. Estudiar el papel del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en la modulación de la función endotelial en términos de adhesión, proliferación y capacidad vasculogénica en células endoteliales humanas en cultivo.

7. Analizar la correlación entre la expresión de miRNA circulantes relacionados con la manifestación aguda del SCASEST y los niveles en suero de citoquinas y quimioquinas implicadas en la patología del SCA.





### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



Este estudio ha sido realizado bajo la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico de Valencia (CEIC 2014/01/30) y del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona (CEIC 2013/8812), conforme a los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los sujetos proporcionaron el consentimiento informado para participar en el estudio. Parte de los resultados presentados en esta tesis se enmarcan dentro del proyecto titulado “Modificación del perfil endotelial de miRNA en respuesta al estradiol y al envejecimiento. Relación con la evolución clínica de la reestenosis coronaria” FIS PI13/0617 y del proyecto titulado “Perfil plasmático de miRNA en infarto agudo de miocardio: relación con la evolución clínica en pacientes y con la función cardiovascular y posible terapia con micropartículas en ratones” FIS PI16/00229.

### **3.1. ESTUDIO EN PACIENTES**

#### **3.1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y RECOGIDA DE MUESTRA**

Durante el periodo comprendido entre abril de 2014 hasta octubre de 2016 se incluyeron en el estudio 75 pacientes con SCA por el Servicio de Cardiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona.

Los criterios de inclusión fueron: ingreso por síndrome coronario agudo asociado con la angina inestable (UA) o SCA sin elevación ST (IAMSEST), sometidos a una intervención coronaria percutánea (ICP) para la implantación electiva de un stent de metal (BMS) o stent con fármaco (DES).

Como criterios de exclusión se establecieron: SCA con elevación del ST (IAMCEST) e ICP sin éxito en el implante del stent, en la que se elija el uso de balón de angioplastia o el tratamiento exclusivamente farmacológico.

En pacientes con SCA, se recogieron muestras de sangre venosa periférica (20 ml) antes de la intervención ICP. De los 20 ml de sangre, se recogieron 10 ml en tubos BD Vacutainer SST con activador de coagulación y gel de polímeros separador de suero, y 10 ml en tubos con anticoagulante EDTA K<sub>2</sub> para aislamiento de plasma (Becton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos), que se enviaron inmediatamente ( $\leq 1$  h) al laboratorio. Al cabo de un año desde la ICP se recogió una segunda muestra de sangre.

Como controles, se incluyeron muestras de plasma y suero de un grupo de 51 sujetos sanos proporcionadas por el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona y por el Biobanco IBSP-CV (PT13/0010/0064), integrado en la Red Nacional de Biobancos y en la Red Valenciana de

Biobancos, con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, y han sido procesados siguiendo procedimientos normalizados.

Las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 15 min a 4°C para la obtención de suero y plasma. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a un tubo estéril y centrifugado nuevamente a 3000 g durante 5 min con el fin de precipitar cualquier desecho y componentes insolubles. El suero o plasma fueron alicuotados en tubos eppendorf DNA/RNA Lobind (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de 1.5 ml libres de RNasas y fueron congelados inmediatamente a - 80°C hasta su análisis.

### **3.1.2. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS Y SEGUIMIENTO**

Se recogieron los datos clínicos de los pacientes (factores de riesgo coronario como hipertensión, dislipemia, diabetes mellitus y tabaquismo), el tratamiento farmacológico que seguían (dosis y la duración de la prescripción de fármacos), las causas de la elección ICP (UA o IAMSEST) y tipo de stent utilizado (BMS o DES).

### **3.1.3. EXTRACCIÓN DE RNA**

El RNA total circulante (tRNA) se aisló a partir de suero y plasma utilizando el kit miRCURY RNA Isolation Kit for Biofluids (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una alícuota de 400 µl de suero o plasma por muestra fue transferida a un nuevo tubo de microcentrífuga libre de RNasas para la lisis y precipitación proteica con las soluciones proporcionadas. El tRNA fue precipitado con isopropanol y cargado en columnas que contenían una matriz de sílice para la purificación, proporcionadas por

## Material y métodos

el kit. Siguiendo los lavados recomendados, el tRNA fue eluido añadiendo 50  $\mu$ l de agua libre de RNAsas a la columna con posterior incubación durante 1 min antes de la centrifugación a 15000 g 1 min a temperatura ambiente. El tRNA fue almacenado en tubos eppendorf DNA/RNA Lobind a -80°C hasta que se procedió a la cuantificación de los niveles de expresión de miRNA.

La calidad de miRNA fue evaluada mediante el bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) y su cuantificación se llevó a cabo mediante el fluorómetro Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU).

### **3.1.4. PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA**

El perfil de expresión de miRNA se determinó mediante arrays TaqMan® de baja densidad (TaqMan® Low Density Array, TLDA) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) en muestras de tRNA aisladas de suero de 8 pacientes con SCASEST en el momento del infarto y al año de la ICP. Se incluyeron 8 muestras de tRNA aisladas de suero procedente de sujetos control.

Los TLDA actúan como recipientes para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tratándose de placas de 384 pocillos, cada uno de ellos precargados con sondas y cebadores prediseñados y específicos de miRNA (TaqMan® Gene Expression Assays) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). La determinación del perfil de expresión de miRNA mediante arrays se desarrolló en tres pasos: una reacción de retrotranscripción seguida de una reacción de preamplificación y dos TaqMan® MicroRNA Arrays (Array A y B) por muestra.

Cada array (A y B) contiene 384 sondas y cebadores prediseñados y específicos de miRNA, 3 correspondientes a controles endógenos (U6 snRNA, RNU44 y RNU48) y una sonda sin homología para humanos como control negativo. Se analiza así en cada muestra la expresión de un total de 754 miRNA y 3 controles endógenos de miRNA. La nomenclatura utilizada corresponde a la utilizada en la base de datos miRBase 21.

### **3.1.4.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

La transcripción reversa (RT) es la síntesis de un DNA monocatenario (DNA complementario o cDNA) mediante un RNA monocatenario como plantilla, mediado por enzimas transcriptasas reversas.

Para llevar a cabo la reacción de RT se utilizó el kit TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) con los cebadores Megaplex<sup>™</sup> RT Primers (Human pool A and B) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

Se combinaron 5 µl (50 ng) de tRNA y 5 µl del RT mix (Megaplex<sup>™</sup> RT Primers, dNTPs, MultiScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase, RT Buffer, MgCl<sub>2</sub> e Inhibidor de RNasa). La reacción se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler Eppendorf Thermocycler (Eppendorf) programado con las siguientes condiciones: 40 ciclos (2 min a 16°C, 1 min a 42°C, 1 s a 50°C) y 5 min a 85°C. El cDNA obtenido fue posteriormente preamplificado para llevar a cabo el análisis de expresión génica mediante los arrays.



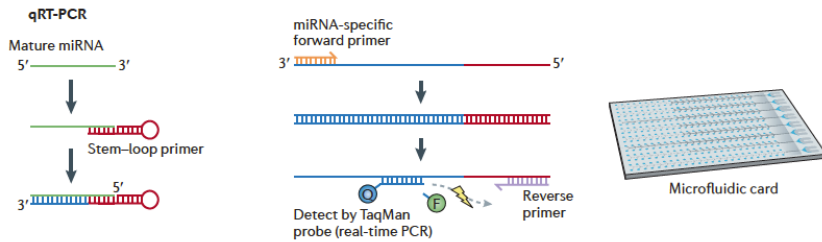
### **3.1.4.2. PREAMPLIFICACIÓN**

La reacción de preamplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  y contenía: 5  $\mu\text{l}$  del producto de la RT y 20  $\mu\text{l}$  del mix PreAmp reaction (TaqMan® PreAmp Master Mix, Megaplex™ PreAmp Primers y agua libre de nucleasas) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Se realizó en el termociclador Mastercycler Eppendorf Thermocycler programado con las siguientes condiciones: 10 min a 95°C, 2 min a 55°C, 2 min a 72°C, 12 ciclos (15 s a 95°C; 4 min a 60°C) y 10 min a 99.9°C requeridos para la inactivación del enzima. Se utilizó una dilución 1:5 del producto de la reacción de preamplificación para llevar a cabo la posterior reacción de qRT-PCR.

### **3.1.4.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL**

La expresión relativa de los miRNA seleccionados se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), en la que se amplifican, detectan y cuantifican secuencias específicas.

El enzima DNA polimerasa incluida en el mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) amplifica el cDNA preamplificado utilizando los cebadores y sondas específicos de secuencia fijados sobre el array. La presencia de la diana se detecta a tiempo real mediante la hidrólisis de la sonda TaqMan por la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa, de manera que el fluoróforo que contiene emite fluorescencia al quedar separado de su desactivador de fluorescencia (*quencher*) (Figura 6).



**Figura 6. qRT-PCR.** Las características de los miRNA suponen dificultades para una precisa detección y cuantificación. La longitud de los miRNA maduros (~22nt) es insuficiente para la hibridación de los primers tradicionales diseñados para la RT y PCR. Además, a diferencia de los mRNA, los miRNA pierden la cola poli (A), secuencia común que se utiliza generalmente como sitio de unión para la RT. TaqMan solventa estas dificultades utilizando cebadores para la RT en forma de lazo, específicos del extremo 3' del miRNA. Los amplicones se generan utilizando un cebador específico del miRNA, mediante el cual la DNA polimerasa continua, de manera que la sonda TaqMan es hidrolizada separándose de su *quencher* y dando como resultado la emisión de fluorescencia. Imagen tomada de (Pritchard et al., 2012).

Para cada array, el mix de la reacción de PCR se compuso de 450  $\mu\text{l}$  de TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 9  $\mu\text{l}$  del producto diluido de la preamplificación y 441  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas. Se cargaron 100  $\mu\text{l}$  del mix de la reacción de PCR en cada depósito de llenado del array y se llevó a cabo la centrifugación vertical de la placa, de forma que la muestra se dispersó llenando todos los pocillos de la placa. La qRT-PCR se llevó a cabo en el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) con las condiciones fijadas por el fabricante.

La cuantificación relativa de la expresión de miRNA en las muestras SCASEST respecto de las muestras control se calculó según el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  mediante el software SDS 2.1. Se utilizó el U6 snRNA como control endógeno. Los resultados se expresaron como promedio de ( $-\Delta\Delta\text{Ct}$ ) para cada condición.

## Material y métodos

El ciclo umbral ( $C_t$  o *threshold cycle*) es el ciclo de la PCR cuando la curva de amplificación cruza el umbral de señal de fluorescencia, y se utiliza como una medida relativa de la concentración de partida de la diana en la reacción.

$$\Delta C_{t_{\text{muestra}}} = C_{t_{\text{gen de interés}}} - C_{t_{\text{gen control endógeno}}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{muestra}}} - \Delta C_t (\text{control} = \text{media de los valores } C_t \text{ de todas las muestras control})$$

### 3.1.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión individual de miRNA seleccionados se determinó en muestras de tRNA aisladas a partir de suero y plasma de todos los pacientes SCASEST así como de los sujetos sanos incluidos como controles.

#### 3.1.5.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

La RT de miRNA a cDNA se llevó a cabo utilizando cantidades equivalentes (50 ng) de miRNA mediante el kit TaqMan<sup>®</sup> microRNA Reverse Transcription Kit.

Para un volumen total de reacción de 20  $\mu\text{l}$ , se combinaron 10.6  $\mu\text{l}$  de RT master mix que contenía: los cebadores específicos para la RT de los miRNA de estudio, dNTPs, solución tampón, inhibidor de RNasas y el enzima transcriptasa reversa MultiScribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase, con 9.4  $\mu\text{l}$  de muestra con la concentración determinada de miRNA (50 ng).

La RT se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler Eppendorf Thermocycler programado para permitir la hibridación de los cebadores con los miRNA, seguido por la síntesis de cDNA y un paso

final de inactivación del enzima: 30 min a 16°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C. Se realizó una dilución 1:5 del cDNA obtenido y fue inmediatamente amplificado mediante PCR o almacenado a -20°C hasta su utilización.

### **3.1.5.2. PREAMPLIFICACIÓN**

Para la cuantificación de miRNA cuya expresión era indetectable en muestras de suero mediante qRT-PCR (miR-1, miR-208b, miR-499, miR-523), se realizó una reacción de preamplificación posterior a la RT y previa a la qRT-PCR.

Para un volumen total de reacción de 25 µl se combinaron 15 µl de master mix que contenía: cebadores específicos para la RT de los miRNA de interés (TaqMan® Gene Expression Assays) y TaqMan® PreAmp Master Mix, con 10 µl del correspondiente producto de la RT.

La reacción de preamplificación se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler Eppendorf Thermocycler programado de la siguiente forma: 10 min a 95°C, 2 min a 55°C, 2 min a 72°C, 15 ciclos (15 s a 95°C; 4 min a 60°C), y un paso final de 10 min a 99.9°C para la inactivación del enzima. Se realizó una dilución 1:8 del producto de la reacción de preamplificación, el cual fue inmediatamente amplificado mediante qRT-PCR o almacenado a -20°C hasta su utilización.

### 3.1.5.3. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

La qRT-PCR se llevó a cabo en el termociclador 7900HT. Se utilizaron sondas específicas fluorescentes de hidrólisis TaqMan® Gene Expression Assays (Tabla 4) combinadas con TaqMan® Universal Master Mix II, No AmpErase® UNG y la muestra de cDNA (o el producto de la preamplificación en el caso de los miRNA cuya expresión era indetectable) en volúmenes de reacción de 10 µl. Las condiciones de la qRT-PCR fueron: 10 min a 95°C para la activación del enzima, seguidos por 45 ciclos (15 s a 95°C; 1 min a 60°C).

| miRNA        | Referencia | miRNA        | Referencia |
|--------------|------------|--------------|------------|
| U6 snRNA     | 001973     | hsa-miR-874  | 002268     |
| RNU44        | 001094     | hsa-miR-92a  | 000431     |
| RNU48        | 001006     | hsa-miR-26a  | 000405     |
| hsa-miR-186  | 002285     | hsa-miR-320b | 002844     |
| hsa-miR-191  | 002299     | hsa-let-7e   | 002406     |
| hsa-miR-192  | 000491     | hsa-miR-99b  | 000436     |
| hsa-miR-451  | 001141     | hsa-miR-125a | 477884_mir |
| hsa-miR-484  | 001821     | hsa-miR-1    | 002222     |
| hsa-let-7g   | 002282     | hsa-miR-208b | 002290     |
| hsa-miR-28   | 002446     | hsa-miR-21   | 000397     |
| hsa-miR-130b | 000456     | hsa-miR-499a | 002427     |
| hsa-miR-328  | 000543     | hsa-miR-133a | 002246     |
| hsa-miR-523  | 002386     |              |            |

**Tabla 4. Sondas TaqMan® específicas utilizadas para la determinación de la expresión de miRNA mediante qRT-PCR.**

Los niveles de expresión del miR-484 (miRNA utilizado como control endógeno) se midieron en todas las muestras para normalizar las diferencias en cuanto a la cantidad y calidad del RNA de partida y la eficiencia de la RT.

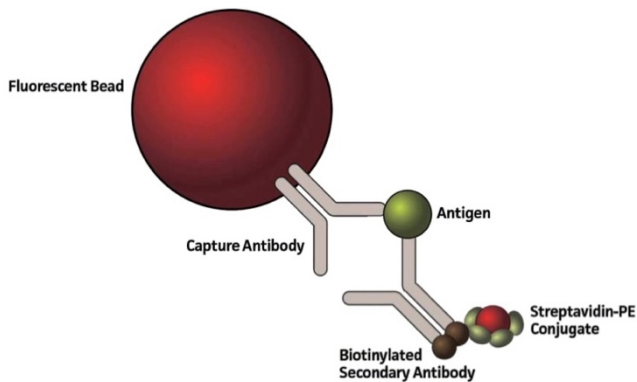
Cada muestra se analizó por duplicado y se calculó la expresión relativa de cada miRNA en las muestras SCASEST respecto de las

muestras control según el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  mediante el software SDS 2.1. Los resultados se expresaron como media geométrica con IC 95%.

### 3.1.6 INMUNOENSAYO MULTIPLEX DE CITOQUINAS

La cuantificación de citoquinas se llevó a cabo en muestras de suero (25  $\mu$ l sin diluir) de los pacientes control y SCASEST mediante un inmunoensayo multiplex. El kit Milliplex<sup>®</sup> MAP (Merck, Darmstadt, Alemania) utilizado se basa en la plataforma Luminex<sup>®</sup> xMAP<sup>®</sup>, capaz de llevar a cabo inmunoensayos sobre la superficie de microesferas magnéticas codificadas mediante fluorescencia (MagPlex<sup>®</sup>) (Figura 7). Mediante una combinación de concentraciones precisas de dos sondas fluorescentes, las microesferas se identifican individualmente mediante un código de colores y son recubiertas con anticuerpos de captura específicos. Combinando diferentes series de microesferas en un único pocillo, esta tecnología permite medir simultáneamente hasta 80 analitos por muestra en placas de 96 pocillos.

Tras la captura de la proteína diana procedente de la muestra de suero por la microesfera, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. La mezcla de reacción es posteriormente incubada con un complejo Streptavidina-ficoeritrina (PE), la molécula emisora de señal, completando así la reacción sobre la superficie de cada microesfera (Figura 7).



**Figura 7. Inmunoensayo sobre la superficie de microesferas magnéticas codificadas mediante fluorescencia.** Tras la captura de la proteína diana, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. Posteriormente, la mezcla de reacción es incubada con un complejo Streptavidina-ficoeritrina (PE). Imagen tomada de [www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com).

La detección está basada en la citometría de flujo, de manera que las microesferas atraviesan una a una un flujo de corriente continua sobre la que se hacen incidir dos tipos de láser. Uno de ellos (láser rojo, 635 nm) es utilizado para excitar la sonda fluorescente para la identificación de la microesfera, mientras que el otro (láser verde, 525 nm) se utiliza para excitar y cuantificar la sonda de la molécula emisora de señal. El sistema mide así la intensidad de fluorescencia y la empareja con la señal identificativa de la microesfera, cuantificando e identificando el analito.

Se cuantificaron las concentraciones de 10 citoquinas: IL-13 (Interleuquina 13), MIP-1 $\alpha$  (del inglés, *Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha*), MCP-3 (del inglés, *Monocyte Chemoattractant Protein 3*), IL-10 (Interleuquina 10), IL-8, IL-6, MDC (del inglés, *Macrophage-Derived Chemokine*), TNF- $\alpha$ , VEGF-A, IL-1 $\beta$  mediante el kit Milliplex<sup>®</sup> MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (HCYTOMAG-60K-10, Merck) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. En

el inmunoensayo se incluye una curva de calibración con una serie de estándares preparados mediante diluciones seriadas. De esta forma, se realiza un gráfico representando la intensidad media de fluorescencia frente a las concentraciones de estándares. Las concentraciones de los diferentes analitos estudiados en las muestras de suero se analizaron mediante interpolación de los datos de intensidad media de fluorescencia en la curva patrón.

La lectura de las placas se llevó a cabo en el analizador Luminex X100 (Luminex, Texas, Estados Unidos) del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS) de Barcelona. El análisis de las determinaciones (pg/ml) se realizó mediante el software xPONENT 3.1 (Merck).



### **3.2. ESTUDIO EN CÉLULAS ENDOTELIALES**

#### **3.2.1. CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANA**

Los cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron a partir de cordones umbilicales de mujeres sanas del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, con el consentimiento informado de las donantes.

Tras el parto, los cordones umbilicales se mantuvieron en una solución de tampón fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 4°C hasta su posterior procesado. La vena umbilical se canuló con una llave de paso unidireccional (VYGON, Ecoen, Francia) y se lavó con PBS para eliminar la sangre residual. Las células endoteliales fueron desprendidas mediante la incubación con 0.1 mg/ml de colagenasa (Gibco, Thermo Fisher Scientific) durante 15 min a 37°C. Se recuperaron con un lavado con medio M199 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) enriquecido con suero bovino fetal (SBF) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) al 20%. Tras un paso de centrifugación a 1200 rpm durante 5 min, se resuspendió el pellet correspondiente a las HUVEC aisladas y se cultivaron en medio específico para células endoteliales (Endothelial Cell Growth Medium, Cell Applications, Inc. California, Estados Unidos) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

La morfología adoquinada se determinó mediante microscopía óptica y el fenotipo endotelial mediante la expresión del factor von Willebrand (Abcam, Cambridge, Reino Unido) por inmunofluorescencia. Para la realización de los experimentos de funcionalismo celular se utilizaron cultivos del pase 3 y 4.

### 3.2.2. TRANSFECCIÓN CELULAR

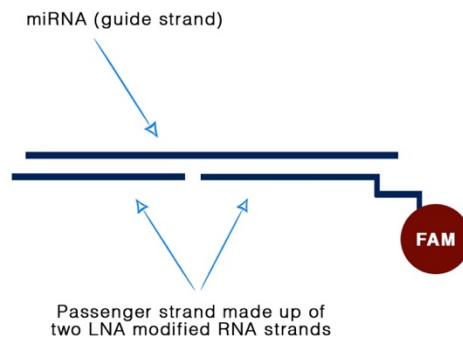
Para llevar a cabo los experimentos de transfección celular, se realizó previamente una optimización de la transfección. Se evaluaron diferentes concentraciones del agente de transfección DharmaFECT 4 Transfection Reagent (2  $\mu\text{g/ml}$  y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Dharmacon, Colorado, Estados Unidos) y diferentes tiempos de transfección (4, 6, 18 y 24 h). Asimismo, se realizaron curvas de concentraciones de los inhibidores (10 nM – 60 nM) y de los mimicos (0.05 nM – 50 nM). Las diferentes concentraciones y tiempos evaluados fueron seleccionados siguiendo las recomendaciones del fabricante según el tipo celular y el rango de concentraciones para evitar toxicidad.

Las células fueron transfectadas con inhibidores miRCURY<sup>®</sup> LNA<sup>®</sup> miRNA Inhibitors (Qiagen, Hilden, Alemania) y mimicos miRCURY<sup>®</sup> LNA<sup>®</sup> miRNA Mimics (Qiagen) para los miRNA: hsa-let-7e-5p, hsa-miR-125a-5p y hsa-miR-99b-5p. Se realizaron transfecciones de cada inhibidor por separado, así como una combinación de los tres. El mismo procedimiento se llevó a cabo en el caso de los mimicos.

Tanto los inhibidores como los mimicos utilizados comparten un mismo diseño basado en 3 cadenas de RNA (Figura 8). Una actúa como guía y contiene la misma secuencia que el miRNA de interés (en el caso de los mimicos) o complementaria (en el caso de los inhibidores) y dos cadenas de RNA actúan como hebras pasajeras. Únicamente la hebra guía es incorporada por RISC, mientras que las hebras pasajeras son demasiado cortas para actuar como miRNA y son rápidamente degradadas tras desprenderse de la hebra guía. Están diseñados para estimular la maduración natural de los miRNA endógenos, de manera que con su introducción en la célula se incrementa la producción de complejos RISC conteniendo el miRNA de interés, lo que permite estudiar sus funciones. En todos los casos,

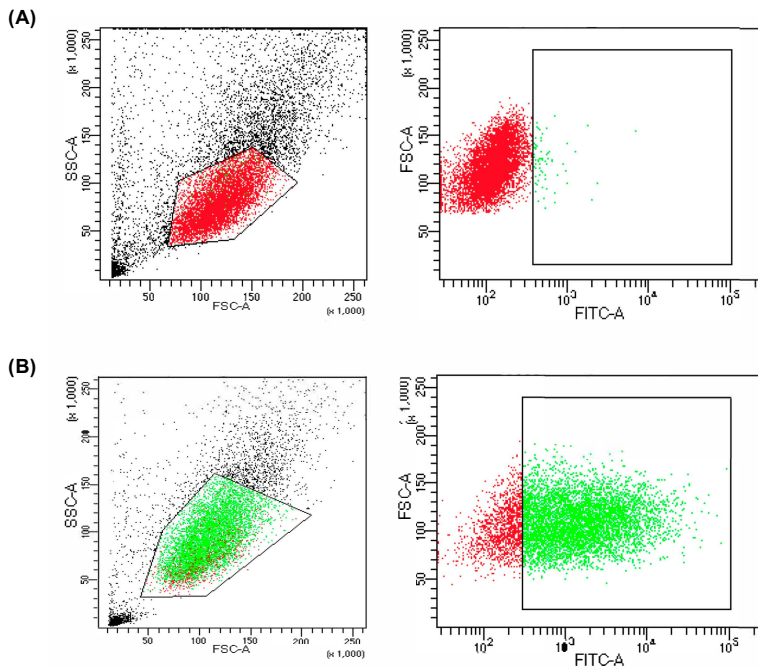
## Material y métodos

los oligonucleótidos utilizados estaban conjugados en su extremo 5' de la hebra pasajera con el fluorocromo FAM.



**Figura 8. Diseño de los inhibidores y mimicos de miRNA.** El diseño se basa en tres cadenas. Una cadena actúa como guía y contiene la misma secuencia o complementaria que el miRNA de interés en el caso de los mimicos e inhibidores, respectivamente. Las otras dos cadenas de RNA actúan como hebras pasajeras, marcadas con el fluorocromo FAM en su extremo 5'. Las hebras pasajeras son rápidamente degradadas, mientras que la hebra guía es incorporada por RISC. Imagen editada de [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

La eficiencia de transfección se evaluó por citometría de flujo mediante el citómetro BD LSRFortessa X-20 (Becton Dickinson) en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM), seleccionando aquellos tiempos y concentraciones a los que se obtenía una eficiencia de transfección superior al 80% sin afectar a la viabilidad celular (Figura 9).



**Figura 9. Imágenes representativas de la evaluación de la eficiencia de transfección mediante citometría de flujo.** Se utilizaron miRNA inhibidores y mimicos marcados con el fluoróforo 6-FAM, de forma que se evaluó la eficiencia de transfección mediante el citómetro BD LSRFortessa X-20. **(A)** Gráficos de citometría de flujo representativos de HUVEC sin transfectar (Imagen izquierda: población celular seleccionada, descartando restos celulares y agregados celulares; Imagen derecha: células transfectadas = 1%). **(B)** Gráficos de citometría de flujo representativos de HUVEC transfectadas (Imagen izquierda: población celular seleccionada, descartando restos celulares y agregados celulares; Imagen derecha: células transfectadas = 80%).

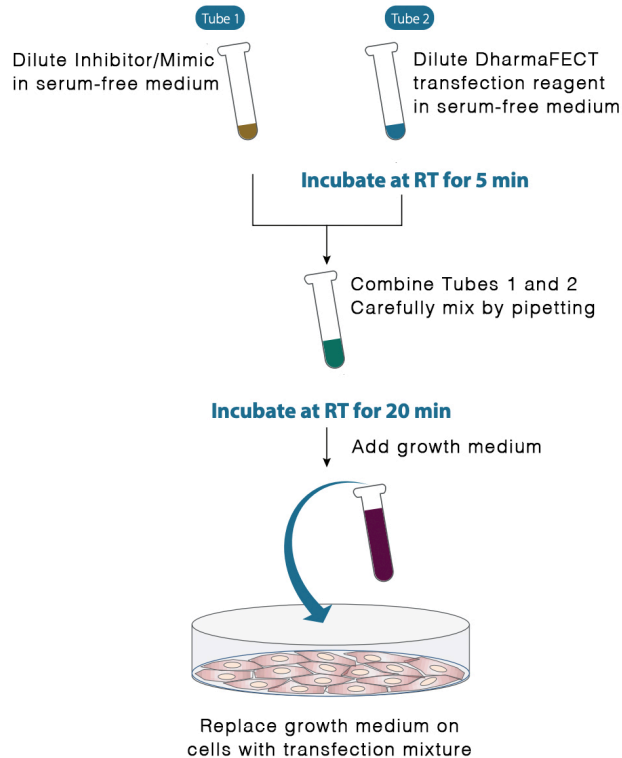
Tras los experimentos preliminares de optimización de la transfección, el resto de transfecciones se realizaron durante 18 h en medio específico endotelial sin antibióticos (Cell Applications). Se utilizó DharmaFECT 4 como agente de transfección a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Las HUVEC se transfectaron por separado con una concentración de cada inhibidor de 20 nM, así como una combinación de los 3 inhibidores. Asimismo, las HUVEC fueron

## Material y métodos

transfectadas con 30 nM de cada mímico por separado, así como una combinación de los 3. Las muestras control fueron transfectadas con concentraciones equivalentes de miRNA control negativo para los inhibidores (Negative control A) (Qiagen), así como para los mímicos (Negative Control miRCURY LNA miRNA Mimic, Qiagen).

Se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos (VWR, Pensilvania, EEUU) pretratadas con fibronectina (Becton Dickinson) para llevar a cabo los experimentos de transfección con una confluencia celular del 50-60%.

Se prepararon dos tubos eppendorf DNA/RNA Lobind por cada tratamiento a realizar (Figura 10). En uno de ellos, se combinó el inhibidor o mímico de interés con medio libre de suero OptiMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) para alcanzar las concentraciones finales de interés. En el otro tubo se combinó el agente de transfección DharmaFECT 4 con medio OptiMEM para alcanzar una concentración final de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añadió la cantidad necesaria de medio de cultivo endotelial sin antibióticos para alcanzar un volumen final de 2 ml en cada pocillo. Se reemplazó el medio de cultivo de cada pocillo por el medio de transfección y se incubó durante 18 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 96% de humedad relativa. Transcurrido ese tiempo, el medio de transfección se reemplazó por medio de cultivo endotelial para reducir citotoxicidad y se continuó su incubación durante 24 h adicionales para llevar a cabo el estudio de la función endotelial.



**Figura 10. Transfección celular.** Se prepararon dos tubos eppendorf por cada tratamiento a realizar. En uno de ellos se combinó el inhibidor o mímico de interés con medio libre de suero para alcanzar las concentraciones finales de interés. En el otro tubo se combinó el agente de transfección con medio libre de suero para alcanzar una concentración final de 2  $\mu\text{g/ml}$ . Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió la cantidad necesaria de medio de cultivo sin antibióticos y se reemplazó el medio de cultivo de cada pocillo por el medio de transfección. Imagen editada de [www.dharmacon.horizondiscovery.com](http://www.dharmacon.horizondiscovery.com).

### **3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR**

Tras los experimentos de transfección celular, la viabilidad se evaluó mediante el ensayo del 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich). Se basa en la reducción del MTT soluble de color amarillo en formazán insoluble de color morado. Esta reducción se realiza en el interior de la célula por el enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. A continuación, el formazán se solubiliza con dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) y su concentración se determina mediante densidad óptica.

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos (VWR), pretratadas con fibronectina para llevar a cabo los experimentos de viabilidad celular con una confluencia del 90-100%. Tras 24 h de incubación, se llevó a cabo la transfección celular durante 18 h.

Finalizado ese tiempo, se realizaron dos lavados con PBS y se añadieron 100  $\mu$ l de medio de cultivo con el MTT incorporado (5 mg/ml). Se incubó la placa durante 3 h a 37°C. Finalizada la incubación, se vació el medio de los pocillos y se añadieron 100  $\mu$ l de DMSO para solubilizar el formazán precipitado. Tras 10 min a temperatura ambiente, se procedió a determinar la densidad óptica a 570 nm. En cada experimento se incluyeron pocillos sin células siendo procesados como los restantes, de manera que la absorbancia del DMSO se utilizó como blanco.

### **3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL**

La función de las células endoteliales se analizó mediante la determinación de las capacidades de adhesión, proliferación y vasculogénesis.

#### **3.2.4.1. ADHESIÓN CELULAR**

Los experimentos de adhesión se realizaron en placas de Petri con un área de cultivo de 8.8 cm<sup>2</sup> y rejilla de 2 mm<sup>2</sup> (Nunc, Thermo Fisher Scientific) pretratadas con fibronectina (2.5 µg/cm<sup>2</sup>) durante 1 h a temperatura ambiente. Se sembraron 5 x 10<sup>4</sup> células/placa y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad relativa durante 30 min en medio endotelial.

Tras el periodo de incubación se eliminaron aquellas células no adheridas mediante un lavado con PBS y se contaron 10 cuadrículas elegidas aleatoriamente por placa, calculando la media de células adheridas por placa. Los resultados se muestran como porcentaje de células adheridas en relación al número total de células sembradas.

#### **3.2.4.2. PROLIFERACIÓN CELULAR**

La proliferación celular se determinó por citometría de flujo mediante el uso de yoduro de propidio (IP). El IP es un fluorocromo que se intercala en el DNA, de manera que la cantidad de IP unida es proporcional a la cantidad de DNA. Esto permite conocer la distribución de la población celular en las diferentes fases del ciclo celular.

Los análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo se representan como histogramas de intensidad de fluorescencia. De esta manera, en función de la intensidad de fluorescencia del IP, se pueden

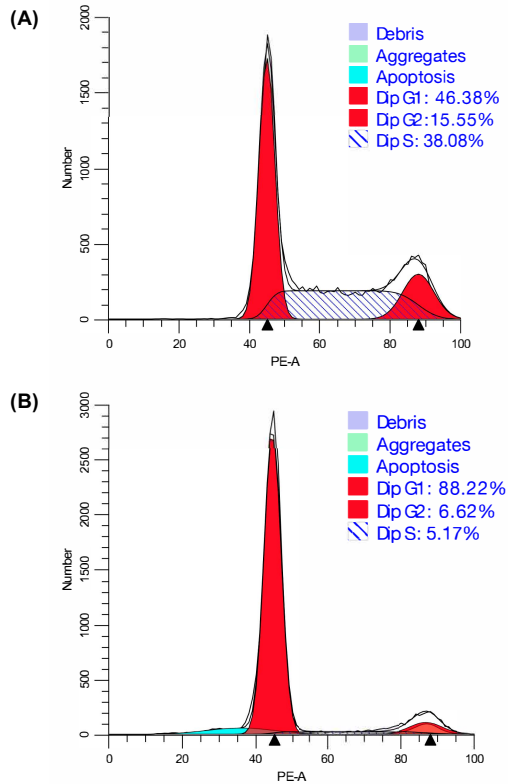


## Material y métodos

distinguir 3 poblaciones o regiones diferenciadas: células en fase G2/M del ciclo celular que tienen doble contenido de DNA que aquellas en las fases G0/G1, y una región correspondiente a las células en fase S.

Los experimentos de proliferación celular, se realizaron en placas de 6 pocillos con un área de cultivo de 9.6 cm<sup>2</sup> (VWR) pretratadas con fibronectina. Se sembraron 1.5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad relativa. Tras 8 h de cultivo, se llevó a cabo la transfección celular durante 18 h. Finalizado ese tiempo, los cultivos se sincronizaron manteniéndolos en medio de ayuno sin SBF (Endothelial Cell Growth Medium without SBF, Cell Applications) durante 24 h, tiempo fijado previamente tras evaluar el periodo adecuado de ayuno para conseguir alrededor de un 80% del cultivo en fase G0/G1, es decir, fuera del ciclo celular (Figura 11). A continuación, los cultivos se estimularon durante 18 h con medio de cultivo endotelial.

Las células se recogieron después del tratamiento con una solución de tripsina al 0.05% (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se llevó a cabo su recuento mediante la cámara de Neubauer. El mismo número de células (1 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) fueron fijadas con 200 µl de etanol al 70% durante 1 h a -20°C. Tras su centrifugación y eliminación del sobrenadante, se tiñeron con el kit comercial PI-RNase (Immunostep, Salamanca, España) mediante una incubación con el mismo volumen de tampón de ciclo 18 h a 4°C.



**Figura 11. Imágenes representativas del análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo.** Las células fueron teñidas con yoduro de propidio (IP) y el ciclo celular se examinó por citometría de flujo con el citómetro FACSVerse (Becton Dickinson). **(A)** Células sometidas a un periodo de ayuno de 12 h (46% del cultivo en fase G0/G1) **(B)** Células sometidas a un periodo de ayuno de 24 h (88% del cultivo en fase G0/G1).

Una vez teñidas, el ciclo celular se examinó por citometría de flujo con el citómetro FACSVerse (Becton Dickinson) en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) y los resultados fueron analizados con el software ModFit LT (Verity Software House, Maine, Estados Unidos). Los resultados se presentaron como porcentaje de células en proliferación (células en fase G2+S).

### 3.2.4.3. VASCULOGÉNESIS

La capacidad vasculogénica de las células endoteliales se determinó mediante un ensayo *in vitro* de Matrigel® (Becton Dickinson). En primer lugar, se sembraron  $1.5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos pretratadas con fibronectina y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 96% de humedad relativa. A las 24 h de cultivo, se llevó a cabo la transfección celular durante 18 h. Finalizado este tiempo, se realizó un cambio de medio para eliminar el medio de transfección y reducir la toxicidad, incubándose durante 24 h adicionales.

Para llevar a cabo los experimentos de vasculogénesis, se recubrieron placas de cultivo de 96 pocillos con una matriz de Matrigel®. Para ello, el Matrigel® se diluyó a razón de 1:1 con medio de cultivo endotelial libre de SBF. Se añadieron 56 µl/pocillo de esta preparación manteniendo todo el material a 4°C, temperatura a la cual el Matrigel® se encuentra en estado líquido, para posteriormente dejar gelificar a 37°C durante 1 h. A continuación, se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se incubaron durante 6 h.

Se adquirieron imágenes de un campo por pocillo con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti con el objetivo 4X (magnificación total 40X) y con la cámara digital Nikon Ds-QiMic (Nikon, Tokio, Japón). Las estructuras tubulares formadas sobre el Matrigel se analizaron con el programa ImageJ 1.49d (NIH, Maryland, Estados Unidos). Los resultados se muestran como media del número de redes por imagen.

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas se expresaron como proporciones y su comparación se llevó a cabo mediante la prueba de  $\chi^2$ . Las variables continuas se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) o la mediana  $\pm$  el rango intercuartílico (IQR), en función de si su distribución se ajustaba a la distribución normal o no. Los resultados de expresión génica se expresaron como la media geométrica con IC 95%. La comparación de medias en más de dos grupos se realizó mediante el test de análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias entre grupos, se realizó el test de comparaciones múltiples utilizando el ajuste de Bonferroni. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se aplicó el test no paramétrico de Mann Withney para la comparación de dos poblaciones. Para comparaciones múltiples se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. La comparación de datos emparejados se realizó mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. La comparación de medias entre dos variables independientes y su interacción se llevó a cabo mediante ANOVA factorial con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Diferencias en los coeficientes de variación entre grupos se compararon mediante el test de Levene. La medida de la asociación entre dos variables cuantitativas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0.05$ . Los resultados mostrados se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos).



## **4. RESULTADOS**



#### 4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio se compuso de 75 pacientes con SCASEST del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona, y 51 muestras de voluntarios sanos obtenidas del Biobanco para la Investigación Biomédica y en Salud Pública de la Comunidad Valenciana y del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona.

La Tabla 5 recoge las características basales de los grupos de estudio. La media de edad del grupo SCASEST fue de  $67.0 \pm 1.3$  años y estaba compuesto por un 75% de hombres. El factor de riesgo modificable más común entre los pacientes con SCASEST fue hipertensión (79%), seguido por hipercolesterolemia (57%), diabetes (40%), tabaquismo (37%) y obesidad (21%). Se utilizó como criterio para definir la obesidad un índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30$ , establecido según la OMS.

|   | Control<br>(n= 51) | SCASEST<br>(n= 75) | p-valor |
|---|--------------------|--------------------|---------|
| <b>Edad, media <math>\pm</math> SEM</b> | 58.3 $\pm$ 1.4     | 67.0 $\pm$ 1.3     | <0.001  |
| <b>Sexo, n (%)</b>                      |                    |                    |         |
| Hombres                                 | 30 (59)            | 56 (75)            | 0.061   |
| Mujeres                                 | 21 (41)            | 19 (25)            |         |
| <b>IMC, media <math>\pm</math> SEM</b>  | 27.4 $\pm$ 0.5     | 28.0 $\pm$ 0.6     | 0.586   |
| <b>Diabetes, n (%)</b>                  | 2 (4)              | 30 (40)            | <0.001  |
| <b>Hipertensión, n (%)</b>              | 15 (29)            | 59 (79)            | <0.001  |
| <b>Hipercolesterolemia, n (%)</b>       | 10 (20)            | 43 (57)            | <0.001  |
| <b>Tabaquismo, n (%)</b>                | 18 (35)            | 28 (37)            | 0.816   |

**Tabla 5. Características basales de los grupos de estudio.** Los datos se muestran como número de sujetos en cada grupo (n), porcentaje (%) o media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La comparación de variables continuas se realizó mediante el test de Mann-Whitney, mientras que para las variables categóricas se utilizó la prueba  $\chi^2$ .



## Resultados

Solo a un 5% de los pacientes con SCASEST no se le identificó ningún factor de riesgo en el momento de la hospitalización, el 77% presentaba una agrupación de 1 a 3 factores de riesgo cardiovascular (1 factor de riesgo: 19%; 2 factores de riesgo: 35%; 3 factores de riesgo: 23%), mientras que un 19% presentaba entre 4 y 5 factores de riesgo. En nuestro grupo de estudio, la media en la edad a la que las mujeres presentaron su primer SCA ( $68.3 \pm 3.3$ ) fue 3 años más tarde que en la de los hombres ( $65.2 \pm 1.7$ ), no observándose diferencias significativas ( $p=0.324$ ).

Las características clínicas de los pacientes SCASEST en el momento de su inclusión en el estudio se muestran en la Tabla 6. La lesión coronaria más frecuente tuvo lugar en la arteria descendente anterior (68%), seguida por la coronaria derecha (49%) y la circunfleja (41%), mientras que la lesión menos frecuente tuvo lugar en el tronco coronario izquierdo (5%). Como observación, algunos pacientes presentaron varias lesiones coronarias, detectándose más frecuentemente en la arteria descendente anterior. En cuanto al tratamiento médico previo a la inclusión, predominaron los bloqueantes del sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA), las estatinas y los bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos.

El grupo control se compuso de voluntarios sanos que tenían una media de edad de  $58.3 \pm 1.4$  años. En el IMC no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y SCASEST aunque sí existía diferencia en la edad. Aunque algunos de estos sujetos sanos presentaron factores de riesgo cardiovascular, en todos los casos las diferencias fueron significativas ( $p<0.001$ ) con respecto al grupo de SCASEST. El 68% de los sujetos control presentaron ningún o un factor de riesgo cardiovascular modificable (0 factores de riesgo: 33%; 1 factor de riesgo: 35%), un 22 % presentaba 2 factores de riesgo y

únicamente el 10% presentaba 3. Ningún sujeto control padecía 4 o más factores de riesgo.

| SCASEST<br>(n= 75)  |                     |
|---|---------------------|
| <b>SCA previo, n (%)</b>                                      | 17 (23)             |
| <b>ICP previa, n (%)</b>                                      | 19 (25)             |
| <b>Tipo de lesión coronaria, n (%)</b>                        |                     |
| TCI   | 4 (5)               |
| DA  | 51 (68)             |
| Cx  | 31 (41)             |
| CD  | 37 (49)             |
| <b>Creatinina (mg/dl), mediana [IQR]</b>                      | 0.92 [0.79 – 1.11]  |
| <b>Hemoglobina (g/dl), mediana [IQR]</b>                      | 13.4 [11.9 – 14.4]  |
| <b>Recuento plaquetario, mediana [IQR]</b>                    | 216 [172 – 264]     |
| <b>Troponina (ng/ml), mediana [IQR]</b>                       | 71.6 [36.6 - 117.4] |
| <b>Tratamiento médico crónico antes de la admisión, n (%)</b> |                     |
| Bloqueantes del SRAA  | 47 (63)             |
| Bloqueantes $\beta$ -adrenérgicos                             | 33 (44)             |
| Estatinas   | 39 (52)             |
| Antagonistas del calcio                                       | 11 (15)             |
| Diuréticos  | 28 (37)             |
| Anticoagulantes   | 6 (8)               |
| Hipoglucemiantes  | 20 (27)             |
| Insulina  | 11 (15)             |

**Tabla 6. Características clínicas de los pacientes SCASEST en el momento de su inclusión.** Los datos se muestran como número de sujetos en cada grupo (n), porcentaje (%) o mediana [Índice intercuartílico, IQR]. SCA: Síndrome coronario agudo; ICP: Intervención coronaria percutánea; TCI: Tronco coronario izquierdo; DA: Descendente anterior; Cx: Circunfleja; CD: Coronaria derecha; SRAA: Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona.

## **4.2. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO Y PLASMA DE PACIENTES CON SCASEST Y CONTROLES SANOS**

El suero y el plasma son los tipos de muestra utilizados con mayor frecuencia en los estudios de miRNA circulantes. Estudios previos sugieren que ambos tipos de muestra exhiben algunas diferencias en su contenido de miRNA, mientras que otros, por el contrario, no han detectado diferencias en la cuantificación de miRNA extracelulares al comparar muestras de suero y plasma (D'Alessandra et al., 2010, Wang et al., 2012). Estas observaciones ponen de manifiesto la necesidad de conocer las posibles diferencias en los niveles de miRNA circulantes entre diferentes tipos de muestra. Con la finalidad de determinar si el tipo de muestra de partida es una fuente de variación en el análisis del perfil de miRNA circulantes en el SCA, realizamos un análisis comparativo de la expresión de miRNA en suero y plasma de pacientes con SCASEST y controles sanos.

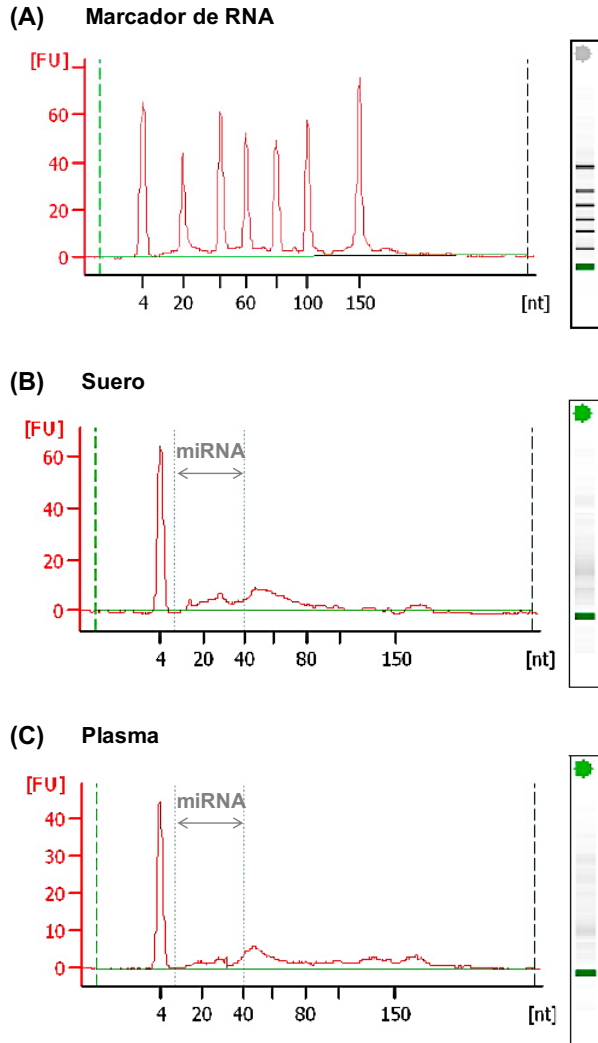
### **4.2.1. CONCENTRACIÓN DE miRNA**

En primer lugar, determinamos las posibles diferencias en la concentración de miRNA en suero y plasma que pudiesen contribuir a diferentes patrones de expresión de miRNA. Para ello, analizamos el porcentaje de miRNA en una población total de RNA de pequeño tamaño (<150 nt) aislado en muestras de suero y plasma utilizando el bioanalizador de RNA (Figura 12), y llevamos a cabo su cuantificación mediante fluorimetría (Figura 13). El porcentaje de miRNA en muestras de suero (n= 20) y plasma (n=20) de sujetos control y pacientes con SCASEST se calculó como cantidad absoluta (pg) y se expresó como porcentaje de la cantidad de RNA de pequeño tamaño, sin observar

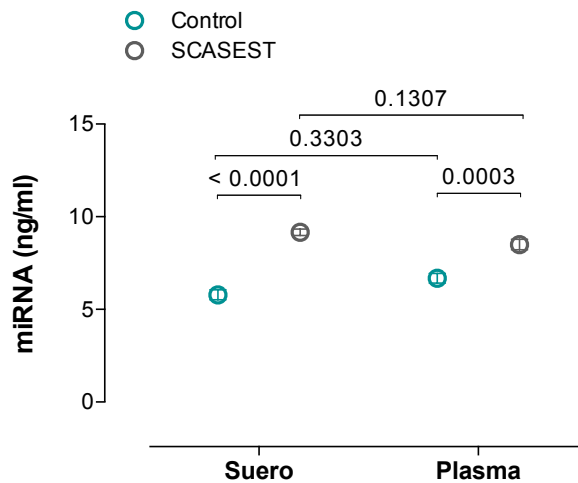
diferencias significativas cuando se compararon las medias y varianzas de la fracción de miRNA entre suero y plasma (Media  $\pm$  SEM Suero: 33.7%  $\pm$  3.6; Plasma: 32.2%  $\pm$  1.9,  $p=0.55$ ).

Mediante el análisis fluorimétrico de la concentración de miRNA, también se demostró que las muestras de suero y plasma presentaban concentraciones similares de miRNA. Sin embargo, en las muestras procedentes de pacientes con SCASEST se observaron concentraciones de miRNA circulantes significativamente más elevadas (en el mismo volumen de suero y plasma) que en las muestras control (Figura 13). Diferencias en los coeficientes de variación (CV) entre grupos (control suero vs. control plasma vs. SCASEST suero vs. SCASEST plasma) se compararon mediante el test de Levene (F: 8.487;  $p<0.0001$ ), indicando diferencias en la variabilidad de la concentración de miRNA entre tipos de muestra (suero o plasma) y condición (control o SCASEST).

## Resultados



**Figura 12. Imágenes representativas de la cantidad de miRNA en una población total de RNA de pequeño tamaño aislado en muestras de suero y plasma. (A)** Electroferograma del marcador de RNA correspondiente al chip de RNA de pequeño tamaño (< 150 nt) mediante el bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer. **(B)** Electroferograma de RNA circulantes de pequeño tamaño en muestras de suero y **(C)** plasma. Resultados de una electroforesis capilar (1  $\mu$ l/muestra) con la utilización de una sonda fluorescente de unión a ácidos nucleicos. En los gráficos se representa el tamaño del RNA en nucleótidos (nt) frente a la intensidad de fluorescencia (FU). Dentro de la región de RNA de pequeño tamaño (0 - 150 nt), se define la región correspondiente a miRNA (15 - 40 nt).



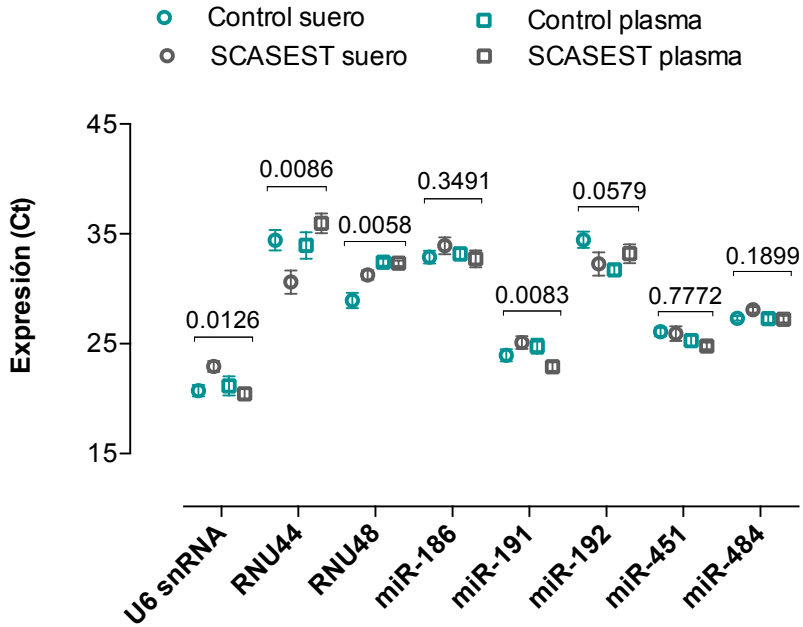
**Figura 13. Concentración de miRNA en muestras de suero y plasma.** Concentraciones de miRNA (ng/ml) en muestras de suero (n= 61) y plasma (n= 61) procedentes de pacientes con SCASEST y muestras de suero (n= 20) y plasma (n= 20) de sujetos control, determinadas mediante fluorimetría. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. La comparación de medias entre las dos variables independientes (tipo de muestra y SCASEST) se llevó a cabo mediante ANOVA factorial con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Diferencias en los coeficientes de variación entre grupos se compararon mediante el test de Levene (F: 8.847;  $p < 0.0001$ ).

#### 4.2.2. SELECCIÓN DEL CONTROL ENDÓGENO PARA LA NORMALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE miRNA MEDIANTE qRT-PCR

Entre las dificultades metodológicas del análisis de la expresión de miRNA mediante qRT-PCR en fluidos extracelulares se encuentra la normalización de datos. En este contexto, llevamos a cabo un estudio detallado con el fin de seleccionar un control endógeno adecuado para nuestros estudios de qRT-PCR, tanto en muestras de suero como de plasma procedentes de pacientes con SCASEST y de sujetos sanos.

## Resultados

Seleccionamos como candidatos 8 miRNA en base a la lista de controles endógenos recomendados por el fabricante de los ensayos TaqMan. Para la mayoría de los candidatos a controles endógenos, los niveles de expresión (Ct) entre tipos de muestra (suero y plasma) y condiciones experimentales (control o SCASEST) mostraron diferencias significativas al examinar sus medias y/o desviaciones típicas (Figura 14). Cuatro controles endógenos (U6 snRNA, RNU44, RNU48 y miR-191) mostraron variaciones al comparar la expresión media en plasma y suero de controles y SCASEST. Otros tres controles endógenos (miR-186, miR-192 y miR-451) podrían considerarse adecuados si sólo se tuviese en cuenta la ausencia de diferencias significativas entre medias. No obstante, al comparar el coeficiente de variación de la expresión de estos miRNA entre los cuatro grupos (control suero vs. control plasma vs. SCASEST suero vs. SCASEST plasma), observamos diferencias significativas [miR-186 (CV 10.8%,  $p=0.0257$ ); miR-192 (CV 13.5%,  $p=0.0014$ ); miR-451 (CV 9.7%,  $p=0.0436$ )] según el test de Levene. Esto indicó una importante variabilidad de la expresión de estos miRNA atendiendo tanto al tipo de muestra (suero o plasma) como a la condición (control o SCASEST), lo que les hacía inadecuados para ser considerados controles endógenos. De todos los miRNA analizados, sólo el miR-484 mostró un bajo coeficiente de variación (5%) y no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos ( $p=0.2862$ ). Por lo tanto, los valores de los miRNA de este estudio fueron normalizados tomando como referencia la expresión de miR-484.



**Figura 14. Niveles de expresión (Ct) de 8 miRNA candidatos a controles endógenos en suero y plasma de pacientes con SCASEST y sujetos control.** Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM. La comparación de medias entre las variables independientes (tipo de muestra y SCASEST) se realizó mediante ANOVA factorial. Se muestran los valores de p correspondientes al análisis de esta interacción. Control suero (n= 20), plasma (n= 20); SCASEST suero (n=34), plasma (n= 34). La comparación de los coeficientes de variación entre grupos se calculó mediante el test de Levene [miR-186 (CV 10.8%, p=0.0257); miR-192 (CV 13.5%, p=0.0014); miR-451 (CV 9.7%, p=0.0436); miR-484 (CV 5%, p=0.2862)].



#### **4.2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE miRNA DESCRITOS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES DE SÍNDROME CORONARIO AGUDO EN SUERO Y PLASMA**

Para estudiar la importancia de la selección del tipo de muestra sobre el nivel de expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCA, elegimos 6 miRNA que habían sido descritos previamente como potenciales biomarcadores de SCA. La selección de miRNA se llevó a cabo según datos presentados en diferentes meta-análisis y revisiones de la bibliografía, así como en bases de datos que asocian miRNA y enfermedades (HMDD, miR2Disease) utilizando los siguientes términos de búsqueda: “Myocardial Infarction [Mesh]” OR “Coronary Artery Disease [Mesh]” OR “Acute Coronary Syndrome [Mesh]”. Los 6 miRNA elegidos fueron: miR-1, miR-133a, miR-21, miR-26a, miR-499a y miR-208b.

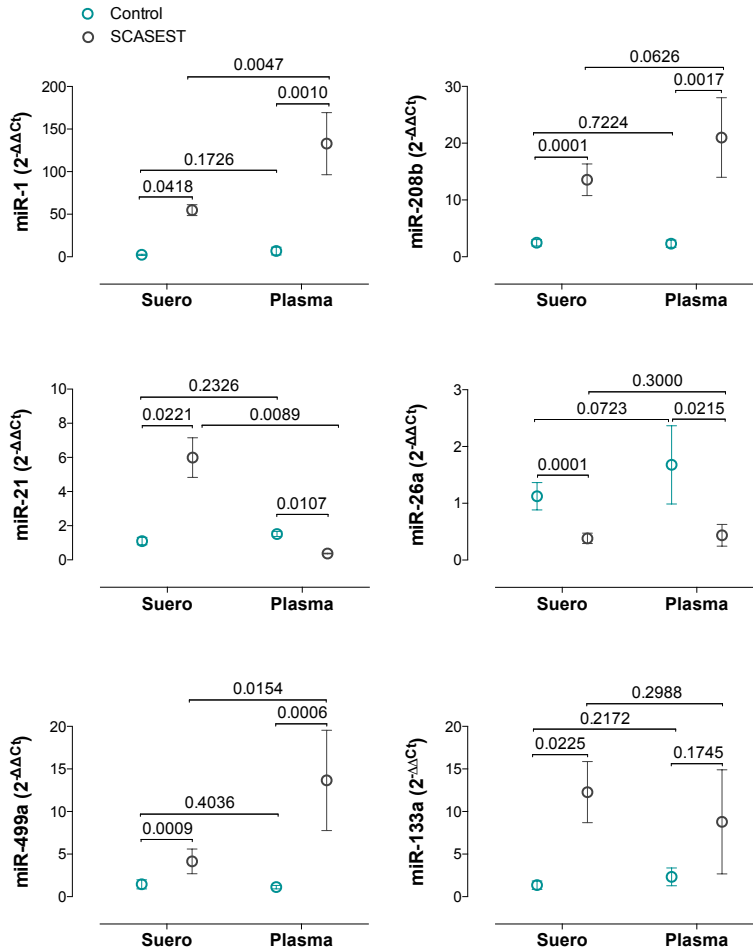
Como se observa en la Figura 15, el patrón de expresión de miRNA fue diferente en suero y plasma a pesar de que no se detectaron diferencias en ninguno de los miRNA estudiados entre ambos tipos de muestras control. Aunque la expresión de miR-1, miR-208b y miR-499a aumentó y la expresión de miR-26a disminuyó en ambas muestras del grupo SCASEST con respecto a sus controles, se observaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de variación entre los 4 grupos (control suero vs. control plasma vs. SCASEST suero vs. SCASEST plasma) (Test de Levene: miR-1,  $p=0.0003$ ; miR-208b,  $p=0.0001$ ; miR-499,  $p=0.0002$ ; miR-26a,  $p=0.0021$ ).

Para el miR-133a sólo se detectaron diferencias en su expresión en muestras de suero del grupo SCASEST y no se observaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de variación entre grupos (Test de Levene: miR-133a,  $p=0.335$ ). Curiosamente,

miR-21 mostró un patrón de expresión opuesto, estando aumentado significativamente en suero ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ : 5.7,  $p=0.0221$ ) y disminuido en plasma ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ : 0.5,  $p=0.0107$ ) de pacientes con SCASEST en comparación con sus respectivos grupos control. También se observaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de variación entre grupos (Test de Levene: miR-21,  $p=0.0268$ ; miR-133a,  $p=0.335$ ).

Atendiendo a estos resultados, el tipo de muestra más adecuado para realizar estudios de miRNA circulantes sería el suero, debido a que ofrece una mayor sensibilidad en la detección de miRNA y una menor variabilidad en la expresión. Además, proponemos el miR-484 como gen de referencia para estudios de miRNA circulantes en enfermedades cardiovasculares por mostrar una expresión similar y una menor variabilidad entre los individuos control y los pacientes con SCASEST.

## Resultados



**Figura 15. Niveles de expresión de miRNA descritos como potenciales biomarcadores para SCA.** Comparación de la expresión en muestras de suero (n= 46) y plasma (n= 46) de pacientes con SCASEST y en muestras de suero (n= 20) y plasma (n= 20) de sujetos control. Los resultados se muestran como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control suero. La comparación de medias entre las variables independientes (suero o plasma y control o SCA) se realizó mediante ANOVA factorial con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. La comparación de los coeficientes de variación entre grupos se calculó mediante el test de Levene. Se observaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de variación entre grupos, excepto para el miR-133a (miR-1,  $p=0.0003$ ; miR-208b,  $p=0.0001$ ; miR-21,  $p=0.0268$ ; miR-26a,  $p=0.0021$ ; miR-499a,  $p=0.0002$ ; miR-133a,  $p=0.335$ ).

### **4.3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO DE PACIENTES CON SCASEST EN SU MANIFESTACIÓN AGUDA Y TRAS UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA**

Diferentes estudios han investigado el potencial de los miRNA en la detección del daño cardíaco como biomarcadores de SCA, indicando que determinados perfiles de expresión de miRNA podrían ser de ayuda en la detección temprana del SCA, revisado en: (Navickas et al., 2016, Viereck et al., 2014). Dentro de los pacientes con SCA, el diagnóstico del IAMCEST es más preciso y precoz, mientras que es más elevada la incertidumbre a la hora de diagnosticar pacientes con SCASEST (IAMSEST y angina inestable) Estos pacientes se beneficiarían de un inicio rápido del tratamiento, por lo que se requieren nuevos marcadores de diagnóstico precoz del SCA, sobre todo del SCASEST.

Para estudiar si los pacientes con SCASEST muestran un patrón de expresión diferencial de miRNA circulantes, analizamos su perfil de expresión en la manifestación aguda del infarto en el momento de su ingreso hospitalario y después de un año de evolución clínica.

#### **4.3.1. PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES EN LA MANIFESTACIÓN AGUDA DEL SCASEST Y DESPUÉS DE UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA**

Atendiendo a los resultados obtenidos tras la comparación de la expresión de miRNA en suero y plasma (apartado 4.2) seleccionamos el suero como muestra de estudio para el resto de nuestro trabajo. Se utilizaron muestras de suero procedentes de voluntarios sanos (n= 8), de pacientes con SCASEST en el momento de la ICP (n= 8) y al cabo

## Resultados

de un año de evolución clínica (n= 8). Se llevó a cabo el aislamiento de tRNA y el perfil de expresión de miRNA se determinó mediante arrays TaqMan® de baja densidad, tal como se describe en el apartado Material y métodos.

Se analizaron un total de 754 miRNA por muestra, de los que 54 mostraron una expresión alterada en el grupo SCASEST en comparación con el grupo control y resultaron tener una diferencia de expresión superior a 4 (Tabla 7). De ellos, la expresión de 10 miRNA aumentó significativamente. Sin embargo, la cantidad de miRNA cuya expresión se vio disminuida con SCASEST fue mayor: Un total de 44 miRNA mostraron una disminución en su expresión en el grupo con SCASEST en comparación con el grupo control. Al comparar el perfil de expresión de los miRNA en la manifestación aguda del infarto y después de un año de evolución clínica, se observó que 42 miRNA mostraron diferencias significativas y resultaron tener una diferencia de expresión superior a 4 (Tabla 8). De ellos, 35 miRNA aumentaron su expresión, mientras que disminuyó en 7 miRNA.

Por tanto, en los miRNA desregulados de forma significativa predomina una disminución de los niveles de expresión de miRNA en el momento del infarto, que no se manifiesta al año de evolución. Estos resultados sugieren la existencia de una relación de la manifestación aguda del SCASEST con la desregulación del perfil de expresión de miRNA.

| Nombre<br>(miRBase 21) | Diferencia de<br>expresión | p-valor |
|------------------------|----------------------------|---------|
| hsa-miR-320b           | 7.08                       | 0.0076  |
| hsa-miR-874-3p         | 7.06                       | 0.0078  |
| hsa-miR-551a           | 6.50                       | 0.0143  |
| hsa-miR-130a-3p        | 6.42                       | 0.0157  |
| hsa-miR-221-5p         | 5.85                       | 0.0274  |
| hsa-miR-203a-3p        | 5.76                       | 0.0301  |
| hsa-miR-374a-3p        | 5.27                       | 0.0469  |
| hsa-miR-299-5p         | 5.23                       | 0.0490  |
| hsa-miR-141-3p         | 5.22                       | 0.0493  |
| hsa-miR-130b-3p        | 4.31                       | 0.0495  |
| hsa-miR-28-3p          | -5.05                      | 0.0497  |
| hsa-miR-765            | -5.26                      | 0.0476  |
| hsa-miR-488-3p         | -5.29                      | 0.0462  |
| hsa-miR-18b-3p         | -5.30                      | 0.0458  |
| hsa-miR-135a-5p        | -5.39                      | 0.0424  |
| hsa-miR-548c-3p        | -5.39                      | 0.0423  |
| hsa-miR-513b-5p        | -5.50                      | 0.0384  |
| hsa-miR-657            | -5.51                      | 0.0381  |
| hsa-miR-890            | -5.65                      | 0.0331  |
| hsa-miR-450b-3p        | -5.67                      | 0.0327  |
| hsa-miR-125a-5p        | -5.74                      | 0.0306  |
| hsa-miR-450b-5p        | -5.88                      | 0.0268  |
| hsa-miR-545-5p         | -5.91                      | 0.0259  |
| hsa-miR-660-5p         | -5.96                      | 0.0248  |
| hsa-miR-1292-5p        | -5.98                      | 0.0242  |
| hsa-miR-892a           | -6.03                      | 0.0232  |
| hsa-miR-149-5p         | -6.08                      | 0.0220  |
| hsa-miR-519c-3p        | -6.18                      | 0.0200  |
| hsa-miR-548l           | -6.21                      | 0.0193  |
| hsa-miR-539-5p         | -6.30                      | 0.0177  |

## Resultados

| Nombre<br>(miRBase 21) | Diferencia de<br>expresión | p-valor  |
|------------------------|----------------------------|----------|
| hsa-let-7g-5p          | -6.32                      | 0.0172   |
| hsa-miR-620            | -6.34                      | 0.0170   |
| hsa-let-7e-5p          | -6.36                      | 0.0166   |
| hsa-miR-328-3p         | -6.68                      | 0.0119   |
| hsa-miR-92a-3p         | -6.75                      | 0.0110   |
| hsa-miR-219a-5p        | -7.17                      | 0.0069   |
| hsa-miR-31-3p          | -7.24                      | 0.0064   |
| hsa-miR-520e           | -7.53                      | 0.0046   |
| hsa-miR-1825           | -7.59                      | 0.0042   |
| hsa-miR-520h           | -7.69                      | 0.0038   |
| hsa-miR-590-5p         | -8.25                      | 0.0019   |
| hsa-miR-1294           | -8.37                      | 0.0016   |
| hsa-miR-936            | -8.51                      | 0.0013   |
| hsa-miR-128-3p         | -8.52                      | 0.0013   |
| hsa-miR-199a-3p        | -8.57                      | 0.0012   |
| hsa-miR-517c-3p        | -8.70                      | 0.0010   |
| hsa-miR-770-5p         | -8.72                      | 0.0010   |
| hsa-miR-550a-5p        | -8.78                      | 0.0009   |
| hsa-miR-523-3p         | -9.98                      | 0.0002   |
| hsa-miR-26a-5p         | -10.06                     | 0.0002   |
| hsa-miR-518a-3p        | -10.65                     | < 0.0001 |
| hsa-miR-139-3p         | -11.01                     | < 0.0001 |
| hsa-miR-579-3p         | -11.98                     | < 0.0001 |
| hsa-miR-1271-5p        | -12.04                     | < 0.0001 |

**Tabla 7. Expresión diferencial de miRNA en pacientes con SCASEST en el momento del infarto.** Se enumeran los miRNA diferencialmente expresados en muestras de suero de pacientes con SCASEST en la manifestación aguda del infarto (n= 8) en comparación con el grupo control (n= 8) ordenados según su diferencia de expresión ( $p \leq 0.05$  mediante ANOVA de una vía). El nombre de los miRNA corresponde al utilizado en la base de datos miRBase 21.

| Nombre<br>(miRBase 21) | Diferencia de<br>expresión | p-valor  |
|------------------------|----------------------------|----------|
| hsa-miR-523-3p         | 10.22                      | < 0.0001 |
| hsa-miR-26a-5p         | 10.27                      | < 0.0001 |
| hsa-miR-662            | 7.06                       | 0.0041   |
| hsa-miR-516-3p         | 6.81                       | 0.0056   |
| hsa-miR-374b-3p        | 6.57                       | 0.0075   |
| hsa-miR-182-3p         | 6.55                       | 0.0077   |
| hsa-miR-515-3p         | 6.50                       | 0.0082   |
| hsa-let-7e-5p          | 6.42                       | 0.0090   |
| hsa-miR-558            | 6.32                       | 0.0101   |
| hsa-miR-19b-1-5p       | 6.29                       | 0.0105   |
| hsa-miR-591            | 6.25                       | 0.0109   |
| hsa-miR-519a-3p        | 6.24                       | 0.0111   |
| hsa-miR-593-5p         | 6.01                       | 0.0144   |
| hsa-miR-606            | 5.83                       | 0.0178   |
| hsa-miR-638            | 5.77                       | 0.0189   |
| hsa-miR-635            | 5.72                       | 0.0199   |
| hsa-miR-92a-3p         | 5.58                       | 0.0231   |
| hsa-miR-328-3p         | 5.51                       | 0.0250   |
| hsa-miR-363-5p         | 5.49                       | 0.0254   |
| hsa-miR-122-5p         | 5.43                       | 0.0271   |
| hsa-miR-34b-5p         | 5.39                       | 0.0283   |
| hsa-miR-105-3p         | 5.38                       | 0.0284   |
| hsa-miR-1262           | 5.33                       | 0.0302   |
| hsa-miR-369-5p         | 5.31                       | 0.0307   |
| hsa-miR-885-5p         | 5.28                       | 0.0317   |
| hsa-miR-20b-3p         | 5.28                       | 0.0317   |
| hsa-miR-489-3p         | 5.26                       | 0.0325   |
| hsa-miR-195-3p         | 5.18                       | 0.0350   |
| hsa-miR-216a-5p        | 5.11                       | 0.0376   |
| hsa-miR-555            | 4.99                       | 0.0423   |



## Resultados

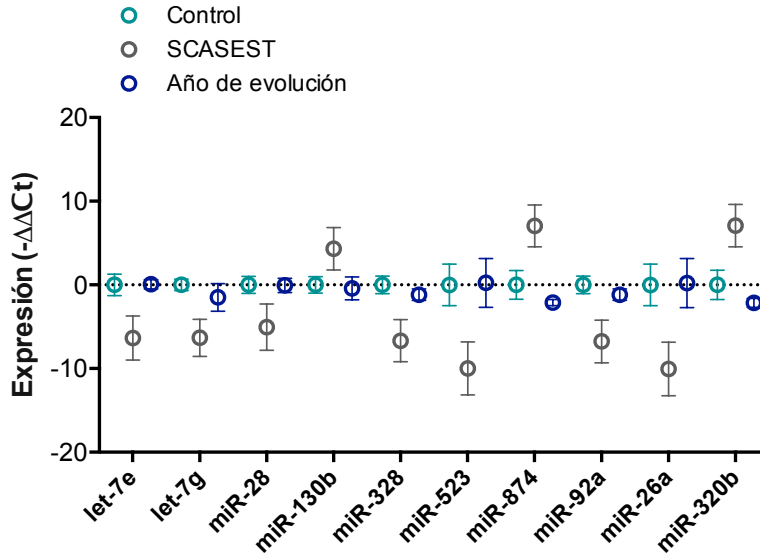
| Nombre (miRBase 21) | Diferencia de expresión | p-valor |
|---------------------|-------------------------|---------|
| hsa-miR-28-3p       | 4.98                    | 0.0425  |
| hsa-miR-505-5p      | 4.98                    | 0.0428  |
| hsa-miR-200c-3p     | 4.93                    | 0.0449  |
| hsa-miR-614         | 4.84                    | 0.0491  |
| hsa-let-7g-5p       | 4.83                    | 0.0496  |
| hsa-miR-130b        | -4.73                   | 0.0496  |
| hsa-miR-548d-3p     | -4.85                   | 0.0484  |
| hsa-miR-1236-3p     | -4.88                   | 0.0472  |
| hsa-miR-889-3p      | -4.98                   | 0.0429  |
| hsa-miR-1290        | -5.02                   | 0.0409  |
| hsa-miR-874-3p      | -9.19                   | 0.0002  |
| hsa-miR-320b        | -9.24                   | 0.0002  |

**Tabla 8. Expresión diferencial de miRNA en pacientes con SCASEST después de un año de evolución clínica.** Se enumeran los miRNA diferencialmente expresados en muestras de suero de pacientes con SCASEST extraídas después de un año de la ICP (n= 8) en comparación con las extraídas en el momento de la manifestación aguda del infarto (n= 8) ordenados según su diferencia de expresión ( $p \leq 0.05$  mediante ANOVA de una vía). El nombre de los miRNA corresponde al utilizado en la base de datos miRBase 21.

### 4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS miRNA CIRCULANTES RELACIONADOS CON LA MANIFESTACIÓN AGUDA DEL SCASEST

El siguiente objetivo fue identificar los miRNA que podrían estar relacionados con el momento agudo del infarto. Para ello, tomando como base los resultados del array, seleccionamos aquellos miRNA cuya expresión se veía modificada de forma significativa en el grupo SCASEST con respecto al grupo control y que, además, revertía después de un año de evolución clínica hasta niveles control (Figura

16). Se identificaron de esta manera 10 miRNA, de los cuales 3 estaban incrementados en el momento del infarto (miR-130b, miR-874 y miR-320b) y 7 disminuidos (let-7e, let-7g, miR-28, miR-328, miR-523, miR-92a y miR-26a).



**Figura 16. miRNA relacionados con el SCASEST.** Expresión de los miRNA desregulados en pacientes con SCASEST en su manifestación clínica aguda con respecto al control ( $p \leq 0.05$  mediante ANOVA de una vía) y cuya expresión se revierte al año de la ICP ( $p \leq 0.05$  Año de evolución vs. SCASEST;  $p \geq 0.05$  Año de evolución vs. control). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM, expresados como (- $\Delta\Delta$ Ct) calculado frente al grupo control. Control (n=8), SCASEST (n=8), SCASEST después de un año de evolución (n=8).

#### **4.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS miRNA CIRCULANTES RELACIONADOS CON EL SCASEST EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Una vez seleccionados los miRNA que podrían relacionarse con el momento agudo del infarto atendiendo al análisis del perfil de expresión mediante arrays (Figura 16, apartado 4.3.2), el siguiente paso fue comprobar su expresión en la población de estudio. Analizamos su expresión mediante qRT-PCR en todas las muestras de sujetos control y pacientes con SCASEST, así como en sus respectivas muestras obtenidas un año después de la ICP. En base a nuestros resultados del análisis comparativo de la expresión de miRNA en suero y plasma (apartado 4.2), realizamos las medidas en muestras de suero utilizando el miR-484 como control endógeno. Se excluyeron del análisis aquellas muestras con un valor de Ct del miR-484 mayor o igual a 32. Valores de Ct más elevados indicarían que la muestra se encuentra en mal estado o degradada, ya que los valores de Ct son inversamente proporcionales a la expresión del miRNA.

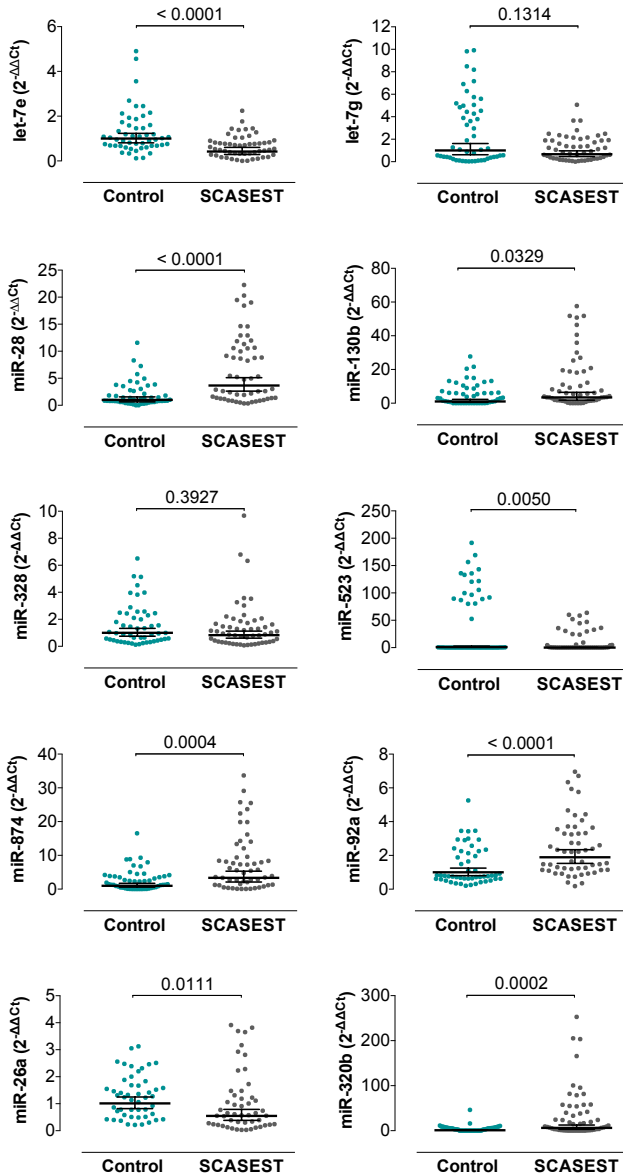
En algunas muestras, la expresión de ciertos miRNA no se detectó tras el máximo número de ciclos fijados en la PCR (en nuestro caso 45). A estos casos de “ausencia de expresión” se les asignó un valor de Ct de 45, con el fin de poder incluirlos estadísticamente en el análisis.

#### **4.4.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNA EN EL GRUPO CONTROL Y EN PACIENTES CON SCASEST**

En primer lugar, llevamos a cabo el análisis comparativo por qRT-PCR de la expresión de los miRNA seleccionados entre el grupo control (n=51) y los pacientes con SCASEST (n=54). Como se observa en la Figura 17 y en la Tabla 9, 6 de los 10 miRNA analizados mostraron unos cambios de expresión similares a los observados en los resultados obtenidos mediante arrays: let-7e, miR-130b, miR-523, miR-874, miR-26a y miR-320b. Sin embargo, la expresión de let-7g y miR-328 no varió y la de miR-28 y miR-92a aumentó significativamente, revelando en este caso un patrón de expresión opuesto con respecto a los resultados de los arrays.

A pesar de los resultados obtenidos en los arrays, la expresión de miR-523 fue indetectable mediante qRT-PCR en los 3 grupos de individuos estudiados, por lo que fue necesario realizar una amplificación previa. Aunque los niveles de expresión de miR-523 disminuyeron significativamente en pacientes con SCASEST, en gran parte de las muestras de individuos control y pacientes con SCASEST su expresión continuó siendo indetectable tras la reacción de preamplificación (Figura 17, Tabla 9).

## Resultados



**Figura 17. Expresión de los miRNA relacionados con SCASEST comparando individuos control y pacientes con SCASEST en su manifestación aguda.** Los resultados se muestran como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Control (n=51), SCASEST (n=54).

|  | Control<br>(n= 51)                   | SCASEST<br>(n= 54)                      | p-valor |
|--|--------------------------------------|---|---------|
| <b>let-7e (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 1.00 [0.81-1.23]<br>1.02 [0.68-1.60] | 0.42 [0.29-0.61]<br>0.58 [0.29-0.88]    | <0.0001 |
| <b>let-7g (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 1.00 [0.62-1.62]<br>1.09 [0.36-4.84] | 0.67 [0.46-0.97]<br>0.93 [0.29-1.91]    | 0.1314  |
| <b>miR-28 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 1.00 [0.64-1.56]<br>1.03 [0.61-2.80] | 3.67 [2.63-5.12]<br>4.78 [1.29-10.61]   | <0.0001 |
| <b>miR-130b (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR] | 1.00 [0.47-2.25]<br>3.06 [0.05-8.85] | 3.41 [1.80-6.49]<br>4.87 [1.65-18.87]   | 0.0329  |
| <b>miR-328 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 1.00 [0.75-1.33]<br>0.98 [0.45-2.44] | 0.83 [0.61-1.13]<br>0.98 [0.33-1.76]    | 0.3927  |
| <b>miR-523 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 1.00 [0.30-3.26]<br>0.31[0.03-95.33] | 0.16 [0.05-0.53]<br>0.07 [0.00-23.72]   | 0.0050  |
| <b>miR-874 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 1.00 [0.58-1.71]<br>1.45 [0.45-3.89] | 3.35 [2.11-5.33]<br>5.44 [1.29-10.82]   | 0.0004  |
| <b>miR-92a (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 1.00 [0.80-1.25]<br>0.79 [0.62-2.25] | 1.89 [1.53-2.34]<br>2.21 [1.15-3.44]    | <0.0001 |
| <b>miR-26a (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 1.00 [0.82-1.25]<br>1.24 [0.55-1.76] | 0.55 [0.38-0.79]<br>0.59 [0.24-1.35]    | 0.0111  |
| <b>miR-320b (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR] | 1.00 [0.48-2.05]<br>3.41 [0.05-7.04] | 6.14 [2.97-12.71]<br>10.45 [1.55-54.33] | 0.0002  |

**Tabla 9. Comparación de los niveles de expresión de miRNA relacionados con SCASEST en individuos control y en pacientes con SCASEST.** Los resultados se expresan como media con IC 95%, así como mediana [IQR] para mostrar la dispersión de los valores, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control.

#### **4.4.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES EN PACIENTES CON SCASEST Y DESPUÉS DE UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA**

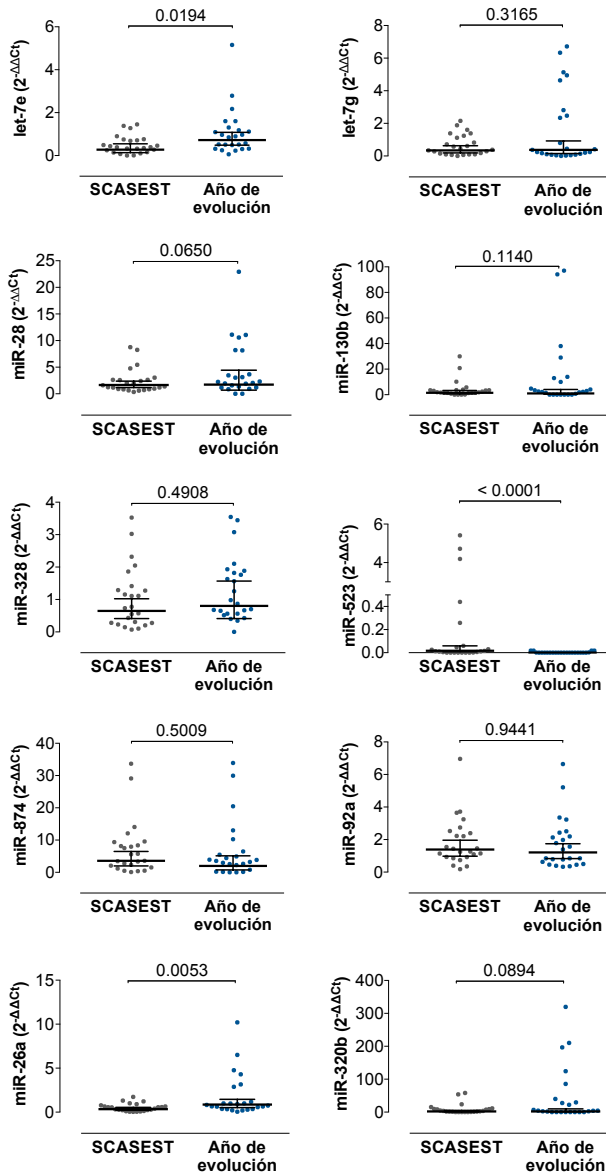
Con el fin de relacionar la implicación de los miRNA con la fase aguda del SCASEST, realizamos la comparación de los niveles de miRNA circulantes entre el grupo de pacientes con SCASEST y sus respectivas muestras al año de evolución. Debido a que se trata de muestras pareadas y por tanto corresponden al mismo paciente SCASEST en dos tiempos distintos, llevamos a cabo un análisis estadístico distinto al aplicado con los individuos control. En la Figura 18 y la Tabla 10 se representan los resultados de este análisis comparativo. El tamaño muestral para este análisis fue menor (n=24) debido al abandono del estudio por parte de algunos pacientes con SCASEST: la necesidad de que los pacientes volvieran al hospital al año de la ICP para una nueva extracción de sangre, no se consiguió en la mitad de los casos (50.6%). Además, ocurrieron 6 *exitus* durante el tiempo del estudio (8%).

En el análisis comparativo de la expresión de miRNA entre los grupos con SCASEST en fase aguda y al año de evolución (Figura 18, Tabla 10), se observaron diferencias significativas únicamente en 3 de los 10 miRNA analizados: let-7e, miR-26a y miR-523. En los dos primeros casos, se observa un aumento de los niveles de expresión al año de seguimiento con respecto al momento del infarto. Además, la disminución tanto de los niveles de let-7e como de miR-26a en el momento del infarto que se observó en el análisis comparativo entre el grupo control y pacientes con SCASEST (Figura 17, Tabla 9), revierte hasta niveles control al año de la ICP (Figura 19), no observándose diferencias significativas entre el grupo control y al año de seguimiento. Por el contrario, la expresión de miR-523 al año de evolución no

revierte hasta valores control sino que, por el contrario, muestra una mayor disminución con respecto a la observada en el grupo de pacientes con SCASEST. Cabe señalar nuevamente que debido a los bajos niveles de expresión del miR-523 por qRT-PCR fue necesario realizar una preamplificación. Como se observa en la Figura 18 y Tabla 10, existen diferencias mínimas, aunque significativas, en las muestras correspondientes al análisis pareado entre el grupo con SCASEST y al año de evolución. Sin embargo, los niveles de expresión continuaron siendo prácticamente indetectables incluso tras la reacción de preamplificación, con excepción de 5 muestras.



## Resultados

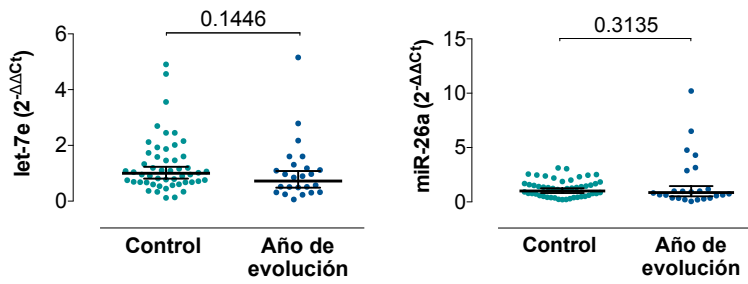


**Figura 18. Expresión de los miRNA relacionados con SCASEST comparando pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.** Los resultados se muestran como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. SCASEST (n=24), año de evolución (n=24).

|  | SCASEST<br>(n= 24)                     | Año de<br>evolución<br>(n= 24)        | p-valor |
|--|--|---------------------------------------|---------|
| <b>let-7e (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 0.28 [0.14-0.55]<br>0.39 [0.18-0.74]   | 0.72 [0.49-1.08]<br>0.87 [0.36-1.28]  | 0.0194  |
| <b>let-7g (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 0.35 [0.19-0.63]<br>0.41 [0.12-1.21]   | 0.37 [0.15-0.93]<br>0.31 [0.09-2.73]  | 0.3165  |
| <b>miR-28 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 1.67 [1.17-2.37]<br>1.49 [0.87-2.62]   | 1.73 [0.68-4.43]<br>2.23 [1.19-8.17]  | 0.0650  |
| <b>miR-130b (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR] | 1.47 [0.65-3.36]<br>1.94 [1.35-3.63]   | 1.06 [0.27-4.14]<br>2.41 [0.07-12.23] | 0.1140  |
| <b>miR-328 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 0.65 [0.41-1.02]<br>0.76 [0.28-1.38]   | 0.80 [0.41-1.57]<br>0.92 [0.56-1.87]  | 0.4908  |
| <b>miR-523 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 0.024 [0.01-0.10]<br>0.012 [0.00-0.21] | 0.00 [0.00-0.00]<br>0.00 [0.00-0.00]  | <0.0001 |
| <b>miR-874 (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 3.58 [1.98-6.47]<br>4.58 [1.66-9.12]   | 1.98 [0.76-5.13]<br>3.55 [0.79-6.47]  | 0.5009  |
| <b>miR-92a (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 1.39 [0.98-1.96]<br>1.35 [0.93-2.49]   | 1.21 [0.84-1.75]<br>1.13 [0.53-2.36]  | 0.9441  |
| <b>miR-26a (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 0.34 [0.21-0.54]<br>0.47 [0.16-0.74]   | 0.87 [0.51-1.46]<br>0.79 [0.36-2.45]  | 0.0053  |
| <b>miR-320b (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR] | 1.96 [0.75-5.17]<br>2.95 [0.76-9.31]   | 2.14 [0.47-9.74]<br>4.08 [0.05-37.42] | 0.0894  |

**Tabla 10. Comparación de los niveles de expresión de miRNA relacionados con SCASEST en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.** Los resultados se expresan como media con IC 95%, así como mediana [IQR] para mostrar la dispersión de los valores, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control.

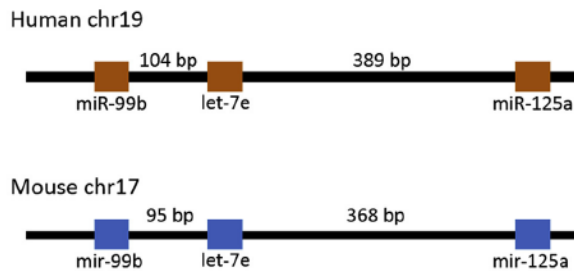
## Resultados



**Figura 19. Expresión de los miRNA relacionados con SCASEST comparando individuos control y pacientes con SCASEST después de un año de evolución clínica.** Los resultados se expresan como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Control (n=51), año de evolución (n=24).

#### 4.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL *CLUSTER* miR-99b/let-7e/miR-125a EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El miRNA let-7e representa uno de los productos maduros del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a. Se trata de un *cluster* conservado evolutivamente y codificado por una región intrónica del cromosoma 19 (Figura 20). Un *cluster* de miRNA hace referencia a un conjunto de miRNA que están localizados en el mismo cromosoma de forma consecutiva dentro de una región de 10kb, generando por tanto un transcrito primario común. Generalmente, los miRNA agrupados tienden a comportarse coordinadamente teniendo como dianas los mismos genes individuales o bien componentes de la misma vía de señalización.

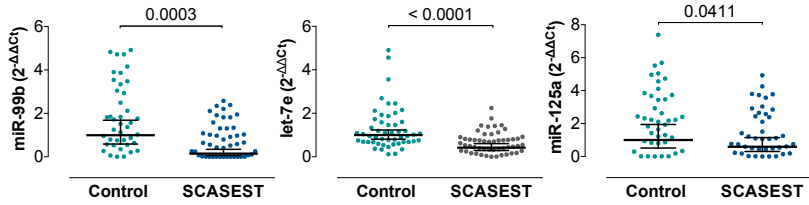


**Figura 20.** Representación del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en el cromosoma humano y el homólogo de ratón. Imagen tomada de (Ma et al., 2017).

#### **4.5.1. NIVELES DE EXPRESIÓN DEL *CLUSTER* miR-99b/let-7e/miR-125a EN EL GRUPO CONTROL Y EN PACIENTES CON SCASEST**

El miRNA let-7e fue uno de los miRNA seleccionados del array que mostraba relación con la manifestación aguda del infarto, revertía después de un año de evolución clínica (Figura 16) y validamos en nuestra población de estudio mediante qRT-PCR (Figura 17 y 18). La expresión del miRNA let-7e es una de las más afectadas en el grupo de pacientes con SCASEST con respecto al grupo control (Figura 17, Tabla 9) por lo que decidimos analizar la expresión de los otros dos componentes del *cluster* mediante qRT-PCR.

En el análisis de los arrays se observó que el miR-125a disminuyó de forma significativa en el grupo con SCASEST vs. grupo control, con una diferencia de expresión de -5.74 ( $p=0.0306$ , Tabla 7). Sin embargo, el miR-99b no se vió alterado (diferencia de expresión de -3.71,  $p=0.1621$ ). No obstante, mediante la cuantificación de la expresión relativa por qRT-PCR, se observó una disminución significativa de miR-99b y miR-125a en el grupo con SCASEST al compararse con el grupo control (Figura 21 y Tabla 11), al igual que ocurría en el caso del let-7e.



**Figura 21. Expresión de los componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a comparando individuos control y pacientes con SCASEST.** La expresión relativa de los miRNA se cuantificó mediante qRT-PCR como se describe en Material y métodos. Los resultados se expresan como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) calculada respecto al grupo control. La comparación de medias se realizó mediante el test no-paramétrico de Mann-Whitney. miR-99b y miR-125a: Control (n=41), SCASEST (n=46); let-7e: Control (n=51), SCASEST (n=54).

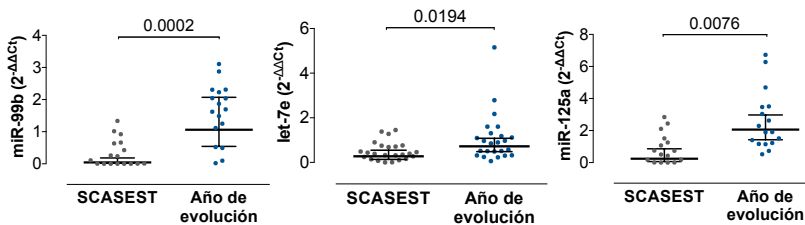
|  | Control          | SCASEST          | p-valor |
|--|------------------|------------------|---------|
| <b>miR-99b (<math>2^{-\Delta\Delta C_t}</math>)</b>  |                  |                  |         |
| media [IC 95%]                                       | 1.00 [0.59-1.68] | 0.15 [0.06-0.35] | 0.0003  |
| mediana [IQR]  | 1.51 [0.61-3.20] | 0.58 [0.01-1.32] |         |
| <b>let-7e (<math>2^{-\Delta\Delta C_t}</math>)</b>   |                  |                  |         |
| media [IC 95%]                                       | 1.00 [0.81-1.23] | 0.42 [0.29-0.61] | <0.0001 |
| mediana [IQR]  | 1.02 [0.68-1.60] | 0.58 [0.29-0.88] |         |
| <b>miR-125a (<math>2^{-\Delta\Delta C_t}</math>)</b> |                  |                  |         |
| media [IC 95%]                                       | 1.00 [0.52-1.95] | 0.59 [0.31-1.15] | 0.0411  |
| mediana [IQR]  | 2.18 [0.85-3.71] | 1.07 [0.45-2.62] |         |

**Tabla 11. Comparación de los niveles de expresión de los componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en individuos control y pacientes con SCASEST.** Los resultados se expresan como media con IC 95%, así como mediana [IQR] para mostrar la dispersión de los valores, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) calculada respecto al grupo control. miR-99b y miR-125a: Control (n=41) SCASEST (n=46); let-7e: Control (n=51), SCASEST (n=54).

#### 4.5.2. NIVELES DE EXPRESIÓN DEL *CLUSTER* miR-99b/let-7e/miR-125a EN PACIENTES CON SCASEST Y DESPUÉS DE UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA

Posteriormente realizamos la comparación de los niveles de miRNA circulantes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a entre el grupo con SCASEST y sus respectivas muestras al año de evolución. La expresión tanto del miR-99b como del miR-125a aumentó de forma significativa transcurrido un año de evolución clínica desde la ICP (Figura 22 y Tabla 12), revirtiéndose la disminución de su expresión en pacientes con SCASEST, al igual que ocurría con el let-7e (Figura 23).

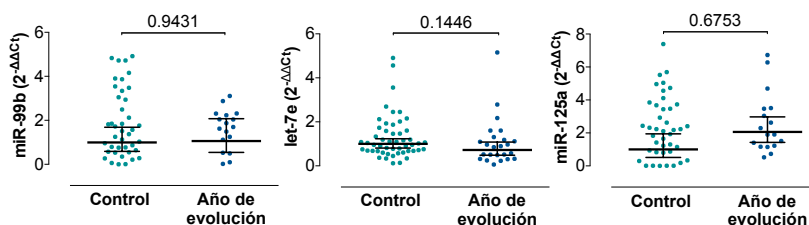
Debido a que las muestras SCASEST y al año de evolución son pareadas, es decir, corresponden al mismo paciente en dos tiempos distintos, llevamos a cabo un análisis estadístico separado.



**Figura 22. Expresión de los componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a comparando pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.** La expresión relativa de los miRNA se cuantificó mediante qRT-PCR como se describe en Material y métodos. Los resultados se expresan como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control. La comparación de medias se realizó mediante el test no-paramétrico de Wilcoxon. miR-99b y miR-125a: SCASEST (n=17), año de evolución (n=17); let-7e: SCASEST (n=24), año de evolución (n=24).

|  | SCASEST                              | Año de evolución                     | p-valor |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|---------|
| <b>miR-99b (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]  | 0.05 [0.01-0.18]<br>0.11 [0.00-0.65] | 1.06 [0.54-2.07]<br>1.70 [0.82-2.27] | 0.0002  |
| <b>let-7e (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR]   | 0.28 [0.14-0.55]<br>0.39 [0.18-0.74] | 0.72 [0.49-1.08]<br>0.87 [0.36-1.28] | 0.0194  |
| <b>miR-125a (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b><br>media [IC 95%]<br>mediana [IQR] | 0.24 [0.07-0.87]<br>0.62 [0.06-1.45] | 2.06 [1.42-2.98]<br>1.91 [1.20-3.49] | 0.0076  |

**Tabla 12. Comparación de los niveles de expresión de los componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.** Los resultados se expresan como media con IC 95%, así como mediana [IQR] para mostrar la dispersión de los valores, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control. miR-99b y miR-125a: SCASEST (n=17), año de evolución (n=17); let-7e: SCASEST (n=24), año de evolución (n=24).



**Figura 23. Expresión de los componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a comparando individuos control y pacientes con SCASEST después de un año de evolución clínica.** Análisis comparativo entre los niveles de miRNA del grupo control y de los pacientes con SCASEST después de un año de evolución. La ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos indicaría que la disminución de la expresión de miR-99b, let-7e y miR-125a observada en el momento del infarto revierte hasta niveles control. Los resultados se expresan como media con IC 95%, representando el valor de expresión relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) calculada respecto al grupo control. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. miR-99b y miR-125a: SCASEST (n=17) Año de evolución (n=17); let-7e: SCASEST (n=24), Año de evolución (n=24).



#### **4.6. PAPEL DEL *CLUSTER* miR-99b/let-7e/miR-125a EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL**

En los últimos años, se ha establecido que el fenotipo de las células endoteliales y las células de músculo liso vascular está regulado por miRNA de manera post-transcripcional y, por tanto, pueden estar implicados en la respuesta celular durante la remodelación vascular. Así, estos miRNA podrían estar integrados en una red que regula la proliferación celular y la formación de vasos, funciones a su vez implicadas en la fisiopatología de diversas enfermedades cardiovasculares. Debido a su localización, la comunicación intercelular a través de miRNA circulantes es especialmente importante para las células endoteliales.

Se desconoce el papel del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en la biología vascular. Según nuestros resultados, los niveles circulantes de los 3 miRNA que componen el *cluster* están disminuidos en la manifestación aguda del infarto (Figura 21, Tabla 11), siendo reestablecidos a niveles control al año de la ICP (Figura 22 y 23, Tabla 12).

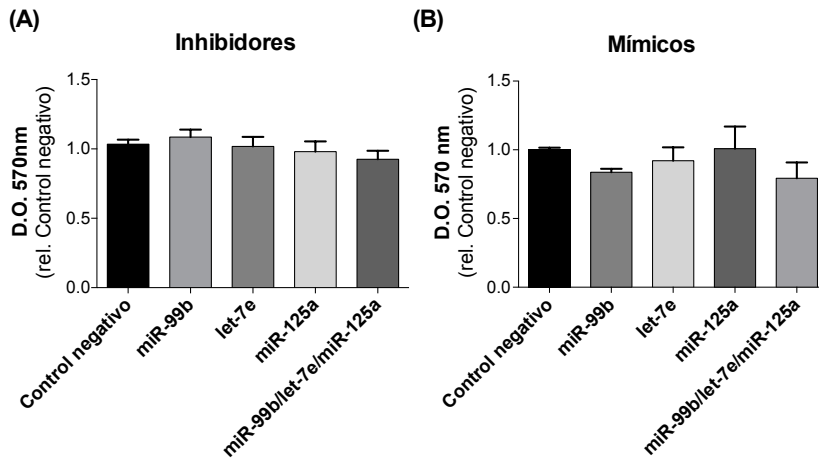
Se ha descrito una alta expresión de los 3 miRNA del *cluster* en células endoteliales (Hao et al., 2014, Li et al., 2010, Kuehbacher et al., 2007; McCall et al., 2011). Debido a que durante la activación e inflamación endotelial tiene lugar un aumento en la permeabilidad del endotelio junto con un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y angiogénesis, decidimos estudiar la participación del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a en la modulación de la función endotelial. Para ello, utilizamos el modelo de HUVEC y mediante la utilización de inhibidores LNA (del inglés, *Locked Nucleic Acid*) y mímicos LNA de miRNA, analizamos su capacidad funcional a través de estudios de adhesión, proliferación y vasculogénesis. Los

inhibidores LNA de miRNA son oligonucleótidos antisentido con una perfecta complementariedad de secuencia con el miRNA, de forma que al introducirlos en las células inhiben la actividad del miRNA formando complejos estables. Por el contrario, los mímicos LNA de miRNA están diseñados para simular la producción de miRNA maduros que tiene lugar de forma natural, incrementando así la actividad del miRNA.

La optimización de las concentraciones y tiempos del agente de transfección así como de los diferentes inhibidores y mímicos de miRNA se determinó previamente, tal y como se describe en el apartado Material y métodos. Para ello, se realizaron transfecciones tanto con los inhibidores de miRNA por separado (miR-99b, let-7e y miR-125a) a una concentración de 20 nM, como con los respectivos mímicos de miRNA a una concentración de 30 nM. Cuando los miRNA están agrupados en una región del genoma constituyendo un *cluster*, se considera que su expresión está sometida a una misma regulación, sugiriendo que pueden actuar coordinadamente para controlar un proceso biológico determinado. Por ello, también se realizaron transfecciones triples de los inhibidores (20 nM cada inhibidor) y de los mímicos de miRNA (30 nM cada mímico), respectivamente, con el objetivo de analizar posibles efectos combinados. Se incluyeron también transfecciones con un control negativo para los inhibidores (20 nM) y mímicos (30 nM).

#### 4.6.1. VIABILIDAD CELULAR

Determinamos la viabilidad celular mediante el ensayo MTT para comprobar que la transfección con los diferentes inhibidores y mimicos de miRNA del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a a las concentraciones y tiempos fijados no afectaba a la viabilidad de las HUVEC. Como se observa en la Figura 24, tanto las transfecciones individuales como las transfecciones combinadas de los inhibidores (A) y mimicos (B) de miRNA no indujeron cambios en la viabilidad de las células endoteliales a las concentraciones y tiempos fijados.

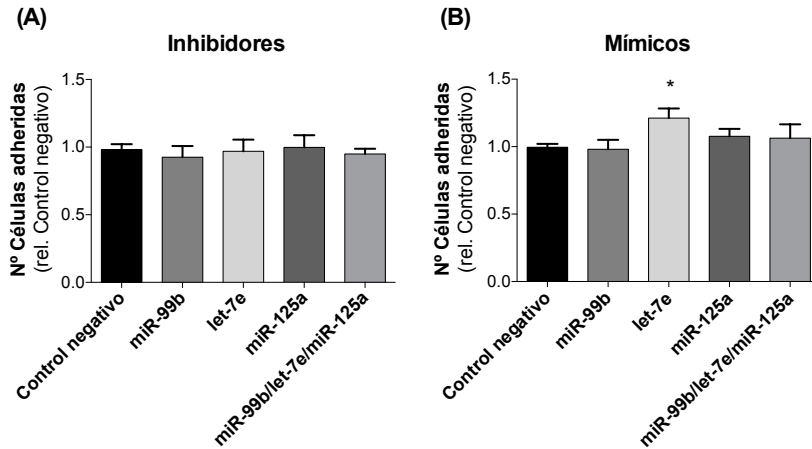


**Figura 24. Viabilidad celular.** Tras la transfección durante 18 h con los inhibidores de miRNA por separado (20 nM) y combinados (20 nM cada inhibidor) (A) y mimicos de miRNA por separado (30 nM) y combinados (30 nM cada mimico) (B) se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT. Los datos están relativizados al control negativo, tratándose de células procedentes de los mismos cultivos celulares transfectadas con un inhibidor (20 nM) o mimico (30 nM) de miRNA sin actividad, respectivamente. Resultados de densidad óptica expresados como media  $\pm$  SEM (n=4). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía.

#### 4.6.2. ADHESIÓN CELULAR

Para estudiar la capacidad de adhesión de las HUVEC tras la inhibición y el aumento de los miRNA del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a, se realizaron transfecciones con los inhibidores y mimicos de los miRNA, respectivamente, durante 18 horas. Posteriormente, se cambió el medio de transfección y las células se cultivaron durante 24 horas adicionales con el fin de poder evaluar los efectos de los inhibidores y mimicos. Como se puede observar en la Figura 25, no se detectaron cambios en la adhesión de las células endoteliales al ser transfectadas con los inhibidores de los componentes del *cluster* por separado y tampoco con la inhibición combinada (Figura 25A). Por otro lado, la capacidad de adhesión de las HUVEC incrementó tras la transfección con el mimico de let-7e (Figura 25B). Sin embargo, no se observaron cambios al transfectar con los mimicos de miR-99b y miR-125a y tampoco en la transfección combinada (Figura 25B).

## Resultados



**Figura 25. Adhesión celular.** Tras la transfección durante 18 h con los inhibidores de miRNA por separado (20 nM) y combinados (20 nM cada inhibidor) **(A)** y mímicos de miRNA por separado (30 nM) y combinados (30 nM cada mímico) **(B)** se llevaron a cabo los experimentos de adhesión tal y como se indica en Material y métodos. Los datos están relativizados al control negativo, tratándose de células procedentes de los mismos cultivos celulares transfectadas con un inhibidor (20 nM) o mímico (30 nM) de miRNA sin actividad, respectivamente. Resultados del número de células adheridas expresados como la media  $\pm$  SEM (n=8). \*p<0.05 vs. control negativo (ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples).

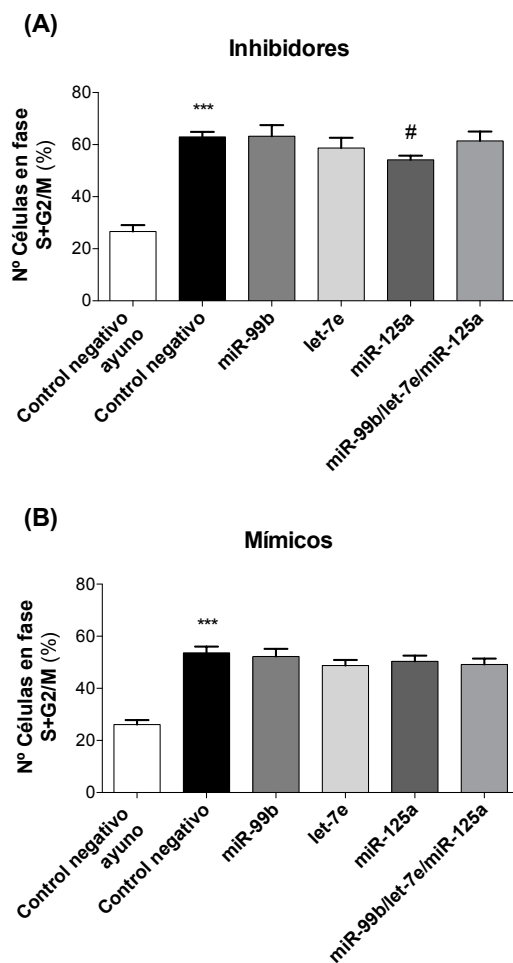
### 4.6.3. PROLIFERACIÓN CELULAR

La capacidad proliferativa de las HUVEC al inhibir y aumentar los miRNA del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a mediante transfección durante 18h, se evaluó tras su estimulación con medio endotelial completo después de un periodo de ayuno de 24h, es decir, cultivadas con medio endotelial desprovisto de SBF. El tiempo de ayuno adecuado para que la mayor parte del cultivo entrase en fase G0/G1 se determinó previamente, tal y como se indica en Material y métodos. Sometiendo a las células a un periodo de ayuno de 24h, se observó que aproximadamente el 80% del cultivo se encontraba en fase G0/G1. De esta forma, se podía evaluar adecuadamente el efecto sobre la

proliferación celular de la transfección con los inhibidores y mimicos de miRNA.

En la Figura 26 se muestran los resultados de los experimentos de proliferación en HUVEC. Los resultados obtenidos indicaron que efectivamente los cultivos en situación de ayuno contenían alrededor de un 20% de células en fase proliferativa, mostrando diferencias significativas con respecto a aquellas células cultivadas con medio endotelial completo. Se observó una disminución del número de células en fase proliferativa (fase S+G2/M) en HUVEC transfectadas con el inhibidor del miR-125a (Figura 26A). Sin embargo, no se observaron diferencias al transfectar con los inhibidores de miR-99b y let-7e y tampoco en las transfecciones combinadas de los 3 inhibidores. Por otro lado, tampoco se observaron cambios en el número de células en fase proliferativa al transfectar con ninguno de los mimicos de miRNA ni al combinarlos (Figura 26B).

## Resultados



**Figura 26. Proliferación celular.** Tras la transfección durante 18h con los inhibidores de miRNA por separado (20 nM) y combinados (20 nM cada inhibidor) (A) y mímicos de miRNA por separado (30 nM) y combinados (30 nM cada mímico) (B) los cultivos se sincronizaron en medio de ayuno durante 24h y después se estimularon con medio endotelial completo. Los experimentos de proliferación celular se llevaron a cabo tal y como se indica en Material y métodos. Los resultados representan el porcentaje de células en fase proliferativa del ciclo celular (S+G2/M) expresados como la media  $\pm$  SEM (n=5). \*\*\*p<0.0001 vs. control negativo ayuno; #p<0.05 vs. control negativo (ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples).

#### 4.6.4. CAPACIDAD VASCULOGÉNICA

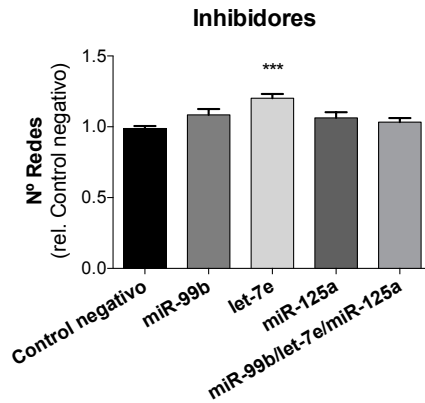
La capacidad vasculogénica de las HUVEC se analizó midiendo el número de estructuras tubulares formadas sobre una matriz de Matrigel. Tras la transfección con los inhibidores y mimicos de miRNA durante 18 horas, se cambió el medio de cultivo y las células se cultivaron durante 24 horas adicionales. Tras este periodo, se sembraron  $5 \times 10^4$  células sobre una matriz de Matrigel y se incubaron durante 6 horas. Las concentraciones y tiempos de transfección óptimos se fijaron previamente como se indica en Material y métodos.

La transfección con el inhibidor de let-7e provocó un aumento del número de redes formadas por las HUVEC, mientras que no se observaron cambios significativos para el resto de inhibidores ni en la transfección combinada (Figura 27 y 28).

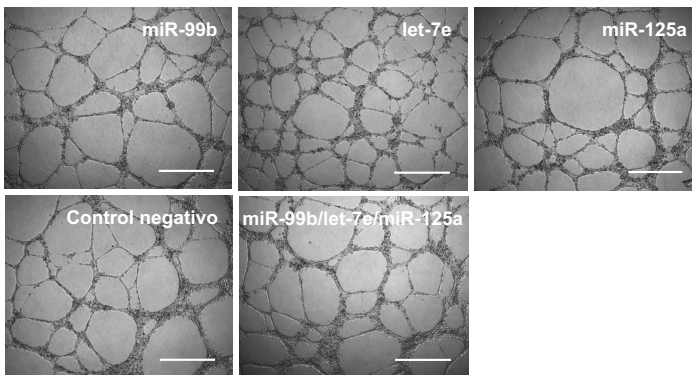
En la figura 29 y 30 se muestran los resultados de la capacidad vasculogénica de las HUVEC tras ser transfectadas durante 18 horas con los mimicos de los miRNA del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a. No se observaron diferencias en el número de redes formadas en HUVEC transfectadas con los mimicos por separado ni tampoco en la transfección combinada con los mimicos de los 3 componentes del *cluster*.



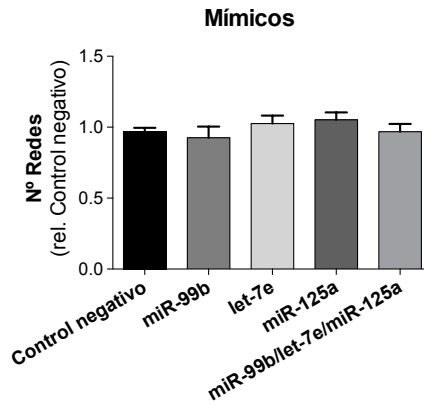
## Resultados



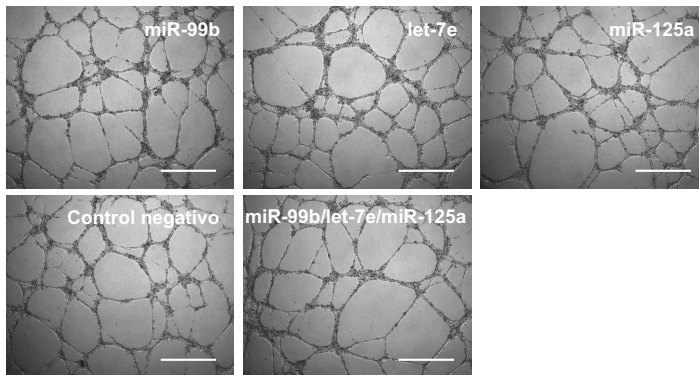
**Figura 27. Capacidad vasculogénica de las HUVEC transfectadas con inhibidores de los miRNA del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a.** Tras la transfección durante 18h con los inhibidores de miRNA por separado (20 nM) y combinados (20 nM cada inhibidor) se cambió el medio de la transfección por medio endotelial y se mantuvieron 24h adicionales. Tras ese periodo se sembraron  $5 \times 10^4$  células sobre una matriz de Matrigel y se incubaron durante 6 horas. Los datos están relativizados al control negativo, tratándose de células procedentes de los mismos cultivos celulares transfectadas durante 18h con un inhibidor (20 nM) de miRNA sin actividad. Los resultados representan el número de redes formadas sobre el Matrigel para cada una de las transfecciones expresados como media  $\pm$  SEM (n=7). \*\*\*p<0.0001 vs. control negativo (ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples).



**Figura 28. Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas por las células sobre la matriz de Matrigel de las transfecciones con los inhibidores de miRNA del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a.** Las imágenes corresponden a los resultados de la Figura 27. Escala: 500 $\mu$ m (objetivo 4X; magnificación total 40X).



**Figura 29. Capacidad vasculogénica de las HUVEC transfectadas con mímicos de los miRNA del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a.** Tras la transfección durante 18h con los mímicos de miRNA por separado (30 nM) y combinados (30 nM cada mímico) se cambió el medio de la transfección por medio endotelial y se mantuvieron 24h adicionales. Tras ese periodo se sembraron  $5 \times 10^4$  células sobre una matriz de Matrigel y se incubaron durante 6 horas. Los datos están relativizados al control negativo, tratándose de células procedentes de los mismos cultivos celulares transfectadas con un mímico (30 nM) de miRNA sin actividad. Los resultados representan el número de redes formadas sobre el Matrigel para cada una de las transfecciones expresados como media  $\pm$  SEM (n= 7). Los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía.



**Figura 30. Imágenes representativas de las estructuras tubulares formadas por las células sobre la matriz de Matrigel de las transfecciones con los mímicos de miRNA del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a.** Las imágenes corresponden a los resultados de la Figura 29. Escala:  $500\mu\text{m}$  (objetivo 4X; magnificación total 40X).

#### **4.7. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS CON LA EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES**

La inflamación tiene un papel destacado en la patogénesis de la aterosclerosis y regula muchos aspectos del SCA. Contribuye a muchas de las características de las placas ateroscleróticas implicadas en la patogénesis del SCA, así como a la regulación de las vías que conducen finalmente a su rotura. Además, las cascadas inflamatorias que se producen como consecuencia de la isquemia y necrosis miocárdica tienen un papel clave en el daño agudo y en el proceso de reparación posterior.

Los miRNA contribuyen a una variedad de procesos biológicos incluyendo la disfunción endotelial y la inflamación vascular. Además, los miRNA pueden actuar directa o indirectamente sobre factores inflamatorios como citoquinas o moléculas de adhesión.

En la presente tesis, se han mostrado anteriormente los resultados de expresión de miRNA circulantes mediante arrays en la manifestación aguda del infarto y después de un año de evolución clínica. En base a ellos, se seleccionaron y analizaron, mediante qRT-PCR en la población de estudio, una serie de miRNA relacionados con la manifestación aguda del infarto: let-7e, let-7g, miR-28, miR-130b, miR-328, miR-523, miR-874, miR-92a, miR-26a, miR-320b, miR-99b y miR-125a.

Posteriormente llevamos a cabo un análisis de las vías de señalización potencialmente relacionadas con esta selección de miRNA utilizando el sistema miRSystem. Mediante algoritmos de predicción, el sistema muestra un resumen de las vías potencialmente reguladas por los miRNA de interés junto con sus posibles dianas.

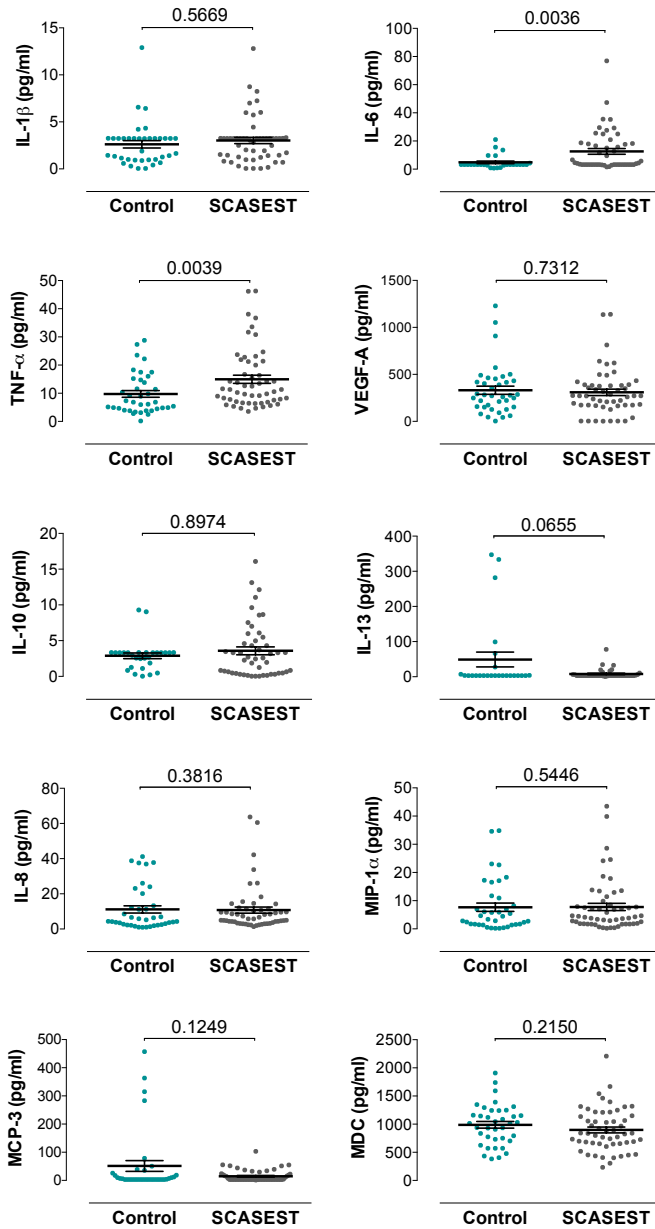
Entre las vías de señalización potencialmente reguladas por los miRNA seleccionados en pacientes con SCASEST, se encontraban algunas relacionadas con inflamación como la vía de las citoquinas y la interacción con sus receptores, así como la vía de las quimioquinas. Atendiendo a las dianas potencialmente reguladas por estos miRNA dentro de estas vías de señalización de citoquinas y quimioquinas, decidimos medir los niveles en suero de una selección de citoquinas proinflamatorias: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y VEGF-A; citoquinas antiinflamatorias: IL-10 e IL-13; y quimioquinas: MCP-3, MDC, IL-8 y MIP-1 $\alpha$ .

En este apartado, el objetivo fue analizar la asociación de los niveles de expresión de miRNA circulantes relacionados con la manifestación aguda del infarto con los niveles de citoquinas y quimioquinas implicadas en la patología del SCA.

En la Figura 31 y Tabla 13 se muestran los niveles de las diferentes citoquinas y quimioquinas en suero de pacientes SCASEST en comparación con sujetos control. Como se puede observar, se detectó un aumento significativo de los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  en la manifestación aguda del infarto con respecto a los sujetos control. Sin embargo, no se observaron variaciones en el resto de citoquinas analizadas.

Por otro lado, para estudiar si se producía algún cambio en el contexto inflamatorio después de un año del infarto, medimos los niveles de citoquinas en muestras de suero de pacientes SCASEST tras un año de evolución y los comparamos frente a sus respectivos niveles en el momento del infarto. Como se muestra en la figura 32 y Tabla 14 no se detectaron cambios estadísticamente significativos en nuestra población de estudio para ninguna de las citoquinas y quimioquinas estudiadas.

## Resultados

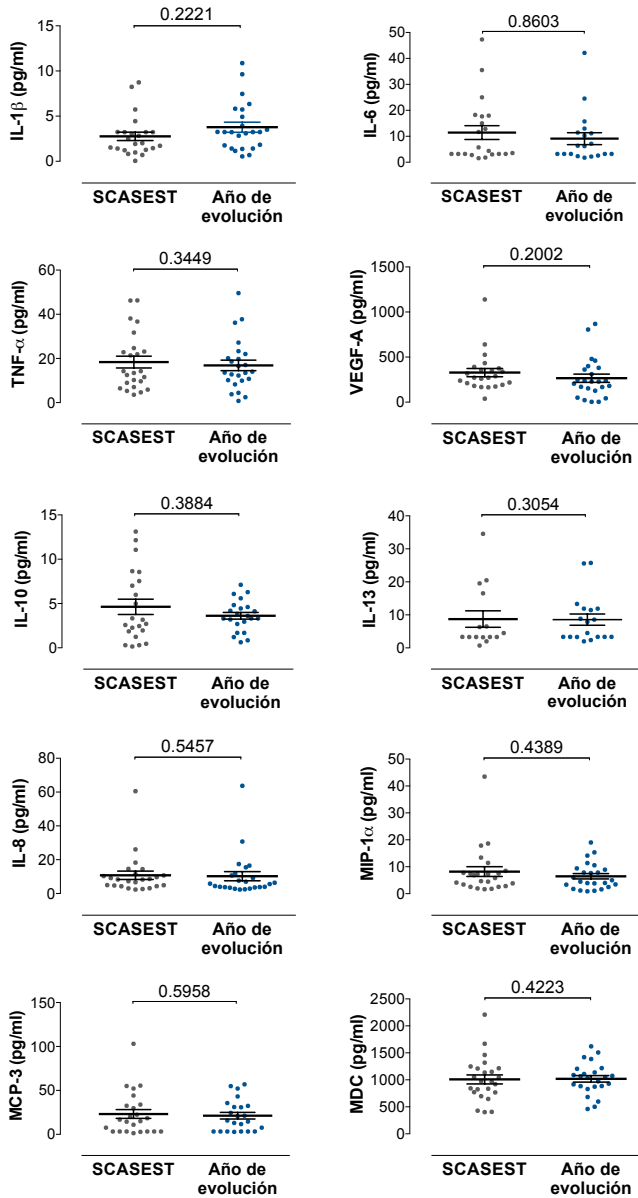


**Figura 31. Niveles de citoquinas en suero comparando individuos control y pacientes con SCASEST.** Los resultados se expresan como media (pg/ml)  $\pm$  SEM. Control (n=38) SCASEST (n=54). La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney.

|   | Control<br>(n= 38)                  | SCASEST<br>(n= 54)                 | p-valor |
|---|-------------------------------------|------------------------------------|---------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]   | 2.6 $\pm$ 0.4<br>3.2 [1.0-3.2]      | 3.0 $\pm$ 0.3<br>3.2 [1.3-3.2]     | 0.5669  |
| <b>IL-6</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                     | 4.9 $\pm$ 0.9<br>3.2 [3.1-3.2]      | 12.6 $\pm$ 2.1<br>4.2 [3.2-18.4]   | 0.0036  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]  | 9.8 $\pm$ 1.2<br>6.8 [4.4-14.8]     | 15.0 $\pm$ 1.4<br>11.3 [7.0-21.3]  | 0.0039  |
| <b>VEGF-A</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                   | 331.6 $\pm$ 43.0<br>275 [153-437]   | 309.1 $\pm$ 34.1<br>272 [174-388]  | 0.7312  |
| <b>IL-10</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                    | 2.9 $\pm$ 0.4<br>3.3 [1.4-3.3]      | 3.6 $\pm$ 0.6<br>2.6 [0.5-5.2]     | 0.8974  |
| <b>IL-13</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                    | 49.0 $\pm$ 21.1<br>3.3 [3.3-17.3]   | 8.1 $\pm$ 2.0<br>3.3 [3.3-6.0]     | 0.0655  |
| <b>IL-8</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                     | 11.2 $\pm$ 2.0<br>4.8 [2.5-15.0]    | 10.8 $\pm$ 1.8<br>6.2 [3.6-11.4]   | 0.3816  |
| <b>MIP-1<math>\alpha</math></b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR] | 7.7 $\pm$ 1.5<br>4.0 [1.5-11.1]     | 7.8 $\pm$ 1.3<br>4.2 [1.8-8.8]     | 0.5446  |
| <b>MCP-3</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                    | 51.3 $\pm$ 19.3<br>4.2 [3.3-25.9]   | 14.7 $\pm$ 2.7<br>3.3 [3.2-20.6]   | 0.1249  |
| <b>MDC</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                      | 988.2 $\pm$ 58.8<br>1012 [724-1242] | 898.0 $\pm$ 51.9<br>839 [654-1164] | 0.2150  |

**Tabla 13. Comparación de los niveles de citoquinas en suero de individuos control y pacientes con SCASEST en su manifestación aguda.** Los resultados representan los niveles de citoquinas en (pg/ml), expresados como media  $\pm$  SD y mediana [IQR] para mostrar la dispersión de los datos. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Control (n= 38), SCASEST (n= 54).

## Resultados



**Figura 32. Niveles de citoquinas en suero comparando pacientes con SCASEST en el momento de su manifestación aguda y al año de evolución clínica. Los resultados se expresan como media (pg/ml)  $\pm$  SEM. Control (n=24) SCASEST (n=24). La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Wilcoxon.**

|   | SCASEST<br>(n= 24)                  | Año de<br>evolución<br>(n= 24)       | p-valor |
|---|-------------------------------------|--------------------------------------|---------|
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]   | 2.8 $\pm$ 0.5<br>2.0 [1.3-3.2]      | 3.8 $\pm$ 0.6<br>3.2 [1.5-5.5]       | 0.2221  |
| <b>IL-6</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                     | 11.4 $\pm$ 2.7<br>4.4 [3.2-17.8]    | 9.1 $\pm$ 2.3<br>6.2 [3.2-11.4]      | 0.8603  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]  | 18.4 $\pm$ 2.7<br>13.9 [7.5-24.3]   | 16.9 $\pm$ 2.4<br>13.8 [10.0-21.5]   | 0.3449  |
| <b>VEGF-A</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                   | 327.9 $\pm$ 45.8<br>271 [192-376]   | 265.6 $\pm$ 45.5<br>228 [134-376]    | 0.2002  |
| <b>IL-10</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                    | 4.6 $\pm$ 0.9<br>2.9 [1.7-7.8]      | 3.6 $\pm$ 0.4<br>3.5 [2.4-4.7]       | 0.3884  |
| <b>IL-13</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                    | 8.7 $\pm$ 2.5<br>3.3 [3.3-16.5]     | 8.6 $\pm$ 1.7<br>6.2 [3.3-11.9]      | 0.3054  |
| <b>IL-8</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                     | 10.8 $\pm$ 2.4<br>8.3 [4.5-11.3]    | 10.2 $\pm$ 2.7<br>5.7 [3.6-11.5]     | 0.5457  |
| <b>MIP-1<math>\alpha</math></b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR] | 8.2 $\pm$ 1.8<br>6.3 [3.0-8.3]      | 6.5 $\pm$ 1.0<br>4.8 [2.7-9.3]       | 0.4389  |
| <b>MCP-3</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                    | 23.1 $\pm$ 5.0<br>15.9 [3.2-33.6]   | 21.2 $\pm$ 3.7<br>15.8 [3.3-32.4]    | 0.5958  |
| <b>MDC</b> (pg/ml)<br>media $\pm$ SEM<br>mediana [IQR]                      | 1008.3 $\pm$ 83.7<br>969 [770-1213] | 1019.3 $\pm$ 60.0<br>1044 [876-1189] | 0.4223  |

**Tabla 14. Comparación de los niveles de citoquinas en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y al año de evolución clínica.** Los resultados representan los niveles de citoquinas en (pg/ml), expresados como media  $\pm$  SD y mediana [IQR] para mostrar la dispersión de los datos. La comparación de medias se realizó mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. SCASEST (n= 24), después de un año de evolución clínica (n= 24).



## Resultados

Posteriormente, de forma conjunta en todos los individuos participantes del estudio y con independencia del cuadro clínico, se llevó a cabo un análisis de correlación lineal entre los niveles de expresión de cada miRNA circulante y los niveles de cada una de las citoquinas y quimioquinas analizadas. En la Tabla 15 y 16 se muestra el análisis de la asociación entre las dos variables: expresión de miRNA circulantes y niveles de mediadores inflamatorios. Excepto miR-125a, todos los miRNA mostraron alguna correlación entre sus niveles de expresión y los niveles de citoquinas y/o quimioquinas en suero. Los mediadores inflamatorios que correlacionaron con un mayor número de miRNA fueron las quimioquinas IL-8 y MDC. Por el contrario, VEGF-A y la citoquina antiinflamatoria IL-10 no mostraron ninguna asociación significativa con los miRNA estudiados.

Se detectó una correlación positiva entre los niveles de IL-8 y miR-130b ( $r= 0.22$ ,  $p= 0.0153$ ), miR-523 ( $r= 0.21$ ,  $p= 0.0190$ ), miR-874 ( $r= 0.18$ ,  $p= 0.0491$ ) y miR-28 ( $r= 0.27$ ,  $p= 0.0030$ ). Éste último a su vez mostró una correlación negativa con los niveles de la quimioquina MDC ( $r= -0.20$ ,  $p= 0.0233$ ).

Let-7g mostró unos niveles de expresión que se asociaron de forma negativa con los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  ( $r= -0.19$ ,  $p=0.0329$ ). El otro componente estudiado de la familia let-7, let-7e, mostró una correlación negativa con la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  ( $r= -0.19$ ,  $p= 0.0386$ ), mientras que por el contrario correlacionó positivamente con los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-13 ( $r= 0.22$ ,  $p= 0.0416$ ). Con respecto a los dos componentes restantes del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a, miR-99b mostró una asociación positiva con la quimioquina MDC ( $r= 0.22$ ,  $p= 0.0195$ ), mientras que los niveles de miR-125a no correlacionaron con ninguno de los

mediadores inflamatorios analizados. Al igual que let-7e, miR-320b mostró una asociación negativa con TNF- $\alpha$  ( $r = -0.20$ ,  $p = 0.0229$ ).

Por otro lado, miR-92a se relacionó positivamente con los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6 ( $r = 0.22$ ,  $p = 0.0265$ ) y negativamente con la quimioquina MDC ( $r = -0.33$ ,  $p = 0.0002$ ). Asimismo, miR-26a mostró una asociación negativa con MDC ( $r = -0.26$ ,  $p = 0.0040$ ). La quimioquina MIP-1 $\alpha$  se relacionó positivamente con miR-523 ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.0120$ ), mientras que miR-328 correlacionó positivamente con la quimioquina MCP-3 ( $r = 0.20$ ,  $p = 0.0327$ ) y de forma negativa con la citoquina antiinflamatoria IL-13 ( $r = 0.22$ ,  $p = 0.0356$ ).

Atendiendo a los valores del coeficiente de correlación, aunque se detectó un número considerable de correlaciones significativas entre los niveles de expresión de miRNA circulantes y mediadores inflamatorios, en general fueron correlaciones débiles. Los resultados mostraron las correlaciones más fuertes para la quimioquina MDC y los miRNA miR-92a ( $r = -0.33$ ,  $p = 0.0002$ ) y miR-26a ( $r = -0.26$ ,  $p = 0.0040$ ), respectivamente, así como para la quimioquina IL-8 y miR-28 ( $r = 0.27$ ,  $p = 0.0030$ ).

## Resultados

| miRNA<br>( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) | Citoquinas (pg/ml) |                               |                              |                               |                   |                 |                              |
|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|-----------------|------------------------------|
|                                     | Proinflamatorias   |                               |                              |                               | Antiinflamatorias |                 |                              |
|                                     | IL-1 $\beta$       | IL-6                          | TNF- $\alpha$                | VEGF-A                        | IL-10             | IL-13           |                              |
| let 7e                              | r<br>p             | -0.05<br>0.5559               | -0.16<br>0.1119              | <b>-0.19</b><br><b>0.0386</b> | -0.03<br>0.7190   | 0.02<br>0.8781  | <b>0.22</b><br><b>0.0416</b> |
| let-7g                              | r<br>p             | <b>-0.19</b><br><b>0.0329</b> | -0.06<br>0.5223              | -0.17<br>0.0654               | -0.11<br>0.2442   | -0.08<br>0.4171 | -0.08<br>0.4422              |
| miR-28                              | r<br>p             | 0.04<br>0.6637                | 0.02<br>0.8773               | -0.14<br>0.1165               | -0.04<br>0.6354   | -0.12<br>0.2237 | -0.11<br>0.3304              |
| miR-130b                            | r<br>p             | 0.02<br>0.8648                | -0.07<br>0.5039              | -0.17<br>0.0588               | -0.11<br>0.2101   | -0.06<br>0.5144 | -0.14<br>0.1840              |
| miR-328                             | r<br>p             | -0.04<br>0.6737               | -0.14<br>0.1589              | -0.13<br>0.1556               | 0.00<br>0.9695    | -0.08<br>0.4162 | <b>0.22</b><br><b>0.0356</b> |
| miR-523                             | r<br>p             | -0.09<br>0.3320               | 0.07<br>0.4749               | 0.10<br>0.2484                | 0.03<br>0.7543    | 0.05<br>0.6425  | -0.06<br>0.5935              |
| miR-874                             | r<br>p             | 0.00<br>0.9786                | 0.12<br>0.2494               | -0.14<br>0.1299               | -0.10<br>0.2909   | -0.09<br>0.3653 | -0.11<br>0.3192              |
| miR-92a                             | r<br>p             | -0.02<br>0.8143               | <b>0.22</b><br><b>0.0265</b> | -0.10<br>0.2486               | -0.08<br>0.3772   | 0.10<br>0.3148  | 0.06<br>0.6052               |
| miR-26a                             | r<br>p             | -0.03<br>0.7128               | -0.03<br>0.7448              | -0.06<br>0.4884               | 0.09<br>0.3481    | -0.06<br>0.5121 | 0.00<br>0.9743               |
| miR-320b                            | r<br>p             | 0.04<br>0.6462                | -0.10<br>0.3237              | <b>-0.20</b><br><b>0.0229</b> | -0.12<br>0.1921   | -0.17<br>0.0822 | -0.13<br>0.2305              |
| miR-99b                             | r<br>p             | -0.01<br>0.8952               | -0.17<br>0.1263              | -0.18<br>0.0573               | 0.02<br>0.8027    | -0.14<br>0.1733 | 0.15<br>0.2122               |
| miR-125a                            | r<br>p             | 0.02<br>0.8411                | -0.15<br>0.1606              | -0.08<br>0.3936               | 0.00<br>0.9840    | -0.14<br>0.1947 | -0.09<br>0.4562              |

**Tabla 15. Correlación entre los niveles de expresión de miRNA y los niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en todos los individuos participantes en el estudio.** La asociación lineal entre variables: expresión de miRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) y nivel de citoquinas (pg/ml) se analizó, con independencia del cuadro clínico de los sujetos, mediante el coeficiente de correlación de Pearson (n=124); miR-99b y miR-125a (n=108).

| miRNA<br>( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) |   | Quimioquinas (pg/ml) |                |               |               |
|-------------------------------------|---|----------------------|----------------|---------------|---------------|
|                                     |   | IL-8                 | MIP-1 $\alpha$ | MCP-3         | MDC           |
| let 7e                              | r | 0.08                 | -0.02          | 0.13          | -0.08         |
|                                     | p | 0.3972               | 0.8053         | 0.1474        | 0.3787        |
| let-7g                              | r | 0.08                 | 0.06           | -0.14         | 0.07          |
|                                     | p | 0.3941               | 0.5028         | 0.1184        | 0.4433        |
| miR-28                              | r | <b>0.27</b>          | 0.08           | -0.14         | <b>-0.20</b>  |
|                                     | p | <b>0.0030</b>        | 0.3940         | 0.1395        | <b>0.0233</b> |
| miR-130b                            | r | <b>0.22</b>          | 0.01           | -0.15         | -0.13         |
|                                     | p | <b>0.0153</b>        | 0.9282         | 0.1086        | 0.1387        |
| miR-328                             | r | 0.13                 | 0.06           | <b>0.20</b>   | -0.17         |
|                                     | p | 0.1381               | 0.5120         | <b>0.0327</b> | 0.0526        |
| miR-523                             | r | <b>0.21</b>          | <b>0.23</b>    | -0.11         | 0.12          |
|                                     | p | <b>0.0190</b>        | <b>0.0120</b>  | 0.2430        | 0.1685        |
| miR-874                             | r | <b>0.18</b>          | 0.09           | -0.12         | 0.01          |
|                                     | p | <b>0.0491</b>        | 0.3475         | 0.2125        | 0.9223        |
| miR-92a                             | r | 0.04                 | -0.01          | 0.04          | <b>-0.33</b>  |
|                                     | p | 0.6869               | 0.9369         | 0.6629        | <b>0.0002</b> |
| miR-26a                             | r | 0.08                 | 0.11           | -0.05         | <b>-0.26</b>  |
|                                     | p | 0.3960               | 0.2256         | 0.5906        | <b>0.0040</b> |
| miR-320b                            | r | 0.16                 | -0.02          | -0.15         | -0.16         |
|                                     | p | 0.0723               | 0.8615         | 0.0970        | 0.0837        |
| miR-99b                             | r | 0.18                 | 0.16           | 0.07          | <b>0.22</b>   |
|                                     | p | 0.0586               | 0.0909         | 0.4663        | <b>0.0195</b> |
| miR-125a                            | r | 0.08                 | 0.13           | -0.11         | 0.08          |
|                                     | p | 0.4277               | 0.1827         | 0.2726        | 0.4141        |

**Tabla 16. Correlación entre los niveles de expresión de miRNA y los niveles de quimioquinas en todos los individuos participantes del estudio.** La asociación lineal entre variables: expresión de miRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) y nivel de quimioquinas (pg/ml) se analizó, con independencia del cuadro clínico de los sujetos, mediante el coeficiente de correlación de Pearson (n=124); miR-99b y miR-125a (n=108).



## **5. DISCUSIÓN**



## **5.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO Y PLASMA DE PACIENTES CON SCASEST**

Gran número de estudios clínicos independientes y estudios básicos en modelos animales han descrito distintos patrones de expresión de miRNA en enfermedades cardiovasculares, reforzando su uso potencial como herramientas de diagnóstico y de valor pronóstico de enfermedades cardiovasculares (Devaux et al., 2012, Navickas et al., 2016, Oerlemans et al., 2012). Sin embargo, a pesar de la expectación inicial por el posible valor clínico de los miRNA, los metaanálisis realizados no proporcionan evidencias suficientes. Así, atendiendo a los resultados obtenidos hasta el momento, no se ha podido establecer que un determinado perfil de miRNA sea una herramienta más precisa que las detecciones bioquímicas e inmunoquímicas que actualmente se utilizan para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades cardiovasculares (Cao et al., 2015, Yan et al., 2017).

Entre los factores que podrían disminuir el poder de los metaanálisis se incluyen las diferencias en el tiempo de muestreo, la heterogeneidad de la población estudiada o la presencia de comorbilidades. Además de la variabilidad existente entre estudios, aún quedan problemas metodológicos que necesariamente deben superarse antes de poder introducir los miRNA en la clínica. Por ejemplo, los métodos para la normalización de los resultados de expresión de miRNA y su interacción con diferentes tratamientos farmacológicos siguen sin resolverse (Moldovan et al., 2014, Paiva and Agbulut, 2017). De hecho, las diferentes plataformas de análisis utilizadas para cuantificar la expresión de miRNA e identificar perfiles de expresión de miRNA circulantes pueden influir en gran medida en



## Discusión

los resultados (Moldovan et al., 2014). Por otra parte, existen estudios que han demostrado que la administración de heparina o ciertos fármacos pueden alterar las concentraciones de miRNA o influir en su cuantificación (Kaudewitz et al., 2013).

Uno de los objetivos de este estudio fue identificar si la elección del tipo de muestra podría ser una fuente de variación en el análisis del perfil de miRNA en el SCA, tal y como se ha determinado en otros estudios, en los que las diferencias en los procesos de recogida de muestra interfieren significativamente con la expresión de ácidos nucleicos, entre ellos los miRNA (Glinge et al., 2017). La utilización de diferentes tubos colectores de sangre ha mostrado concentraciones diferentes de miRNA circulantes, y cabe destacar que los tubos con heparina no son adecuados para su cuantificación (Glinge et al., 2017, Lam et al., 2004).

En este estudio hemos comparado la expresión de los miRNA más ampliamente descritos en relación con el SCA (miR-1, miR-21, miR-26a, miR-133a, miR-208b y miR-499a) en muestras pareadas de plasma y suero procedentes de pacientes SCASEST y la hemos comparado, además, con su expresión en muestras de voluntarios sanos. El estudio lo hemos llevado a cabo en suero y plasma en paralelo y al utilizar la misma metodología, hemos controlado otras posibles fuentes de variabilidad como 1) la población estudiada, ya que las muestras de suero y plasma fueron obtenidas a partir de los mismos pacientes, 2) los factores preanalíticos, como la recogida y procesamiento de las muestras en paralelo, 3) los factores analíticos, ya que utilizamos los mismos protocolos de extracción de miRNA, síntesis de cDNA y qPCR para ambos tipos de muestra y 4) el procedimiento de normalización, al utilizar el mismo miRNA (miR-484) como control endógeno.

La expresión de miR-208b, miR-499a y miR-1 fue prácticamente indetectable en todas las muestras analizadas mediante qRT-PCR por lo que fue necesaria la realización de una reacción de preamplificación tras la RT y previa a su detección y cuantificación mediante qRT-PCR. Hay varios estudios que también indican dificultades a la hora de analizar la expresión en determinadas muestras de algunos de estos miRNA altamente expresados en cardiomiocitos y/o músculo esquelético (Kuwabara et al., 2011, Oerlemans et al., 2012).

Los diferentes estudios publicados hasta el momento mantienen que, en situaciones de enfermedad cardiovascular como el SCA, tiene lugar un aumento de los niveles circulantes de miR-1, miR-208b, miR-499 y miR-133a (D'Alessandra et al., 2010, Gidlof et al., 2011, Kuwabara et al., 2011, Liu et al., 2015, Oerlemans et al., 2012, Wang et al., 2010a, Widera et al., 2011). Asimismo, se han detectado niveles elevados de miR-21 circulante en pacientes con SCA (Cheng and Zhang, 2010, Darabi et al., 2016, Oerlemans et al., 2012, Wang et al., 2014a, Zhang et al., 2016), mientras que se ha observado tanto una disminución (Hsu et al., 2014, Li et al., 2015a) como un aumento (Icli et al., 2014) en la expresión de miR-26a. Analizando la expresión de estos mismos miRNA mediante qRT-PCR en muestras de suero y plasma pareadas de pacientes con SCASEST, encontramos una heterogeneidad en el patrón de expresión entre ambos tipos de muestra para todos los miRNA estudiados. Detectamos un incremento de miR-1, miR-208b, y miR-499a en muestras SCASEST tanto de suero como de plasma, mientras que la expresión de miR-133a solo aumentó significativamente en suero de pacientes con SCASEST. Por el contrario, la expresión de miR-26a disminuyó tanto en muestras de suero como de plasma de pacientes SCASEST. Curiosamente, miR-21 mostró un patrón de expresión opuesto en SCASEST entre ambos tipos de muestra, aumentando en suero y disminuyendo en plasma de

## Discusión

pacientes con SCASEST. Además, se observaron diferencias significativas al comparar los coeficientes de variación entre las muestras de suero y plasma procedentes de pacientes con SCASEST y sujetos sanos, lo que indicó una importante variabilidad en la expresión de los miRNA.

Previamente descartamos que las diferencias en la concentración de miRNA entre suero y plasma pudiesen ser un factor determinante para la variación de los resultados. Al comparar las medias y varianzas de la fracción de miRNA entre muestras de suero y plasma, no detectamos diferencias significativas. Además, tanto las muestras de suero como las de plasma tenían una concentración de miRNA similar al comparar los grupos control y SCASEST entre sí, pero sin embargo, ambos tipos de muestra de pacientes con SCASEST mostraron una mayor concentración de miRNA en comparación con sus respectivos controles.

Uno de los problemas metodológicos a resolver a la hora de analizar la expresión de miRNA circulantes mediante qRT-PCR es la normalización de los resultados. Esta normalización corrige factores que podrían dar lugar a una cuantificación imprecisa, permitiendo la comparación directa entre resultados de diferentes tipos de muestra y estudios (Moldovan et al., 2014, Paiva and Agbulut, 2017). Hay una falta de consistencia en cuanto al procedimiento de normalización utilizado en este tipo de estudios. Hasta la fecha, se han utilizado varios miRNA, como miR-16 y U6 snRNA, como controles endógenos (Ai et al., 2010, D'Alessandra et al., 2013, Peng et al., 2014, Zile et al., 2011). En algunos estudios se utiliza como factor de normalización la media del valor de expresión de los miRNA comúnmente expresados en la muestra (Chen et al., 2015, Zampetaki et al., 2012). Otros estudios utilizan un miRNA externo sintético sin homología con miRNA endógenos como estrategia de normalización. Suelen ser miRNA de

*Caenorhabditis elegans* y se conocen como control *spike-in* (Gidlof et al., 2011, Liu et al., 2015, Widera et al., 2011). El procedimiento es la introducción de una concentración fija en la muestra de plasma o suero justo tras la desnaturalización química de las ribonucleasas endógenas al comienzo de la extracción de RNA. Sin embargo, esta estrategia tiene limitaciones, al no controlar las posibles variaciones previas en el manejo y/o almacenamiento de la muestra. Además, se ha demostrado que la hemólisis de las muestras puede influir en la estabilidad del *spike-in* (Koberle et al., 2013).

En este contexto, llevamos a cabo un análisis detallado para establecer un control endógeno adecuado para estudios de qRT-PCR tanto en muestras de suero como de plasma de pacientes SCASEST y controles sanos. Seleccionamos 8 miRNA (U6 snRNA, RNU44, RNU48, miR-191, miR-186, miR-192, miR-451 y miR-484) como candidatos a controles endógenos en base a la recomendación del fabricante de los ensayos TaqMan®. Para la mayoría de los candidatos, los niveles de expresión entre tipos de muestra (suero y plasma) y condiciones experimentales (sanos o SCASEST) fueron significativamente diferentes cuando se compararon las medias y coeficientes de variación. 4 controles endógenos (U6 snRNA, RNU44, RNU48 y miR-191) exhibieron diferencias significativas al comparar su expresión media en plasma y suero de controles y pacientes con SCASEST. Los otros 3 controles endógenos (miR-186, miR-192 y miR-451) no mostraron diferencias entre medias, pero observamos un coeficiente de variación entre muestras significativamente más elevado en la expresión de miR-186, miR-192, miR-451. miR-484 mostró un menor coeficiente de variación y no mostró diferencias significativas entre medias, por lo que lo utilizamos como control endógeno para este estudio. Otros estudios también han propuesto el miR-484 como gen de referencia candidato para estudios de miRNA

## Discusión

en suero y para normalizar la expresión de miRNA en la búsqueda de potenciales biomarcadores para cáncer (Hu et al., 2012).

El suero y el plasma son los tipos de muestra más frecuentemente utilizados en estudios de miRNA circulantes. Sin embargo, dada su diferente composición, los resultados no deberían ser directamente comparables (Wang et al., 2012). Suero y plasma provienen de sangre total que ha sido sometida a diferentes procesos bioquímicos en el laboratorio. La diferencia fundamental entre plasma y suero es la respectiva presencia y ausencia de fibrinógeno y factores de coagulación. El suero se obtiene a partir de la sangre después de la formación de coágulos de fibrina, mientras que para obtener plasma se añade un anticoagulante antes de la separación de las células sanguíneas. Por lo tanto, el suero carece de los factores de coagulación que sí están presentes en el plasma. Estas diferencias en los procedimientos de extracción de sangre afectan al proceso de coagulación y puede influenciar el perfil bioquímico. El diferente tiempo de procesamiento necesario para la coagulación en las muestras de suero también es un factor limitante.

Algunos estudios han propuesto que suero y plasma exhiben algunas diferencias en su contenido de miRNA (Wang et al., 2012). Por el contrario, otros han encontrado ninguna o pequeñas diferencias en la cuantificación de determinados miRNA extracelulares al comparar estos dos fluidos biológicos (D'Alessandra et al., 2010, Kroh et al., 2010, Mitchell et al., 2008). Las diferencias en la concentración de miRNA entre suero y plasma se pueden atribuir a la hemólisis (Blondal et al., 2013, Kirschner et al., 2013, Kirschner et al., 2011, McDonald et al., 2011) y la contaminación con plaquetas (Willeit et al., 2013). Las plaquetas contienen un amplio espectro de miRNA que, al igual que ocurre con miRNA procedentes de eritrocitos y leucocitos (Wang et al., 2012), pueden ser liberados en el suero durante la coagulación. Por

ejemplo, la eliminación de plaquetas mediante centrifugación de alta velocidad puede influir en los resultados del perfil de miRNA en comparación con muestras en las que las plaquetas no han sido retiradas (Page et al., 2013). Las plaquetas son el segundo tipo celular más abundante en la sangre (Willeit et al., 2013) y, aunque su contenido de miRNA es bajo en comparación con otras células, contribuyen notablemente al contenido de miRNA circulante (Willeit et al., 2013). Además, las plaquetas liberan micropartículas al activarse (Willeit et al., 2013). Por ello, la terapia antiplaquetaria, comúnmente utilizada en pacientes con IAMCEST y SCASEST, también se ha descrito como un factor de variabilidad (de Boer et al., 2013, Willeit et al., 2013). Por lo tanto, la selección del tipo de muestra debería tenerse en consideración en estudios como el realizado en la cohorte de Bruneck, centrado en los miRNA asociados a plaquetas, como miR-126, miR-223 y miR-197 (Zampetaki et al., 2012).

Otro factor que puede contribuir a las diferencias entre suero y plasma es la presencia de inhibidores de la qRT-PCR, como sucede con la heparina (Kaudewitz et al., 2013). Además, también se ha demostrado que otros fármacos como las estatinas (Li et al., 2015b) y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Weber et al., 2011) pueden tener efecto sobre la expresión de miRNA circulantes.

En nuestro análisis, el suero mostró una mayor sensibilidad y una menor variabilidad para la mayor parte de los miRNA estudiados. La razón subyacente a la influencia del plasma sobre la expresión de miRNA no está clara, pero la presencia de un gel separador en los tubos, diseñados para el procesado del suero, podría dar lugar a una contaminación hemolítica diferencial entre muestras de suero y plasma. Además, el EDTA es un importante quelante que podría interferir con la reacción de PCR (Leidinger et al., 2015). Podría actuar

## Discusión

como quelante del cloruro de magnesio, una importante fuente de ión magnesio utilizado en la reacción de PCR, que puede influir en la temperatura de hibridación de los cebadores, la especificidad y el rendimiento del producto de PCR (Schrader et al., 2012). Aunque los diferentes pasos del protocolo de extracción de RNA normalmente dan lugar a la eliminación de la mayor parte de EDTA en la muestra, algún resto podría convertirse en un problema si los miRNA se presentan en bajas concentraciones o si los cebadores tienen una relativamente baja sensibilidad y especificidad.

En resumen, los resultados de este estudio indican que el tipo de muestra a partir de sangre total, suero o plasma, es una fuente de variación e influencia el análisis de la expresión de miRNA circulantes en SCA. Por tanto, estos resultados resaltan la importancia de la estandarización del tipo de muestra previa a la determinación de potenciales biomarcadores basados en miRNA circulantes y la comparación de resultados entre estudios. Además, los resultados sugieren que el suero podría ser el tipo de muestra adecuado para llevar a cabo estudios de miRNA circulantes debido a su mayor sensibilidad y la menor variabilidad que presenta. También proponemos el miR-484 como posible gen de referencia para estudios de miRNA circulantes en enfermedades cardiovasculares.

## **5.2. ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE miRNA EN SUERO DE PACIENTES CON SCASEST EN LA MANIFESTACIÓN AGUDA Y TRAS UN AÑO DE EVOLUCIÓN CLÍNICA**

Como se ha indicado anteriormente, todavía existen desafíos metodológicos para el análisis de miRNA circulantes, pero varios estudios han demostrado diferentes perfiles de expresión de miRNA circulantes en determinados estados fisiopatológicos. Especialmente han sugerido su potencial uso como biomarcadores de SCA tanto en su diagnóstico como en su pronóstico, así como en la predicción de riesgo de eventos cardiovasculares adversos tras padecer un infarto.

El uso de los miRNA circulantes como biomarcadores de diagnóstico se ha puesto de relieve en diferentes estudios en los que la combinación de la medida de determinados miRNA junto con los biomarcadores actualmente utilizados, como las cTnT de alta sensibilidad (hs-cTnT), podría contribuir a una detección más eficiente y precisa de los casos de SCA. Por ejemplo, Oerlemans et al. han demostrado que la medida de la expresión de miR-1, miR-499 y miR-21 al combinarse con los valores de hs-cTnT, incrementa significativamente su valor diagnóstico en los pacientes con SCA (Oerlemans et al., 2012). Resulta interesante destacar que la combinación de estos tres miRNA tiene como resultado un valor diagnóstico independiente incluso mayor que el de la propia hs-cTnT (Oerlemans et al., 2012). El valor diagnóstico de miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-208b, también se ha demostrado en una gran cohorte de pacientes con SCA, cuya expresión independiente se ha asociado con los niveles de hs-cTnT (Widera et al., 2011). Un reciente metaanálisis ha mostrado que el valor de la medida de estos miRNA circulantes altamente expresados en miocardio, como prueba



## Discusión

independiente para el diagnóstico del SCA, es comparable al de los inmunoensayos comerciales para la medida de hs-cTnT (Lippi et al., 2013).

Los pacientes que experimentan un primer SCA tienen un alto riesgo de sufrir eventos cardiovasculares futuros. El *Global Registry of Acute Coronary Events* (GRACE) es un modelo cuantitativo que determina el riesgo de padecer eventos cardiovasculares adversos tras un primer SCA (Steg et al., 2002, Tang et al., 2007). Diferentes estudios han indicado que los miRNA, aparte de diagnóstico, también podrían servir como marcadores de pronóstico de eventos cardiovasculares adversos. Widera et al. han demostrado una asociación significativa de miR-133a y miR-208b con el riesgo de muerte dentro de los 6 meses después de sufrir un SCA (Widera et al., 2011). Los niveles de miR-133a muestran una correlación significativa con los parámetros de resonancia magnética cardiovascular utilizados como marcadores de pronóstico, incluyendo el tamaño del infarto y la obstrucción microvascular (Eitel et al., 2012). Además, se ha observado que los principales eventos cardiovasculares adversos ocurren más a menudo en los pacientes con niveles elevados de miR-133a con respecto a la media del grupo (Eitel et al., 2012). En otro estudio, los niveles de miR-208b y miR-499 se correlacionan significativamente con la disfunción ventricular izquierda (Devaux et al., 2012).

Además de su potencial uso como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, los miRNA también se han propuesto como posibles biomarcadores de predicción de riesgo de desarrollar un SCA. En la actualidad, no se dispone de biomarcadores solubles que puedan ser utilizados para predecir con certeza qué pacientes están en riesgo de desarrollar un SCA. El estudio Bruneck es el primer estudio prospectivo que relaciona los miRNA circulantes y el riesgo de padecer

infarto (Zampetaki et al., 2012) mostrando que los miRNA circulantes miR-126, miR-223 y miR-197 podrían ser utilizados para identificar pacientes en riesgo de desarrollar SCA. Los autores indican que la combinación de la expresión de estos 3 miRNA mejora la puntuación de riesgo de Framingham para el SCA, el cual se basa en los factores de riesgo cardiovascular clásicamente establecidos (Kannel et al., 1961).

Por tanto, el uso potencial de los miRNA como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y predicción en el contexto del SCA es indiscutible. Sin embargo, gran parte de los estudios publicados hasta el momento se han realizado en pacientes con SCA sin tener en cuenta sus diferentes categorías. Por lo tanto, no hay tantos estudios que comparen la expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCASEST e IAMCEST, y todavía menos que analicen la expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCASEST, pudiendo contribuir de esta manera a la diferenciación entre los diferentes síndromes. Hay evidencias de que los miRNA pueden ser de utilidad para un diagnóstico más temprano y preciso de los pacientes con SCA, lo que sería particularmente interesante en los pacientes con SCASEST (angina inestable e IAMSEST) en quienes la incertidumbre a la hora de diagnosticarlos es elevada.

Un objetivo de este estudio fue analizar el perfil de expresión de miRNA en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y después de un año de evolución clínica, con el fin de identificar potenciales biomarcadores para su diagnóstico. El análisis inicial mediante *arrays* TaqMan®, mostró una expresión alterada de miRNA en suero de pacientes con SCASEST tanto en su manifestación aguda como tras un año desde la ICP. Predominó una disminución de los

## Discusión

niveles de expresión de miRNA en el momento del infarto, la cual no se manifestó al año de evolución.

Como se ha indicado anteriormente, el reservorio de miRNA circulantes se compone de miRNA asociados a vesículas extracelulares, así como miRNA unidos a proteínas, que pueden originarse a partir de diferentes tipos celulares. Todos los tipos celulares producen miRNA y a su vez, el mismo miRNA puede derivarse de una variedad de tipos celulares: células endoteliales, monocitos y macrófagos, células de músculo liso vascular y plaquetas, y ser secretados a la circulación en algún momento. Aunque la asociación de miRNA con vesículas extracelulares ha recibido la mayor atención por parte de la investigación, alrededor del 90% de los miRNA circulantes se han encontrado asociados con proteínas fuera de vesículas, subrayando la importancia de las proteínas de unión a RNA en estabilizar, proteger y transferir miRNA (Fritz et al., 2016).

Los estudios publicados hasta el momento muestran un aumento de la expresión de los miRNA específicos de miocardio y/o altamente expresados en músculo esquelético en el SCA, como resultado de la necrosis de cardiomiocitos y liberación de estos miRNA a la circulación. Se ha sugerido que el aumento de la secreción de vesículas extracelulares por cardiomiocitos refleja una respuesta adaptativa, señalizando al resto de células el daño cardíaco (Chistiakov et al., 2016).

Los miRNA descritos como específicos de miocardio y/o altamente expresados en músculo esquelético exhiben en general propiedades antiapoptóticas, antifibróticas y antioxidantes (Castoldi et al., 2012, He et al., 2011, Izarra et al., 2014, Li et al., 2013, Wang et al., 2014b). Por lo tanto, la secreción de estos miRNA mediante vesículas extracelulares tras el SCA podría ser esencial para la

cardioprotección y la inducción de la reparación del tejido cardiaco (Chistiakov et al., 2016). En nuestro estudio mediante *arrays*, no detectamos el aumento de ninguno de los miRNA altamente expresados en miocardio descritos como potenciales biomarcadores de SCA. Sin embargo, al analizar su expresión en las muestras de pacientes con SCASEST de toda la población de estudio para el análisis comparativo entre suero y plasma, comprobamos un aumento de su expresión en la manifestación aguda del SCA.

Durante el infarto tiene lugar una activación del endotelio, por lo que se podría esperar que esta activación endotelial diese lugar a una secreción de vesículas extracelulares (Martinez et al., 2011), elevando de esta forma los niveles de miRNA circulantes. Además, algunos estudios sugieren una mayor expresión de micropartículas endoteliales en pacientes con infarto que en sujetos sanos (Berezin et al., 2015).

En base a lo expuesto anteriormente, el predominio de la disminución de la expresión que mostraron los resultados mediante *arrays* en suero de pacientes con SCA en su manifestación aguda, podría resultar contradictorio. Sin embargo, se ha demostrado que la transferencia de miRNA mediante vesículas extracelulares tiene un papel en el SCA, siendo mediada a través de interacciones entre diferentes tipos celulares del sistema cardiovascular (Das and Halushka, 2015). Además, la transferencia de miRNA mediante vesículas extracelulares tiene funciones cardioprotectoras en situaciones de isquemia (Yu et al., 2013). Hay estudios experimentales que demuestran que los miRNA pueden ser secretados por cuerpos apoptóticos y captados por la zona donde se encuentra la lesión aterosclerótica (Zernecke et al., 2009). Concretamente Zernecke et al. estudia el papel de los miRNA encapsulados en cuerpos apoptóticos procedentes de células endoteliales sobre la actividad de las células endoteliales adyacentes. Se ha demostrado que los cuerpos

## Discusión

apoptóticos están enriquecidos con miR-126, un miRNA altamente expresado en endotelio, cuya transferencia da lugar a niveles incrementados de miR-126 en las células receptoras, donde además media efectos ateroprotectores (Zernecke et al., 2009).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, De Rosa et al. han cuantificado los gradientes de concentración de miRNA a lo largo de la circulación coronaria en pacientes con SCA, demostrando un incremento significativo de los niveles de miRNA altamente expresados en miocardio: miR-499 y miR-133a y, por el contrario, una disminución del miRNA endotelial miR-126 (De Rosa et al., 2011). Sugieren así que los miRNA altamente expresados en miocardio son liberados en respuesta al daño cardíaco, mientras que el miR-126 vascular es captado durante su paso por la circulación coronaria. De igual forma, Fichtlscherer et al. sugieren que los miRNA cuya expresión se encuentra disminuida en la circulación podría ser resultado de su captación por las lesiones ateroscleróticas o por la vasculatura, mientras que los miRNA circulantes elevados podría reflejar daño miocárdico (Fichtlscherer et al., 2010).

Además de la transferencia de miRNA entre diferentes tipos celulares de forma paracrina, se ha demostrado su función biológica en la célula receptora. Wang et al. han demostrado que exosomas aislados de cardiomiocitos pueden ser captados por células endoteliales, donde modulan la angiogénesis. La expresión de miR-320 se encuentra elevada en esos exosomas, dando lugar a un incremento de los niveles de miR-320 en células endoteliales y una reducción de los niveles de diferentes proteínas angiogénicas (Wang et al., 2014d). El miR-320b fue el miRNA que, en nuestro estudio mediante *arrays*, mostró un mayor aumento en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda, siendo comprobada su expresión en pacientes con SCASEST de la población de estudio

posteriormente. Este resultado podría sugerir su liberación a partir de cardiomiocitos en el momento del infarto, pudiendo ejercer una función en las células endoteliales del tejido miocárdico dañado.

Los niveles de miRNA circulantes pueden estar también afectados por otros parámetros como la estabilidad de los miRNA en la circulación. Por tanto, desde otra perspectiva, el predominio de la disminución de la expresión de miRNA circulantes que se detectó en la manifestación aguda del SCASEST, podría estar relacionado con el diferente grado de degradación según los mecanismos de transporte de determinados miRNA. El daño cardiaco incrementa la secreción de proteinasas y RNAsas a la circulación que podría dar lugar a la degradación de las proteínas que sirven como transportadores de los miRNA, dando como resultado una reducción de sus niveles (De Rosa et al., 2011). Por lo tanto, es posible que los miRNA unidos a proteínas sean degradados en la manifestación aguda del SCA, mientras que no ocurra lo mismo con miRNA embebidos en microvesículas. Atendiendo a que varios estudios indican la posible existencia de un mecanismo específico de selección y empaquetado de miRNA (Fritz et al., 2016), este mecanismo podría relacionarse con una posible función biológica de los miRNA circulantes encapsulados en vesículas extracelulares.

En concordancia con nuestros resultados, un estudio ha evaluado los niveles de miRNA circulantes en plasma de pacientes con IAMCEST observando que la mayoría disminuyen en comparación con controles (Parahuleva et al., 2017). Curiosamente, la mayoría de los miRNA circulantes disminuidos en pacientes con IAMCEST se expresan en la pared vascular, particularmente en las células endoteliales, incluyendo miR-92a y miembros de la familia let-7 (Parahuleva et al., 2017). Por el contrario, han detectado un aumento de los miRNA específicos de miocardio y/o de músculo esquelético (Parahuleva et al., 2017).

## Discusión

Atendiendo a nuestros resultados obtenidos mediante *arrays*, y en concordancia con éste último estudio, dos miembros de la familia *let-7*, *let-7e* y *let-7g*, y *miR-92a* mostraron una disminución de su expresión en la manifestación aguda del SCA y se seleccionaron como miRNA relacionados con la manifestación aguda del SCASEST. Sin embargo, la comprobación de la expresión de estos miRNA en todos los pacientes con SCASEST de la población de estudio mostró que solamente *let-7e* disminuyó significativamente en la manifestación aguda del SCASEST. Sorprendentemente, *miR-92a* mostró un patrón de expresión opuesto, aumentando significativamente en pacientes con SCA.

En conjunto, los resultados del perfil de expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCASEST mostraron un predominio de la disminución de la expresión de miRNA en el momento agudo del SCA. Estos resultados podrían sugerir la expresión en la pared vascular de gran parte de los miRNA desregulados en SCASEST. Es posible que estos miRNA sean específicamente seleccionados y empaquetados en vesículas extracelulares, siendo captados por el tejido miocárdico dañado y relacionándose a su vez con una posible función biológica. Por otro lado, el predominio de la disminución de la expresión de miRNA en la manifestación aguda del SCASEST también podría sugerir que su transporte en la circulación tenga lugar principalmente mediante unión a proteínas. Esto podría resultar en una mayor degradación debida a la liberación de proteinasas y RNAsas derivada del daño cardíaco.

Como se ha indicado anteriormente, el siguiente objetivo de este estudio fue seleccionar, en base a los resultados mediante *arrays*, los miRNA relacionados con la manifestación aguda del SCA. Para ello, se seleccionaron aquellos miRNA desregulados en el momento agudo del SCA y cuya expresión revertía a niveles control tras un año de

evolución clínica. De los 10 miRNA seleccionados mediante *arrays*, 3 miRNA mostraron una expresión aumentada en la manifestación aguda del SCA (miR-130b, miR-874, miR-320b), mientras que 7 miRNA disminuyeron (let-7e, let-7g, miR-28, miR-328, miR-523, miR-92a y miR-26a).

Posteriormente, se comprobó la expresión de estos miRNA seleccionados en todos los individuos de la población de estudio mediante qRT-PCR. Sin embargo, como se acaba de comentar anteriormente, el patrón de expresión obtenido mediante *arrays* no se validó en su totalidad en la población de estudio.

En el análisis comparativo entre el grupo control y el grupo SCASEST de la población de estudio, 6 de los 10 miRNA analizados mostraron una diferencia de expresión similar a la observada mediante *arrays*: let-7e, miR-130b, miR-523, miR-874, miR-26a y miR-320b. Por el contrario, no se observaron diferencias en la expresión de let-7g y miR-328, mientras que sorprendentemente, miR-28 y miR-92a mostraron un patrón de expresión opuesto a los resultados observados mediante *arrays*.

Por otro lado, en el análisis comparativo entre el grupo SCASEST y tras un año de evolución clínica en la población de estudio, los resultados concordaron en muy baja medida con los obtenidos mediante *arrays*. Solamente la expresión de let-7e y miR-26a, que disminuyó en la manifestación aguda del SCA, se restableció a niveles control tras un año de evolución.

Varias plataformas se utilizan actualmente como análisis inicial para la detección y cuantificación de miRNA, como microarrays, secuenciación de RNA (RNA-seq, del inglés *RNA sequencing*) y qRT-PCR. Entre ellas, la qRT-PCR es el método de cuantificación relativa con mayor sensibilidad, tratándose de la técnica más comúnmente



## Discusión

utilizada. Sin embargo, tiene limitaciones como la normalización de los valores de expresión entre otras, comentadas en el apartado anterior. Los *arrays* TaqMan® de baja densidad utilizados en este estudio son una forma de escalar el método de cuantificación mediante qRT-PCR para el análisis simultáneo del perfil de expresión de miRNA en una muestra determinada. Son placas de qRT-PCR que se han utilizado en diferentes estudios de miRNA circulantes (Li et al., 2017, Zampetaki et al., 2012), diseñadas para llevar a cabo cientos de reacciones de qRT-PCR para la determinación de la expresión de diferentes miRNA de forma paralela y utilizando las mismas condiciones de reacción. Debido a que pueden albergar volúmenes de muestra relativamente grandes, son adecuadas para llevar a cabo el análisis del perfil de expresión en muestras con muy baja concentración de miRNA, como el suero.

Con respecto a nuestros resultados, a pesar de que los *arrays* TaqMan® se basan en la reacción de qRT-PCR y disponían de las mismas sondas que se utilizaron posteriormente para el análisis de la expresión mediante qRT-PCR en la población de estudio, se encontró una variabilidad considerable en los resultados. Una de las posibles causas podría ser debida al diferente tamaño muestral entre el análisis inicial del perfil de expresión mediante *arrays* y el posterior análisis en la totalidad de la población de estudio.

Otra posible fuente de la variabilidad observada en los resultados de este estudio, deriva de la realización de una reacción de preamplificación como paso posterior a la RT y previo a la PCR, al analizar el perfil de expresión mediante *arrays* Taqman®. Se trata de una preamplificación aconsejada por el fabricante para todas las muestras, pero especialmente para aquellas con una baja concentración de miRNA, como es el caso del suero. A pesar de lo descrito, las placas microfluídicas de los *arrays* TaqMan® permiten la

evaluación de centenares de miRNA a partir de una misma muestra. Al tratarse de placas de qRT-PCR, son las plataformas con mayor sensibilidad en comparación con los microarrays, y más económicas que RNA-seq, además de que no necesitan una infraestructura computacional para el análisis de los resultados (Chen et al., 2009, Pritchard et al., 2012).

Dentro del contexto de la identificación de nuevos biomarcadores del SCA, algunos estudios han detectado diferencias en la expresión de miRNA entre los diferentes síndromes, contribuyendo así a la posible diferenciación de pacientes con IAMSEST e IAMCEST (Devaux et al., 2012, Ward et al., 2013, Widera et al., 2011, Zhang et al., 2015b). Devaux et al. han detectado una concentración significativamente más elevada de los miRNA específicos de miocardio miR-208b y miR-499 en plasma de pacientes IAMCEST que IAMSEST. Además, ambos miRNA correlacionan con los niveles de creatina kinasa y cTnT (Devaux et al., 2012).

De igual forma, los niveles de miR-92a y miR-30d aumentan en plasma de pacientes con IAMSEST en comparación con plasma de pacientes con IAMCEST, mientras que disminuyen los de miR-25 y miR-221 (Ward et al., 2013). Los resultados de expresión de miRNA en nuestra población de estudio también mostraron un incremento de miR-92a circulante en pacientes con SCASEST en comparación con sujetos sanos, lo que refuerza su valor como posible biomarcador de diagnóstico de pacientes con SCASEST.

Otra serie de estudios han analizado la expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCASEST, incluso contribuyendo a la diferenciación entre ambos tipos: IAMSEST y angina inestable. (Kuwabara et al., 2011, Oerlemans et al., 2012, Olivieri et al., 2013, Shalaby et al., 2016, Zong et al., 2016). En concordancia con los

## Discusión

resultados de nuestro estudio, Oerlemans et al. han indicado una expresión elevada de miR-1, miR-499, miR-21, miR-208a en suero de pacientes SCASEST comparados con controles (Oerlemans et al., 2012). Con respecto al miR-208a, en nuestro estudio cuantificamos la expresión de miR-208b, ambos componentes de la misma familia de miRNA.

En el estudio de Oerlemans et al. dividen posteriormente los pacientes SCASEST en pacientes con angina inestable e IAMSEST y los comparan por separado con respecto a sujetos sanos, encontrando de la misma forma un incremento para todos los miRNA indicados en el párrafo anterior excepto para miR-208a, que solo incrementó en pacientes con IAMSEST (Oerlemans et al., 2012). Estos resultados sugieren que miR-208a podría considerarse como un posible biomarcador de diagnóstico de los pacientes con IAMSEST.

Otro estudio también muestra niveles circulantes más elevados de los miRNA altamente expresados en miocardio miR-1, miR-133a y miR-208b en pacientes con IAMSEST e IAMCEST en comparación con pacientes que sufren angina inestable. Sin embargo, los 3 miRNA muestran un considerable solapamiento en su perfil de expresión teniendo en cuenta las diferentes categorías de SCA, lo que indica un valor limitado de esos 3 miRNA para la discriminación de los pacientes con angina inestable (Widera et al., 2011).

Shalaby et al. muestra una asociación entre los niveles en suero de miR-499 y miR-210 con el diagnóstico de pacientes SCASEST (Shalaby et al., 2016). Por otro lado, en comparación con sujetos sanos, Kuwabara et al. demuestra que los niveles en suero de miR-1 y miR-133a incrementaron significativamente tanto en pacientes con IAMCEST como con angina inestable (Kuwabara et al., 2011).

En conjunto, estos resultados muestran que los miRNA circulantes específicos de miocardio y altamente expresados en músculo esquelético aumentan en las tres categorías de SCA, sugiriendo su posible uso como biomarcadores de pacientes con SCASEST.

Además de los miRNA altamente expresados en miocardio, en el estudio de Oerlemans et al. indicado anteriormente, también se detecta un aumento de la expresión de miR-146a en pacientes con IAMSEST y curiosamente, sus niveles disminuyen en pacientes con angina inestable al compararse frente al conjunto de pacientes con SCASEST. Esto sugiere que miR-146a podría ser de ayuda en la discriminación de pacientes con angina inestable (Oerlemans et al., 2012). Sin embargo, en nuestro estudio no se detectó ningún cambio en la expresión de miR-146a en pacientes con SCASEST.

Existe algún estudio de asociación de niveles de miRNA circulantes con diferentes rasgos relacionados con el riesgo de padecer eventos cardiovasculares adversos en pacientes SCASEST (Wang et al., 2017a). Los niveles de miR-28-3p en sangre total se correlacionan positivamente con el GRACE *risk score*, el modelo de cálculo utilizado para predecir eventos cardiovasculares adversos en pacientes con SCA (Brieger et al., 2009), sugiriendo el posible uso de miR-28-3p como biomarcador de SCASEST (Wang et al., 2017a). Esto concuerda con nuestros resultados, donde encontramos niveles elevados de miR-28 en pacientes con SCASEST en relación a controles, lo que añade valor a su posible utilización como biomarcador de SCASEST.

## Discusión

Con excepción de los miRNA altamente expresados en miocardio, miR-92a y miR-28, el resto de miRNA seleccionados en nuestro estudio no se han propuesto como posibles biomarcadores de SCASEST en ninguno de los trabajos publicados hasta el momento.

Como se ha indicado anteriormente, los miRNA regulan varios procesos fisiológicos implicados en las enfermedades cardiovasculares, como el mantenimiento del tono vascular, la inflamación y la angiogénesis. Así, se han visto involucrados en el daño vascular, la hipertrofia cardíaca y la isquemia miocárdica (Callis et al., 2009, Icli et al., 2013, Montgomery et al., 2011, Roy et al., 2009, Thum et al., 2008, van Rooij and Olson, 2007). Además, se ha demostrado que pueden ser transferidos mediante microvesículas extracelulares, participando en la comunicación intercelular (Hergenreider et al., 2012, Zerneck et al., 2009). Sin embargo, la función biológica de los miRNA circulantes y, por tanto, de los miRNA desregulados en las enfermedades cardiovasculares sigue sin conocerse.

En la presente tesis se analiza la expresión de miRNA circulantes en pacientes con SCASEST, por lo que no hemos estudiado su posible función e implicación biológica (con la excepción del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a). Es por ello que simplemente podemos sugerir su función potencial atendiendo a los resultados publicados hasta el momento.

La expresión de miR-130b, miR-874 y miR-320b aumentó significativamente en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda, aunque no observamos su disminución hasta niveles control al año de la ICP en la población estudiada. Entre ellos, miR-874 y miR-320 se han relacionado con la regulación del daño cardíaco por isquemia-reperfusión (Chen et al., 2018, Ren et al., 2009, Wang et al., 2013b).

Los niveles de miR-874 aumentan en tejido miocárdico en respuesta a daño por isquemia-reperfusión en un modelo de ratón (Chen et al., 2018, Wang et al., 2013b), cuya inhibición ejerce un papel protector atenuando la apoptosis y necrosis de cardiomiocitos (Chen et al., 2018, Wang et al., 2013b). Se ha detectado asimismo un aumento de miR-874 en tejido miocárdico en un modelo porcino de microembolización coronaria (Su et al., 2017). Por lo tanto, el aumento de la expresión de miR-874 que detectamos en suero de pacientes con SCASEST podría sugerir un incremento de su expresión en el tejido miocárdico dañado y una mayor liberación al torrente sanguíneo, pudiendo ejercer funciones cardioprotectoras.

Ren et al. demuestran que el miR-320 disminuye en tejido miocárdico de ratones como resultado de la isquemia-reperfusión (Ren et al., 2009). Su sobreexpresión en cardiomiocitos da lugar a un incremento de la apoptosis y del tamaño del infarto tras la isquemia-reperfusión tanto *in vivo* como *in vitro* (Ren et al., 2009), mientras que el tratamiento con antagomir-320 *in vivo* reduce la apoptosis de cardiomiocitos (Song et al., 2016) y el tamaño del infarto (Ren et al., 2009). Además, como se indicó anteriormente, Wang et al. han demostrado que cardiomiocitos en co-cultivo con células endoteliales, provocan efectos antiangiogénicos a través de la transferencia de miR-320 mediante exosomas (Wang et al., 2014d).

Por el contrario, miR-320b se ha relacionado con efectos cardioprotectores en otro estudio, al estar inducido por preconditionamiento y poscondicionamiento (Varga et al., 2014). Asimismo, se ha demostrado que la activación de las plaquetas que ocurre durante el SCA, da lugar a la liberación de una serie de miRNA, entre ellos el miR-320b, mediante micropartículas (Gidlof et al., 2013). El miR-320b es captado por las células endoteliales donde regula la

## Discusión

expresión génica de su diana ICAM-1, provocando su disminución (Gidlof et al., 2013).

Por lo tanto, atendiendo a todos estos resultados publicados, la posible función del aumento de miR-320b no está clara, pudiendo relacionarse tanto con efectos protectores como perjudiciales.

En cuanto al miR-130b, cuya expresión aumentó en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda, hay varios trabajos que demuestran su implicación en la progresión de diferentes tipos de cáncer, pero no hay nada publicado en relación con la isquemia miocárdica hasta el momento. Sin embargo, se ha relacionado con la atenuación de la inflamación vascular (Wang et al., 2017b). La estimulación de HUVEC con lipopolisacárido induce una disminución de la expresión de miR-130b. Por el contrario, la sobreexpresión de miR-130b en HUVEC reduce significativamente los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$  y E-selectina, lo que sugiere un posible papel protector en la inflamación endotelial (Wang et al., 2017b).

La angiogénesis, la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes, es un evento importante durante el crecimiento, desarrollo y la reparación de tejidos. Una angiogénesis alterada se ha visto implicada en varias enfermedades como en la isquemia miocárdica. Aunque se ha demostrado que varios miRNA regulan la angiogénesis de tumores, su papel en la respuesta angiogénica tras la isquemia miocárdica es menos conocida.

Un miRNA relacionado con la angiogénesis es el miR-92a, un componente del *cluster* miR-17/92 altamente expresado en células endoteliales humanas (Bonauer et al., 2009). Su expresión aumentó en pacientes con SCASEST en su manifestación aguda, mientras que no revirtió hasta niveles control tras un año de evolución clínica. En concordancia con nuestros resultados, Zhang et al. han demostrado un

nivel más elevado de micropartículas endoteliales en pacientes con SCA junto con una mayor expresión de miR-92a en plasma, mostrando una correlación positiva (Zhang et al., 2017). Se ha observado que el miR-92a es también transportado por HDL, estando incrementado en pacientes con SCA (Michell and Vickers, 2016).

Por otro lado, en un modelo murino de isquemia en miembro inferior y en otro de infarto, se observa un incremento de la expresión de miR-92a en músculo esquelético y en tejido miocárdico infartado, respectivamente (Bonauer et al., 2009). La administración sistémica de antagomir-92a da lugar a una disminución de la necrosis, así como a un incremento de la angiogénesis, aumentando como resultado la recuperación funcional del tejido dañado (Bonauer et al., 2009).

Por el contrario, la sobreexpresión de miR-92a en células endoteliales bloquea la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Bonauer et al., 2009). De igual forma, en un modelo porcino de isquemia-reperfusión, la administración localizada de inhibidores de miR-92a (Hinkel et al., 2013), así como la administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado en microesferas (Bellera et al., 2014), disminuye la apoptosis y el tamaño del infarto. Asimismo, reduce la pérdida de función tras la isquemia incrementando la angiogénesis (Bellera et al., 2014, Hinkel et al., 2013). Por lo tanto, la inhibición de miR-92a se ha sugerido como nueva herramienta terapéutica para preservar la función cardíaca tras isquemia (Bellera et al., 2014, Hinkel et al., 2013), sugiriendo un posible efecto perjudicial del aumento de miR-92a circulante que se detectó en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda.

Por otro lado, los miRNA disminuidos en nuestro estudio mediante *arrays* y cuya expresión se comprobó en la población de estudio, incluyeron let-7e, miR-523 y el miR-26a. De ellos, la expresión



## Discusión

de let-7e y miR-26a revirtió hasta niveles control tras un año de evolución clínica, reforzando su posible implicación en la manifestación aguda del SCASEST. Además, el miR-26a fue uno de los potenciales biomarcadores de infarto descritos, cuya expresión se cuantificó previamente para el análisis comparativo de la expresión de miRNA entre muestras de suero y plasma.

El miR-26a es un miRNA altamente expresado en el endotelio vascular, siendo un regulador importante de la angiogénesis patológica y fisiológica (Icli et al., 2014). Una creciente evidencia respalda el papel de la familia miR-26 en la enfermedad cardiovascular, regulando importantes procesos como la isquemia miocárdica, la hipertrofia cardíaca y la fibrilación auricular (Icli et al., 2014).

De forma contraria a lo observado en nuestros resultados, se ha demostrado un aumento de los niveles circulantes de miR-26a en pacientes con SCA, así como en un modelo murino de infarto (Icli et al., 2013). Además, su sobreexpresión en HUVEC da lugar a la inhibición de la angiogénesis (Icli et al., 2013). Sin embargo, otros estudios han descrito, en concordancia con nuestros resultados, una disminución de los niveles de miR-26a en plasma (Li et al., 2015a) y suero (Hsu et al., 2014) de pacientes con SCA.

El miR-26a se ha implicado también en la fisiopatología de la aterosclerosis. Así, en ratones deficientes para ApoE, alimentados con una dieta alta en grasas, la expresión de miR-26a disminuye en el endotelio del arco aórtico (lugar preferente para la formación de aterosclerosis). Asimismo, se ha demostrado el papel de miR-26a en la apoptosis de células endoteliales (Zhang et al., 2015d). El tratamiento de células endoteliales de aorta humana con oxLDL da lugar a la disminución de la expresión de miR-26a, mientras que su sobreexpresión previno la apoptosis endotelial (Zhang et al., 2015d).

Además, miR-26a es uno de los miRNA propuestos en el estudio *HUNT* como biomarcador para la predicción de riesgo de SCA en sujetos sanos (Bye et al., 2016).

En conjunto, la posible función de la disminución que observamos en la expresión de miR-26a circulante en pacientes con SCASEST no está clara, aunque podría tener una implicación en la regulación de la apoptosis endotelial y la angiogénesis tras la isquemia miocárdica.

Se ha descrito que la familia de miRNA let-7, altamente expresada en endotelio (Kuehbacher et al., 2007), ejerce un papel fundamental en la proliferación celular, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Bao et al., 2013). Se ha demostrado que let-7g previene la aterosclerosis reduciendo los niveles de su diana LOX-1, el receptor de ox-LDL (Chen et al., 2011, Liu et al., 2017). Además, let-7g inhibe la apoptosis inducida por ox-LDL en células endoteliales (Zhang et al., 2013). A su vez, ox-LDL reduce la expresión de let-7g induciendo la proliferación y migración de células de músculo liso (Chen et al., 2011). Niveles reducidos de let-7g pueden incrementar la inflamación y senescencia endotelial, contribuyendo a la enfermedad vascular, aunque también se observa un incremento de la angiogénesis (Liao et al., 2014). Con respecto a nuestros resultados, detectamos una disminución de la expresión de let-7g mediante *arrays*, la cual no se comprobó al analizar las muestras de pacientes con SCASEST de toda la población de estudio. Por otro lado, otro grupo demostró que la hipoxia puede incrementar la expresión de la familia let-7 en células endoteliales, induciendo la angiogénesis y el número de células progenitoras endoteliales circulantes (Hsu et al., 2017). Atendiendo a todos estos trabajos publicados, la desregulación de la expresión de let-7e que observamos en pacientes con SCASEST

## Discusión

podría estar implicada con procesos como la aterosclerosis, la angiogénesis y la inflamación.

La hipertrofia cardíaca es una respuesta patológica común a varias enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y la isquemia miocárdica. A menudo da lugar a insuficiencia cardíaca, que es el principal determinante de mortalidad y morbilidad en enfermedades cardiovasculares. A su vez, la fibrosis cardíaca es un componente patológico de la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca, tratándose de la proliferación alterada de fibroblastos cardíacos y la deposición intersticial de matriz extracelular en el miocardio.

Se ha sugerido el papel de miR-328 en la fibrosis cardíaca (Du et al., 2016, Li et al., 2014, Zhao et al., 2018). Ratones transgénicos con una sobreexpresión de miR-328 específica de cardiomiocitos mostraron un incremento en el depósito de colágeno provocando fibrosis (Zhao et al., 2018) e hipertrofia cardíaca (Li et al., 2014). Además, la transfección de cardiomiocitos con mimicos de miR-328 en co-cultivo con fibroblastos dio lugar a un aumento de miR-328 en estos últimos mediante transporte paracrino (Zhao et al., 2018).

Nuestros resultados demuestran una disminución de la expresión de miR-328 mediante *arrays*, aunque no se confirmó la disminución de su expresión en pacientes con SCASEST teniendo en cuenta toda la población de estudio. Sin embargo, y de forma contradictoria a nuestros resultados, se han descrito niveles elevados de miR-328 en plasma de pacientes con infarto (He et al., 2014, Wang et al., 2011), sugiriendo un valor diagnóstico, aunque inferior al proporcionado por cTnT (He et al., 2014). Asimismo, se ha relacionado miR-328 con el riesgo de mortalidad o insuficiencia cardíaca dentro de los 6 meses posteriores a la manifestación de SCA (He et al., 2014). En otro estudio se examinó el papel de miR-328 en el desarrollo de la

aterosclerosis, observando que su sobreexpresión en HUVEC inhibió la inflamación y apoptosis inducida por el tratamiento con oxLDL (Wu et al., 2018a).

En cuanto a miR-523, detectamos una disminución de su expresión en la manifestación aguda del SCASEST. Sin embargo, no hay estudios publicados hasta el momento que indiquen el nivel de expresión de miR-523 circulante en el SCA, ni tampoco que lo relacionen con una implicación en su fisiopatología.

Por lo que sabemos, en la presente tesis es la primera vez que se compara el perfil de expresión de miRNA circulantes en el momento agudo del SCASEST con el perfil tras un año de evolución clínica. Predominó la disminución de la expresión de miRNA en la manifestación aguda del SCA, pudiendo sugerir una mayor captación por las células de la pared vascular del tejido miocárdico dañado, así como una mayor degradación en la circulación. Al seleccionar aquellos miRNA desregulados en la manifestación aguda del infarto, se sugiere su posible utilidad como biomarcadores de SCASEST. En concreto, la disminución de let-7e y miR-26a observada en la manifestación aguda del SCASEST revierte hasta niveles control tras un año de evolución clínica, lo que refuerza su posible implicación en la patología y su uso potencial como biomarcadores de SCASEST. Se desconoce si los miRNA circulantes ejercen una función biológica. Sin embargo, atendiendo a los resultados publicados en relación a los miRNA seleccionados en la manifestación aguda del SCASEST, su posible función biológica podría estar relacionada con la regulación de procesos celulares implicados en la patología del SCA como la apoptosis y la angiogénesis.

### **5.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL *CLUSTER* miR-99b/let-7e/miR-125a EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. PAPEL EN LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL**

El *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a mostró un mismo patrón de expresión en suero de pacientes con SCASEST, disminuyendo en su manifestación aguda y revirtiendo a niveles control tras un año de evolución clínica. Estos resultados sugieren que los tres componentes del *cluster* podrían estar relacionados con la manifestación aguda del SCA, pudiendo proponerse como posibles biomarcadores de SCASEST. Sin embargo, no se han propuesto como posibles biomarcadores de SCA en ninguno de los trabajos publicados hasta el momento.

Los tres componentes del *cluster* muestran una alta expresión en células endoteliales (Hao et al., 2014, Kuehbacher et al., 2007, Li et al., 2010, McCall et al., 2011). Se ha demostrado que el *cluster* se encuentra bajo la regulación de NF- $\kappa$ B, el principal modulador de la inflamación endotelial, ya que el sitio de inicio de la transcripción del *cluster* posee un sitio de unión para p65 (Curtale et al., 2018, de la Rica et al., 2015). Además, se ha demostrado una relación entre p65 y la represión de algunos genes diana antiinflamatorios de los miRNA del *cluster*. Por ejemplo, miR-99b tiene como diana IGF-1R (del inglés, *insulin-like growth factor 1 receptor*), una diana de miR-125a es TNFAIP3 (del inglés, *tumor necrosis factor alpha-induced protein3*) y let-7e tiene como diana ITGA4 (del inglés, *integrin alpha 4*) y THBS1 (*thrombospondin 1*). Estos resultados sugieren que en situaciones inflamatorias como en el SCA, podría tener lugar una activación de la transcripción del *cluster* como resultado de la activación de NF- $\kappa$ B.

Por otro lado, la activación de NF- $\kappa$ B regula la expresión de miRNA, los cuales a su vez pueden regular negativamente la actividad de NF- $\kappa$ B (Ma et al., 2011, Sheedy and O'Neill, 2008, Sonkoly et al., 2008, Taganov et al., 2006). Por tanto, es posible que el *cluster* sea activado en situaciones inflamatorias, pero forme parte de un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa, actuando así en la disminución de la respuesta inflamatoria.

Hasta el momento no hay estudios que analicen la expresión circulante de los miRNA del *cluster*, y se desconoce su posible función en la biología vascular y enfermedades cardiovasculares. En el único trabajo publicado que hemos encontrado en relación al SCA, let-7e se ha relacionado con efectos cardioprotectores al estar inducido por poscondicionamiento en corazón de rata (Varga et al., 2014).

Según nuestros resultados, detectamos una disminución de los niveles de expresión circulante de los 3 miRNA del *cluster* en la manifestación aguda del SCASEST. Atendiendo a estudios sobre la comunicación intercelular y la transferencia de miRNA mediante microvesículas extracelulares (Hergenreider et al., 2012, Zernecke et al., 2009), comentados en apartados anteriores, podríamos sugerir que los miRNA del *cluster* miR99b/let-7e/miR-125, altamente expresados en endotelio en situaciones inflamatorias, sean transportados de forma paracrina mediante vesículas extracelulares y captados por células endoteliales en respuesta al daño por isquemia. Como consecuencia, podría dar lugar a la disminución de sus niveles circulantes, mientras que aumentaría su concentración intracelular, pudiendo ejercer una función biológica. Desde otra perspectiva, la disminución de los niveles de expresión circulantes de los componentes del *cluster* podría indicar su liberación a la circulación unidos a lipoproteínas en lugar de encapsulados en microvesículas,

## Discusión

sufriendo una mayor degradación por las RNAsas y proteinasas liberadas a la circulación por daño cardíaco y, por tanto, que carezcan de función biológica.

Debido a que los 3 componentes del *cluster* muestran un mismo patrón de expresión en el momento del SCA y que además es revertido al año de la ICP, y a la ausencia de estudios que analizan el papel del *cluster* sobre el endotelio, el siguiente objetivo de este estudio fue analizar la repercusión del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125 sobre la modulación de la función endotelial.

La familia let-7e se encuentra altamente expresada en células endoteliales y en tejido cardíaco adulto (Barringhaus and Zamore, 2009, Kuehbacher et al., 2007, Thum et al., 2008), viéndose involucrada en angiogénesis e inflamación vascular (Kuehbacher et al., 2007, Urbich et al., 2008). En concreto, let-7e se ha descrito como un importante regulador de la inflamación (Lin et al., 2017). Su expresión aumenta en HUVEC tratadas con ox-LDL y a su vez, let-7e promueve la activación de NF- $\kappa$ B y su translocación al núcleo mediante la inhibición de la expresión de su diana (I $\kappa$ B $\beta$ ), un inhibidor crítico de la vía de señalización NF- $\kappa$ B. Se ha descrito un incremento de moléculas de adhesión inflamatorias (ICAM-1, E-selectina, VCAM-1) así como de citoquinas inflamatorias (CCL2, IL-1 $\beta$ , IL-6) tras la transfección con mimicos de let-7e en HUVEC, mientras que la transfección con inhibidores de let-7e no induce cambios significativos en la expresión de estas moléculas (Lin et al., 2017). Sin embargo, otro estudio mostró que let-7e actúa como mediador antiinflamatorio, suprimiendo la activación de NF- $\kappa$ B en células epiteliales (Iliopoulos et al., 2009). Estos resultados son contradictorios y podrían reflejar diferencias atendiendo al tipo celular, de manera que los efectos del mismo miRNA en diferentes tipos celulares podrían ser completamente opuestos.

Hay escaso número de estudios que evalúan la influencia de let-7e sobre la función endotelial. Uno de los pocos grupos que lo ha estudiado es Kong et al., quienes demuestran que let-7e incrementa la migración y la vasculogénesis de células progenitoras endoteliales humanas y de rata (Kong et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados en HUVEC indican lo contrario, ya que la transfección con el inhibidor de let-7e aumentó la capacidad vasculogénica de HUVEC. Además, su capacidad adherente aumentó tras la transfección con el mimico de let-7e. Estos resultados contradictorios podrían explicarse en base a la utilización de diferentes tipos celulares, de manera que los efectos del mismo miRNA podrían ser diferentes.

La familia miR-125 está altamente conservada y se compone de tres miRNA homólogos: miR-125a, miR-125b-1 y miR-125b-2, que se relacionan con la proliferación celular y la inflamación (Sun et al., 2013b). Un estudio mostró que el miR-125b protege el miocardio del daño por isquemia-reperfusión reprimiendo la señalización apoptótica mediada por p53 y suprimiendo la activación de NF- $\kappa$ B mediada por TRAF-6 (Wang et al., 2014c), por tanto, disminuyendo el tamaño del infarto y previniendo la disfunción cardíaca inducida por isquemia-reperfusión.

La estimulación de la proliferación de células endoteliales es crítica para promover la reendotelización tras un daño por isquemia, tratándose de una característica importante en la cicatrización vascular y en la mejora de la función vascular (Van der Heiden et al., 2013). Svensson et al. demuestran que la inhibición de miR-125a en HUVEC induce la proliferación celular y la vasculogénesis, sugiriendo que su inhibición de miR-125a podría promover la reendotelización tras el daño endotelial, relacionándolo con una posible terapia intra-stent (Svensson et al., 2014). Del mismo modo, microvesículas



## Discusión

extracelulares derivadas de células endoteliales que sobreexpresan miR-125a, promueven la proliferación, migración y capacidad vasculogénica de las células endoteliales receptoras (Pan et al., 2018). Se ha demostrado también que tanto miR-125a como miR-125b suprimen la expresión de endotelina-1 inducida por ox-LDL (Hao et al., 2014, Li et al., 2010) y promueven la angiogénesis (Liang et al., 2016). Sin embargo, en otro estudio en células endoteliales arteriales de ratón, miR-125a reduce la angiogénesis a través de la represión de RTEF-1 (del inglés, *Related transcriptional enhancer factor-1*), un factor de transcripción involucrado en angiogénesis que induce la expresión de VEGF y eNOS (Che et al., 2014).

Nuestros resultados mostraron que la transfección de HUVEC con el inhibidor de miR-125a disminuyó el número de células en fase proliferativa, mientras que no se detectaron cambios en la capacidad vasculogénica ni adherente. Nuestros resultados discrepan, por tanto, de los publicados hasta el momento acerca de la influencia de miR-125a sobre la función endotelial, probablemente debido a aspectos metodológicos. De los dos trabajos que estudian la capacidad proliferativa en células endoteliales (Pan et al., 2018, Svensson et al., 2014), uno de ellos utiliza una línea celular endotelial de la microvasculatura cerebral, por lo que la variabilidad de los resultados se podría deber a la utilización de diferentes tipos celulares. Con respecto al otro estudio publicado, analizan la capacidad proliferativa de las HUVEC mediante recuento celular con azul tripán en la cámara de Bürker tras 96 horas desde el inicio de la transfección (Svensson et al., 2014), mientras que en nuestro trabajo se analizó el número de células en fase proliferativa mediante el uso de yoduro de propidio por citometría de flujo tras 60 horas desde el inicio de la transfección.

Por último, la función endotelial en HUVEC no se vio afectada por el aumento o la inhibición de miR-99b. No se observaron diferencias significativas en la capacidad adherente, proliferativa y vasculogénica de HUVEC tras las transfecciones con los mímicos e inhibidores por separado, ni tampoco tras las transfecciones combinadas. Hasta el momento no hemos encontrado estudios relacionados con la influencia de miR-99b en células endoteliales, aunque sí en algunos otros tipos celulares. En células de glándula mamaria de ratón, la sobreexpresión de miR-99b da lugar a un incremento en la proliferación, migración y expresión de fibronectina, mientras que la expresión de E-cadherina y ZO-1 fueron reguladas negativamente (Turcatel et al., 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de miR-99b en queratinocitos humanos inhibe su proliferación a través de la regulación de la vía de señalización Akt/mTOR (Jin et al., 2013). También se ha descrito que miR-99b reduce la proliferación celular mediante la represión de su diana IGF-1R (del inglés, *insulin-like growth factor-1 receptor*), un activador principal de la vía de señalización PI3K/Akt (Jin et al., 2013). Por otro lado, se observó que la expresión de miR-99b incrementó durante la diferenciación de células madre embrionarias humanas a células endoteliales (Kane et al., 2012). Además, el trasplante de estas células, las cuales sobreexpresaban miR-99b, en músculo de ratones sometidos a isquemia del miembro inferior indujo la neovascularización y la recuperación del flujo sanguíneo (Kane et al., 2012). Estos resultados sugieren que miR-99b podría tener distintas funciones dependiendo del tipo celular.

En resumen, nuestros resultados muestran que a pesar de que los miRNA del cluster miR-99b/let-7e/miR-125a tienen un patrón de expresión similar en la manifestación aguda del infarto, no parecen estar implicados en las mismas vías moleculares en células

## Discusión

endoteliales. Al inhibir o aumentar la expresión de miR-99b, let-7e y miR-125 mediante transfección con inhibidores y mimicos de miRNA, no detectamos la influencia de varios de estos miRNA en alguna de las funciones endoteliales estudiadas, y por lo tanto, tampoco efectos aditivos. La disminución de let-7e en células endoteliales podría relacionarse con una reducción de la adhesión y un aumento de la capacidad vasculogénica, mientras que la disminución de miR-125a se podría relacionar con una disminución de la capacidad proliferativa del endotelio. Por lo tanto, estos resultados sugieren que dos de los componentes del *cluster*, let-7e y miR-125a, podrían estar implicados en la patología del SCA regulando procesos celulares como la proliferación endotelial y la angiogénesis.

#### **5.4. CORRELACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS CON LA EXPRESIÓN DE miRNA CIRCULANTES**

El SCA es la causa más común de daño cardíaco y produce la pérdida de un gran número de células miocárdicas como resultado de la isquemia por oclusión de la arteria coronaria. La necrosis de cardiomiocitos activa mecanismos inmunes innatos desencadenando una reacción inflamatoria que finalmente da lugar a la formación de una cicatriz (Frangogiannis, 2006, Frangogiannis, 2008, Libby et al., 2014).

Las vías de señalización mediadas por los receptores TLR (del inglés, *Toll-Like Receptor*), la cascada del complemento y la generación de especies reactivas de oxígeno inducen la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B y aumentan la síntesis de citoquinas y quimioquinas en el corazón infartado (Christia and Frangogiannis, 2013, Frangogiannis, 2006, Nian et al., 2004). Las quimioquinas estimulan la captación mediante quimiotaxis de leucocitos en la zona infartada, mientras que las citoquinas promueven interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales, dando como resultado la trans migración de células inflamatorias en la zona de daño (Frangogiannis, 2008).

La necrosis de cardiomiocitos produce la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de los leucocitos, dando como resultado una inflamación sistémica que se caracteriza por niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y CRP. La eliminación de células muertas y restos de matriz mediante neutrófilos y macrófagos es esencial para la resolución de la inflamación y la transición a la fase reparadora. En esta transición, la respuesta inflamatoria inicial es posteriormente suprimida, en parte, por la liberación de citoquinas

## Discusión

antiinflamatorias (Frangogiannis, 2008, Libby et al., 2014, Prabhu and Frangogiannis, 2016, Swirski and Nahrendorf, 2013).

Los tipos celulares responsables del inicio de la reacción inflamatoria tras el infarto incluyen cardiomiocitos necróticos y productos de degradación de la matriz extracelular, que contribuyen a la reacción de inflamación. Los fibroblastos cardiacos, las células más numerosas en el miocardio a parte de los cardiomiocitos, pueden detectar la isquemia y el daño de cardiomiocitos, produciendo citoquinas inflamatorias y quimioquinas. Las células endoteliales también pueden ser una fuente de proteínas inflamatorias. Además, la activación endotelial y la expresión de moléculas de adhesión es un paso determinante para la adhesión y transmigración de leucocitos. Otro tipo celular con un potencial papel en la inflamación son los mastocitos cardiacos, los cuales contienen grandes cantidades de mediadores proinflamatorios, como histamina y TNF- $\alpha$ , y son capaces de sintetizar citoquinas y factores de crecimiento (Chen and Frangogiannis, 2013, Christia and Frangogiannis, 2013, Frangogiannis, 2008).

En este estudio se llevó a cabo la medida de los niveles de diferentes citoquinas y quimioquinas en suero de pacientes con SCASEST y se comparó con sujetos control. Se observó un aumento significativo de los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  en la manifestación aguda del infarto en comparación con sujetos control. La inducción de la expresión y liberación de las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 ha sido descrita continuamente en modelos experimentales de infarto de miocardio (Dewald et al., 2004, Frangogiannis et al., 1998, Gwechenberger et al., 1999). En pacientes con enfermedad coronaria inestable, IL-6 circulante se ha sugerido como un fuerte marcador independiente de

mortalidad e identificador de pacientes que más se benefician de una ICP temprana (Lindmark et al., 2001). Además, niveles elevados de IL-6 en hombres sanos se han asociado con un riesgo incrementado de padecer un SCA (Ridker et al., 2000). La síntesis de la citoquina proinflamatoria IL-6 también es rápidamente inducida en células mononucleares y cardiomiocitos tras isquemia, pudiendo promover la hipertrofia pero a su vez evitar su apoptosis (Frangogiannis, 2006). De igual forma, en concordancia con nuestros resultados, la liberación de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  tiene lugar precozmente en el miocardio infartado, y puede estimular la expresión de otros mediadores inflamatorios por parte de leucocitos y células endoteliales (Frangogiannis, 2006).

Atendiendo a los trabajos publicados, los perfiles de citoquinas detectados en nuestra población podrían ser consistentes con la activación y respuesta inflamatoria durante el infarto. Con excepción de IL-6 y TNF- $\alpha$ , no se detectaron variaciones en el resto de citoquinas analizadas en la manifestación aguda del SCASEST con respecto a sujetos sanos, aunque existen estudios que sí las relacionan. Al igual que con TNF- $\alpha$  e IL-6, se ha descrito una marcada sobrerregulación de IL-1 $\beta$  en modelos experimentales de infarto de miocardio (Dewald et al., 2004, Herskowitz et al., 1995) y un aumento significativo de los niveles de IL-1 $\beta$  en plasma de pacientes con SCA (Guillen et al., 1995). También se ha documentado la inducción en el infarto de miocardio de las quimioquinas IL-8, MCP-3 y MIP-1 $\alpha$ , potentes quimioatrayentes de células mononucleares (Frangogiannis, 2008). Aunque tampoco detectamos cambios en los niveles de VEGF-A en nuestra población de estudio, factores de crecimiento angiogénicos como VEGF son inducidos y liberados durante las primeras horas tras el infarto de

## Discusión

miocardio ejerciendo un papel importante en la formación de vasos durante la etapa de reparación (Frangogiannis, 2008).

Con el objetivo de analizar posibles cambios en el contexto inflamatorio después de un año desde la manifestación aguda del SCASEST, medimos los niveles de citoquinas en muestras de suero de pacientes SCASEST tras un año de evolución y llevamos a cabo el análisis comparativo frente a sus respectivos niveles en el momento del infarto. Sin embargo, no detectamos ningún cambio significativo.

El factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B es un elemento crítico en la regulación de la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en el miocardio isquémico (Frangogiannis, 2006). NF- $\kappa$ B se activa rápidamente en respuesta a una variedad de estímulos inflamatorios, incluyendo citoquinas (como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), lípidos oxidados e hipoxia, activando la expresión de genes proinflamatorios: moléculas de adhesión (VCAM-1, E-selectina), citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6), quimioquinas (IL-8), factores de crecimiento y enzimas inducibles como COX2 (del inglés, *cyclooxygenase 2*) e iNOS (del inglés, *inducible nitric oxide synthase*) (Brasier, 2010, De Martin et al., 2000, Frangogiannis, 2006).

El papel central de NF- $\kappa$ B en la inducción de la inflamación necesita un control estricto de esta vía de señalización. Como se ha indicado anteriormente, la activación de NF- $\kappa$ B también regula la expresión de miRNA, los cuales a su vez se han visto involucrados en la señalización de NF- $\kappa$ B mediante la represión de genes diana que son reguladores y efectores de NF- $\kappa$ B (Boldin and Baltimore, 2012, Ma et al., 2011, Sheedy and O'Neill, 2008). La mayoría de estos miRNA participan en circuitos de retroalimentación positiva o negativa, controlando así la señalización por NF- $\kappa$ B y por consiguiente, la respuesta inflamatoria (Cheng et al., 2013, Taganov et al., 2006).

Asimismo, hay otros miRNA que, aunque no son inducidos por NF- $\kappa$ B, pueden modular la señalización por NF- $\kappa$ B (Boldin and Baltimore, 2012, Hamik and Jain, 2012, Sun et al., 2012b). En este contexto, se ha demostrado que la expresión de uno de los miRNA estudiados en esta tesis, miR-130b, es inducida por NF- $\kappa$ B mediante la unión con su región promotora (Cui et al., 2016). A su vez, miR-130b activa la señalización de NF- $\kappa$ B de forma indirecta mediante su acción sobre un regulador negativo de la vía (Cui et al., 2016), lo que sugiere su participación en la regulación de la inflamación mediante un bucle de retroalimentación positiva.

Los miRNA también pueden ejercer un control de la inflamación a través de la represión de la expresión de moléculas de adhesión (Suarez et al., 2010) y de citoquinas (Fabbri et al., 2014, Hu et al., 2011). La relación entre citoquinas y miRNA se ha demostrado en un estudio en el que la disminución específica de miR-296-3p y miR-298-5p junto con el aumento de sus dianas IGF1R- $\beta$  y TNF- $\alpha$ , es el principal determinante de la resistencia a la apoptosis inducida por citoquinas de células alfa pancreáticas (Barbagallo et al., 2013). En otro estudio, la asociación entre los cambios de expresión de miRNA circulantes implicados en inflamación y metabolismo, y los niveles de citoquinas proinflamatorias, antiinflamatorias y angiogénicas, ha sugerido su implicación potencial en la fisiopatología de la diabetes, pudiendo tener utilidad como biomarcadores de prediabetes (Nunez Lopez et al., 2016).

En el contexto de la aterosclerosis y el SCA, hay varios trabajos publicados que asocian miRNA y mediadores inflamatorios. Los niveles de miR-29b circulante e IL-6 están incrementados en sujetos con aterosclerosis subclínica, y correlacionan de forma independiente con el espesor de la íntima-media de la carótida (Huang et al., 2017).



## Discusión

Por ello, sugieren que niveles incrementados de miR-29b circulante e IL-6 podrían servir como nuevos biomarcadores para la identificación de aterosclerosis (Huang et al., 2017). Otro estudio asocia los niveles de expresión de miR-342-5p en suero con los niveles de las citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ , sugiriendo un papel regulador para miR-342-5p en la aterosclerosis y la secreción de citoquinas (Ahmadi et al., 2018). Moradi et al. proponen un papel potencial de miR-10a en el proceso inflamatorio subyacente a la aterosclerosis, al encontrar una asociación negativa de su expresión con los niveles en suero de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Moradi et al., 2018). Por otro lado, Wu et al. muestran una correlación negativa de miR-126 en células mononucleares de sangre periférica con los niveles de CRP de alta sensibilidad, así como con los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6, mientras que correlaciona de forma positiva con los niveles de IL-10 (Wu and Zhang, 2018).

Debido a la complejidad de los genes inflamatorios y de la regulación mediante miRNA, puede haber muchas asociaciones desconocidas de miRNA con la inflamación. Por ello, nos planteamos como objetivo conocer la posible asociación de los niveles de expresión de miRNA circulantes relacionados con la manifestación aguda del SCA, previamente seleccionados (let-7e, let-7g, miR-28, miR-130b, miR-328, miR-523, miR-874, miR-92a, miR-26a, miR-320b, miR-99b y miR-125a), con los niveles de diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y VEGF-A) y antiinflamatorias (IL-10 e IL-13), así como de quimioquinas (MCP-3, MDC, IL-8 y MIP-1 $\alpha$ ). Para ello y de forma conjunta en todos los individuos participantes en el estudio, se llevó a cabo un análisis de correlación, con independencia del cuadro clínico, entre la expresión de cada miRNA y los niveles de cada citoquina y quimioquina estudiados.

Como resultado, todos los miRNA analizados mostraron alguna correlación entre sus niveles de expresión y los niveles de citoquinas y/o quimioquinas en la población de estudio con excepción de miR-125a. En un estudio de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva, la expresión de miR-125b correlaciona con TNF- $\alpha$  e IL-8, mientras que, en concordancia con nuestros resultados, la expresión de miR-125a no se asocia con los niveles de citoquinas inflamatorias (Hu et al., 2017).

En nuestros resultados, se detectó una correlación positiva entre los niveles de IL-8 y los miRNA miR-130b, miR-523, miR-874 y miR-28, respectivamente. A su vez, miR-28 se asoció negativamente con los niveles de MDC. Por otro lado, miR-99b mostró una asociación positiva con MDC. Hasta el momento, no hemos encontrado trabajos que muestren estas asociaciones, sin embargo, algunos de estos miRNA se han relacionado con diferentes mediadores inflamatorios. Así, se ha demostrado la regulación de VEGF-A mediante miR-874 y su acción directa sobre STAT3 en cáncer (Zhang et al., 2015c). Por otro lado, TNF- $\alpha$  induce la expresión de miR-130b en cáncer (Yang et al., 2018), mientras que la sobreexpresión de miR-130b inhibe la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en HUVEC y en un modelo de ratón de sepsis inducida por LPS (Wang et al., 2017b).

En este estudio, let-7g mostró una correlación negativa con los niveles de IL-1 $\beta$ . No hemos encontrado esta asociación en ninguno de los trabajos publicados, aunque la secreción de otras citoquinas proinflamatorias como MCP-1 e IL-6 se han visto significativamente reducidas en HUVEC transfectadas con mimicos de let-7g (Liao et al., 2014), sugiriendo su papel en la función endotelial y en la atenuación de la inflamación.

## Discusión

El otro miembro de la familia let-7 estudiado, let-7e, mostró una correlación negativa con TNF- $\alpha$  y positiva con IL-13. En concordancia con estos resultados, se ha sugerido una actividad antiinflamatoria de let-7e, cuya sobreexpresión inhibe los niveles de TNF- $\alpha$  en células epiteliales (Li et al., 2018) y macrófagos (Wu et al., 2018b, Zhang et al., 2018). Por otro lado, se ha demostrado que el cluster miR-99b/let-7e/miR-125a es inducido por las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$  así como por la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , encontrándose bajo la regulación por NF- $\kappa$ B (Curtale et al., 2018, de la Rica et al., 2015). Como se ha comentado anteriormente, la transfección de HUVEC con mímicos de let-7e produce un aumento de citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 (Lin et al., 2017). Sin embargo, otro estudio mostró que let-7e actúa como mediador antiinflamatorio, suprimiendo la activación de NF- $\kappa$ B en células epiteliales (Iliopoulos et al., 2009). En conjunto, la asociación negativa de let-7e con TNF- $\alpha$  y positiva con IL-13 que detectamos en nuestro estudio, podría sugerir un papel de let-7e en la regulación de la inflamación. Su expresión podría estar inducida por estímulos inflamatorios y a su vez modular la inflamación, por un lado, mediante retroalimentación negativa reprimiendo genes diana como TNF- $\alpha$ , y por otro estimulando la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-13.

Otro de los miRNA que mostró una asociación significativa fue miR-320b, el cual se relacionó negativamente con TNF- $\alpha$ . Un estudio publicado recientemente también indicó una correlación negativa entre miR-320 en células epiteliales alveolares y los niveles de TNF- $\alpha$  en sangre (Yang et al., 2015), lo que podría sugerir que TNF- $\alpha$  sea un gen diana de miR-320b y que esté involucrado en la atenuación de la inflamación.

miR-92a se relacionó positivamente con los niveles de IL-6 y negativamente con MDC. En concordancia con estos resultados, Zhu et al. (Zhu et al., 2014) han demostrado que la expresión del *cluster* miR-17/92 está regulada por la vía IL-6/Stat3 en cáncer, de manera que el tratamiento con IL-6 incrementa significativamente la expresión del *cluster*. Por tanto, esta correlación positiva que detectamos entre miR-92a e IL-6 podría indicar que la expresión de miR-92a podría ser inducida por estímulos inflamatorios y que, a su vez, estaría implicada en la regulación de la inflamación mediante retroalimentación positiva.

Otras de las correlaciones estadísticamente significativas encontradas en este estudio incluyeron a miR-26a, el cual mostró una asociación negativa con MDC. miR-523 correlacionó positivamente con MIP-1 $\alpha$ , mientras que miR-328 se asoció de forma positiva con MCP-3 y negativa con IL-13. No se han encontrado trabajos publicados hasta el momento relacionados con estos resultados. Sin embargo, la asociación negativa entre miR-26a y la quimioquina MDC podría indicar la participación de este miRNA en la atenuación de la inflamación, reprimiendo la expresión de MDC y por tanto, reduciendo la quimiotaxis de leucocitos. Sugeriría lo contrario para miR-523 y miR-328, ya que correlacionaron positivamente con las quimioquinas MIP-1 $\alpha$  y MCP-3, respectivamente. Además, la citoquina IL-13 podría ser una diana de miR-328, participando en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria.

En conjunto, los mediadores inflamatorios que correlacionaron con un mayor número de miRNA fueron las quimioquinas IL-8, que correlacionó positivamente con la expresión de 4 miRNA (miR-28, miR-130b, miR-523 y miR-874) y MDC, que correlacionó negativamente con 3 miRNA (miR-28, miR-92a y miR-26a) y de forma positiva con otro

## Discusión

(miR-99b). Sin embargo, hasta el momento no hay trabajos publicados con respecto a estas asociaciones mostradas.

A la hora de interpretar los resultados de este estudio en conjunto cabe destacar que las diferentes correlaciones estadísticamente significativas detectadas son débiles atendiendo a los valores de coeficientes de correlación. Esto podría ser debido al tamaño muestral, por lo que se necesitarían estudios adicionales con un mayor tamaño muestral para confirmar estas asociaciones.

El presente trabajo es un estudio de asociación entre dos variables, que analiza la relación entre los niveles de expresión de miRNA circulantes y citoquinas, pero no identifica causalidad. Por tanto, no podemos extraer conclusiones causales a partir de estos resultados. Sin embargo, como se ha ido indicando anteriormente, se podría sugerir que aquellas citoquinas que muestran una asociación negativa con los niveles de expresión de miRNA, podrían ser dianas potenciales y que los miRNA lleven a cabo la regulación de su expresión de forma directa. Es el caso de TNF- $\alpha$  con let-7e y miR-320b, respectivamente. También se detectó una correlación negativa entre MDC y los miRNA miR-28, miR-92a y miR-26a, respectivamente, y por último entre IL-1 $\beta$  y let-7g. Por otro lado, las correlaciones positivas podrían sugerir que esos miRNA ejercen una regulación indirecta sobre los niveles de citoquinas.

En resumen, en este estudio se ha detectado un importante número de correlaciones significativas entre los niveles de expresión de miRNA circulantes relacionados con el momento agudo del infarto y mediadores inflamatorios del SCA. Por tanto, estos resultados sugieren que los cambios en los niveles de citoquinas pro y antiinflamatorias así como de quimioquinas implicadas en la patología del SCA y la desregulación de miRNA relacionados con la

manifestación aguda del SCASEST podrían participar en el proceso patogénico o tener utilidad como posibles biomarcadores de SCASEST.



## **6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**





1. Los miRNA propuestos en la bibliografía como controles endógenos en estudios de miRNA circulantes muestran una expresión diferencial en muestras de suero y plasma de pacientes con SCASEST e individuos sanos. El miR-484 es el control endógeno más adecuado para la normalización de la expresión de miRNA circulantes mediante qRT-PCR en pacientes con SCASEST.

2. La expresión de miRNA circulantes descritos en la bibliografía como potenciales biomarcadores de SCA es diferente en muestras de suero y plasma de pacientes con SCASEST, y es el suero el tipo de muestra de partida más adecuado para realizar estudios de expresión de miRNA circulantes.

3. El suero de los pacientes con SCASEST tanto en su manifestación aguda como al año de evolución clínica muestran un perfil de expresión diferencial de miRNA circulantes mediante *arrays*. 54 miRNA estaban desregulados en el momento agudo del SCA, de los que 10 aumentaron y 44 disminuyeron su expresión. Después de un año de evolución clínica, 42 miRNA estaban desregulados, de los cuales 35 aumentaron y 7 disminuyeron su expresión, lo que apoya el uso de los miRNA como posibles biomarcadores en el diagnóstico de enfermedades coronarias.

4. La expresión de let-7e, miR-28, miR-130b, miR-523, miR-874, miR-92a, miR-26a y miR-320b está desregulada en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda, lo que les convierte en potenciales biomarcadores para el diagnóstico y manejo del paciente con SCASEST. Después de un año de evolución clínica, la expresión

## Conclusiones

de let-7e y miR-26a revierte hasta los niveles de individuos sanos, lo que les relaciona con la manifestación aguda de esta patología.

5. El let-7e forma parte del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a y la expresión de todos sus miRNA disminuye en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda y revierte hasta niveles control después de un año de evolución clínica, reafirmando su potencial uso como biomarcador.

6. Dos componentes del *cluster* miR-99b/let-7e/miR-125a, el let 7e y el miR-125a, regulan la función endotelial en células endoteliales humanas. El let-7e modula la adhesión celular y la capacidad vasculogénica, mientras que el miR-125a regula la proliferación de células endoteliales humanas en cultivo.

7. Los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  incrementan en suero de pacientes con SCASEST en su manifestación aguda. La expresión de los miRNA circulantes relacionados con la manifestación aguda del SCASEST, a excepción de miR-125a, se asocia con los niveles de citoquinas y quimioquinas implicadas en la patología del SCA.

1. miRNAs proposed in the literature as endogenous controls for circulating miRNA studies show expression differences in both serum and plasma from NSTEMI-ACS patients and healthy subjects. miR-484 is the most suitable endogenous control to analyze by qRT-PCR circulating miRNA expression from NSTEMI-ACS patients.

2. The expression pattern of the miRNAs proposed as potential biomarkers of ACS in the literature is different in both serum and plasma of NSTEMI-ACS patients, and serum is the sample of choice to perform circulating miRNA expression studies.

3. Serum miRNA expression profile is different in patients with acute manifestation of NSTEMI-ACS and one-year follow-up. 54 miRNAs were dysregulated in NSTEMI-ACS, including 10 up-regulated and 44 down-regulated miRNAs. After one-year follow-up, 42 miRNAs were dysregulated, including 35 up-regulated and 7 down-regulated miRNAs, supporting the use of miRNAs as possible biomarkers in the diagnosis of myocardial diseases.

4. miRNA expression of let-7e, miR-28, miR-130b, miR-523, miR-874, miR-92a, miR-26a and miR-320b are dysregulated in serum of patients with acute manifestation of NSTEMI-ACS, making them potential biomarkers for the diagnosis and management of NSTEMI-ACS patients. Let-7e and miR-26a expression reverse to reach control levels after one-year follow-up, being related to the acute manifestation of ACS pathology.

## Conclusions

5. Let-7e is a member of miR-99b/let-7e/miR-125a cluster. The expression of each miRNA component of the cluster decrease in the serum of NSTEMI-ACS patients and reverse to reach control levels after one-year follow-up, reaffirming its potential use as biomarker.

6. Let-7e and miR-125a, two components of miR-99b/let-7e/miR-125a cluster, regulate endothelial function in human endothelial cells. Let-7e modulates cellular adhesion and vasculogenesis capacity, whereas miR-125a controls the proliferation of cultured human endothelial cells.

7. Levels of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  increase in serum of patients with acute manifestation of NSTEMI-ACS. The expression of miRNAs related to NSTEMI-ACS, with the exception of miR-125a, is associated with the serum levels of cytokine and chemokine involved in ACS.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**





- ADACHI, T., NAKANISHI, M., OTSUKA, Y., NISHIMURA, K., HIROKAWA, G., GOTO, Y., NONOGI, H. & IWAI, N. 2010. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 56, 1183-5.
- AHMADI, R., HEIDARIAN, E., FADAEI, R., MORADI, N., MALEK, M. & FALLAH, S. 2018. miR-342-5p Expression Levels in Coronary Artery Disease Patients and its Association with Inflammatory Cytokines. *Clin Lab*, 64, 603-609.
- AI, J., ZHANG, R., LI, Y., PU, J., LU, Y., JIAO, J., LI, K., YU, B., LI, Z., WANG, R., WANG, L., LI, Q., WANG, N., SHAN, H., LI, Z. & YANG, B. 2010. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 391, 73-7.
- AIRD, W. C. 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 100, 158-73.
- AIRD, W. C. 2008. Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep*, 60, 139-43.
- ALTUVIA, Y., LANDGRAF, P., LITHWICK, G., ELEFANT, N., PFEFFER, S., ARAVIN, A., BROWNSTEIN, M. J., TUSCHL, T. & MARGALIT, H. 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 33, 2697-706.
- ARALDI, E., CHAMORRO-JORGANES, A., VAN SOLINGEN, C., FERNANDEZ-HERNANDO, C. & SUAREZ, Y. 2015. Therapeutic Potential of Modulating microRNAs in Atherosclerotic Vascular Disease. *Curr Vasc Pharmacol*, 13, 291-304.
- BANG, C., BATKAI, S., DANGWAL, S., GUPTA, S. K., FOINQUINOS, A., HOLZMANN, A., JUST, A., REMKE, J., ZIMMER, K., ZEUG, A., PONIMASKIN, E., SCHMIEDL, A., YIN, X., MAYR, M., HALDER, R., FISCHER, A., ENGELHARDT, S., WEI, Y., SCHOBER, A., FIEDLER, J. & THUM, T. 2014. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*, 124, 2136-46.
- BAO, M. H., FENG, X., ZHANG, Y. W., LOU, X. Y., CHENG, Y. & ZHOU, H. H. 2013. Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells. *Int J Mol Sci*, 14, 23086-102.
- BARBAGALLO, D., PIRO, S., CONDORELLI, A. G., MASCALI, L. G., URBANO, F., PARRINELLO, N., MONELLO, A., STATELLO, L., RAGUSA, M., RABUAZZO, A. M., DI PIETRO, C., PURRELLO, F. & PURRELLO, M. 2013. miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are causally involved in the higher resistance of mammalian pancreatic alpha cells

## Bibliografia

- to cytokine-induced apoptosis as compared to beta cells. *BMC Genomics*, 14, 62.
- BARILE, L., LIONETTI, V., CERVIO, E., MATTEUCCI, M., GHERGHICEANU, M., POPESCU, L. M., TORRE, T., SICLARI, F., MOCSETTI, T. & VASSALLI, G. 2014. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 103, 530-41.
- BARRINGHAUS, K. G. & ZAMORE, P. D. 2009. MicroRNAs: regulating a change of heart. *Circulation*, 119, 2217-24.
- BARTEL, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- BARTEL, D. P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-33.
- BELLERA, N., BARBA, I., RODRIGUEZ-SINOVAS, A., FERRET, E., ASIN, M. A., GONZALEZ-ALUJAS, M. T., PEREZ-RODON, J., ESTEVES, M., FONSECA, C., TORAN, N., GARCIA DEL BLANCO, B., PEREZ, A. & GARCIA-DORADO, D. 2014. Single intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse infarct remodeling. *J Am Heart Assoc*, 3, e000946.
- BENTZON, J. F., OTSUKA, F., VIRMANI, R. & FALK, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 114, 1852-66.
- BEREZIN, A., ZULLI, A., KERRIGAN, S., PETROVIC, D. & KRUZLIAK, P. 2015. Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. *Clin Biochem*, 48, 562-8.
- BLONDAL, T., JENSBY NIELSEN, S., BAKER, A., ANDREASEN, D., MOURITZEN, P., WRANG TEILUM, M. & DAHLSVEEN, I. K. 2013. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, 59, S1-6.
- BOLDIN, M. P. & BALTIMORE, D. 2012. MicroRNAs, new effectors and regulators of NF-kappaB. *Immunol Rev*, 246, 205-20.
- BONAUER, A., CARMONA, G., IWASAKI, M., MIONE, M., KOYANAGI, M., FISCHER, A., BURCHFIELD, J., FOX, H., DOEBELE, C., OHTANI, K., CHAVAKIS, E., POTENTE, M., TJWA, M., URBICH, C., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2009. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, 324, 1710-3.
- BRASIER, A. R. 2010. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*, 86, 211-8.
- BRIEGER, D., FOX, K. A., FITZGERALD, G., EAGLE, K. A., BUDAJ, A., AVEZUM, A., GRANGER, C. B., COSTA, B., ANDERSON,

- F. A., JR. & STEG, P. G. 2009. Predicting freedom from clinical events in non-ST-elevation acute coronary syndromes: the Global Registry of Acute Coronary Events. *Heart*, 95, 888-94.
- BYE, A., ROSJO, H., NAUMAN, J., SILVA, G. J., FOLLESTAD, T., OMLAND, T. & WISLOFF, U. 2016. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 162-8.
- CALLIS, T. E., PANDYA, K., SEOK, H. Y., TANG, R. H., TATSUGUCHI, M., HUANG, Z. P., CHEN, J. F., DENG, Z., GUNN, B., SHUMATE, J., WILLIS, M. S., SELZMAN, C. H. & WANG, D. Z. 2009. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*, 119, 2772-86.
- CAO, W., GUO, Q., ZHANG, T., ZHONG, D. & YU, Q. 2015. Prognostic value of microRNAs in acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*, 189, 79-84.
- CASTOLDI, G., DI GIOIA, C. R., BOMBARDI, C., CATALUCCI, D., CORRADI, B., GUALAZZI, M. G., LEOPIZZI, M., MANCINI, M., ZERBINI, G., CONDORELLI, G. & STELLA, A. 2012. MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. *J Cell Physiol*, 227, 850-6.
- CHAMORRO-JORGANES, A., ARALDI, E. & SUAREZ, Y. 2013. MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacol Res*, 75, 15-27.
- CHAMORRO-JORGANES, A., LEE, M. Y., ARALDI, E., LANDSKRONER-EIGER, S., FERNANDEZ-FUERTE, M., SAHRAEI, M., QUILES DEL REY, M., VAN SOLINGEN, C., YU, J., FERNANDEZ-HERNANDO, C., SESSA, W. C. & SUAREZ, Y. 2016. VEGF-Induced Expression of miR-17-92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis. *Circ Res*, 118, 38-47.
- CHE, P., LIU, J., SHAN, Z., WU, R., YAO, C., CUI, J., ZHU, X., WANG, J., BURNETT, M. S., WANG, S. & WANG, J. 2014. miR-125a-5p impairs endothelial cell angiogenesis in aging mice via RTEF-1 downregulation. *Aging Cell*, 13, 926-34.
- CHEN, J. F., MANDEL, E. M., THOMSON, J. M., WU, Q., CALLIS, T. E., HAMMOND, S. M., CONLON, F. L. & WANG, D. Z. 2006. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 38, 228-33.
- CHEN, K. C., HSIEH, I. C., HSI, E., WANG, Y. S., DAI, C. Y., CHOU, W. W. & JUO, S. H. 2011. Negative feedback regulation between microRNA let-7g and the oxLDL receptor LOX-1. *J Cell Sci*, 124, 4115-24.

## Bibliografía

- CHEN, P. J., SHANG, A. Q., YANG, J. P. & WANG, W. W. 2018. microRNA-874 inhibition targeting STAT3 protects the heart from ischemia-reperfusion injury by attenuating cardiomyocyte apoptosis in a mouse model. *J Cell Physiol*.
- CHEN, W. & FRANGOIANNIS, N. G. 2013. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 945-53.
- CHEN, X., BA, Y., MA, L., CAI, X., YIN, Y., WANG, K., GUO, J., ZHANG, Y., CHEN, J., GUO, X., LI, Q., LI, X., WANG, W., ZHANG, Y., WANG, J., JIANG, X., XIANG, Y., XU, C., ZHENG, P., ZHANG, J., LI, R., ZHANG, H., SHANG, X., GONG, T., NING, G., WANG, J., ZEN, K., ZHANG, J. & ZHANG, C. Y. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18, 997-1006.
- CHEN, X., LIANG, H., ZHANG, J., ZEN, K. & ZHANG, C. Y. 2012. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell*, 3, 28-37.
- CHEN, X., ZHANG, L., SU, T., LI, H., HUANG, Q., WU, D., YANG, C. & HAN, Z. 2015. Kinetics of plasma microRNA-499 expression in acute myocardial infarction. *J Thorac Dis*, 7, 890-6.
- CHEN, Y., GELFOND, J. A., MCMANUS, L. M. & SHIREMAN, P. K. 2009. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, 10, 407.
- CHENG, H. S., NJOCK, M. S., KHYZHA, N., DANG, L. T. & FISH, J. E. 2014. Noncoding RNAs regulate NF-kappaB signaling to modulate blood vessel inflammation. *Front Genet*, 5, 422.
- CHENG, H. S., SIVACHANDRAN, N., LAU, A., BOUDREAU, E., ZHAO, J. L., BALTIMORE, D., DELGADO-OLGUIN, P., CYBULSKY, M. I. & FISH, J. E. 2013. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med*, 5, 1017-34.
- CHENG, Y., TAN, N., YANG, J., LIU, X., CAO, X., HE, P., DONG, X., QIN, S. & ZHANG, C. 2010. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*, 119, 87-95.
- CHENG, Y. & ZHANG, C. 2010. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*, 3, 251-5.
- CHISTIYAKOV, D. A., OREKHOV, A. N. & BOBRYSHV, Y. V. 2016. Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *Int J Mol Sci*, 17.
- CHRISTIA, P. & FRANGOIANNIS, N. G. 2013. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*, 43, 986-95.

- CORSTEN, M. F., DENNERT, R., JOCHEMS, S., KUZNETSOVA, T., DEVAUX, Y., HOFSTRA, L., WAGNER, D. R., STAESSEN, J. A., HEYMANS, S. & SCHROEN, B. 2010. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 3, 499-506.
- CSISZAR, A., WANG, M., LAKATTA, E. G. & UNGVARI, Z. 2008. Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol* (1985), 105, 1333-41.
- CUI, X., KONG, C., ZHU, Y., ZENG, Y., ZHANG, Z., LIU, X., ZHAN, B., PIAO, C. & JIANG, Z. 2016. miR-130b, an onco-miRNA in bladder cancer, is directly regulated by NF-κB and sustains NF-κB activation by decreasing Cylindromatosis expression. *Oncotarget*, 7, 48547-48561.
- CULLEN, B. R. 2004. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, 16, 861-5.
- CURTALE, G., RENZI, T. A., MIROLO, M., DRUFUCA, L., ALBANESE, M., DE LUCA, M., ROSSATO, M., BAZZONI, F. & LOCATI, M. 2018. Multi-Step Regulation of the TLR4 Pathway by the miR-125a~99b~let-7e Cluster. *Front Immunol*, 9, 2037.
- CURTIS, H. J., SIBLEY, C. R. & WOOD, M. J. 2012. Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3, 617-32.
- D'ALESSANDRA, Y., CARENA, M. C., SPAZZAFUMO, L., MARTINELLI, F., BASSETTI, B., DEVANNA, P., RUBINO, M., MARENZI, G., COLOMBO, G. I., ACHILLI, F., MAGGIOLINI, S., CAPOGROSSI, M. C. & POMPILIO, G. 2013. Diagnostic potential of plasmatic MicroRNA signatures in stable and unstable angina. *PLoS One*, 8, e80345.
- D'ALESSANDRA, Y., DEVANNA, P., LIMANA, F., STRAINO, S., DI CARLO, A., BRAMBILLA, P. G., RUBINO, M., CARENA, M. C., SPAZZAFUMO, L., DE SIMONE, M., MICHELI, B., BIGLIOLI, P., ACHILLI, F., MARTELLI, F., MAGGIOLINI, S., MARENZI, G., POMPILIO, G. & CAPOGROSSI, M. C. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 31, 2765-73.
- DAI, G., KAAZEMPUR-MOFRAD, M. R., NATARAJAN, S., ZHANG, Y., VAUGHN, S., BLACKMAN, B. R., KAMM, R. D., GARCIA-CARDENA, G. & GIMBRONE, M. A., JR. 2004. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14871-6.
- DARABI, F., AGHAEI, M., MOVAHEDIAN, A., POURMOGHADAS, A. & SARRAFZADEGAN, N. 2016. The role of serum levels of

## Bibliografía

- microRNA-21 and matrix metalloproteinase-9 in patients with acute coronary syndrome. *Mol Cell Biochem*, 422, 51-60.
- DAS, S. & HALUSHKA, M. K. 2015. Extracellular vesicle microRNA transfer in cardiovascular disease. *Cardiovasc Pathol*, 24, 199-206.
- DAVIGNON, J. & GANZ, P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109, lii27-32.
- DE BOER, H. C., VAN SOLINGEN, C., PRINS, J., DUIJS, J. M., HUISMAN, M. V., RABELINK, T. J. & VAN ZONNEVELD, A. J. 2013. Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *Eur Heart J*, 34, 3451-7.
- DE LA RICA, L., GARCÍA-GÓMEZ, A., COMET, N. R., RODRÍGUEZ-UBREVA, J., CIUDAD, L., VENTO-TORMO, R., COMPANY, C., ÁLVAREZ-ERRICO, D., GARCÍA, M., GÓMEZ-VAQUERO, C. & BALLESTAR, E. 2015. NF- $\kappa$ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biol*, 16, 2.
- DE MARTIN, R., HOETH, M., HOFER-WARBINEK, R. & SCHMID, J. A. 2000. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, E83-8.
- DE ROSA, S., FICHTLSCHERER, S., LEHMANN, R., ASSMUS, B., DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. 2011. Transcoronary concentration gradients of circulating microRNAs. *Circulation*, 124, 1936-44.
- DEKKER, M. S., MOSTERD, A., VAN 'T HOF, A. W. & HOES, A. W. 2010. Novel biochemical markers in suspected acute coronary syndrome: systematic review and critical appraisal. *Heart*, 96, 1001-10.
- DEVAUX, Y., VAUSORT, M., GORETTI, E., NAZAROV, P. V., AZUAJE, F., GILSON, G., CORSTEN, M. F., SCHROEN, B., LAIR, M. L., HEYMANS, S. & WAGNER, D. R. 2012. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 58, 559-67.
- DEWALD, O., REN, G., DUERR, G. D., ZOERLEIN, M., KLEMM, C., GERSCH, C., TINCEY, S., MICHAEL, L. H., ENTMAN, M. L. & FRANGOGIANNIS, N. G. 2004. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*, 164, 665-77.
- DOEBELE, C., BONAUER, A., FISCHER, A., SCHOLZ, A., REISS, Y., URBICH, C., HOFMANN, W. K., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2010. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*, 115, 4944-50.

- DU, W., LIANG, H., GAO, X., LI, X., ZHANG, Y., PAN, Z., LI, C., WANG, Y., LIU, Y., YUAN, W., MA, N., CHU, W., SHAN, H. & LU, Y. 2016. MicroRNA-328, a Potential Anti-Fibrotic Target in Cardiac Interstitial Fibrosis. *Cell Physiol Biochem*, 39, 827-36.
- EITEL, I., ADAMS, V., DIETERICH, P., FUERNAU, G., DE WAHA, S., DESCH, S., SCHULER, G. & THIELE, H. 2012. Relation of circulating MicroRNA-133a concentrations with myocardial damage and clinical prognosis in ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J*, 164, 706-14.
- FABBRI, E., BORGATTI, M., MONTAGNER, G., BIANCHI, N., FINOTTI, A., LAMPRONTI, I., BEZZERRI, V., DECHECCHI, M. C., CABRINI, G. & GAMBARI, R. 2014. Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50, 1144-55.
- FANG, Y. & DAVIES, P. F. 2012. Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 979-87.
- FANG, Y., SHI, C., MANDUCHI, E., CIVELEK, M. & DAVIES, P. F. 2010. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13450-5.
- FICHTLSCHERER, S., DE ROSA, S., FOX, H., SCHWIETZ, T., FISCHER, A., LIEBETRAU, C., WEBER, M., HAMM, C. W., ROXE, T., MULLER-ARDOGAN, M., BONAUEA, A., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*, 107, 677-84.
- FIEDLER, J., JAZBUTYTE, V., KIRCHMAIER, B. C., GUPTA, S. K., LORENZEN, J., HARTMANN, D., GALUPPO, P., KNEITZ, S., PENA, J. T., SOHN-LEE, C., LOYER, X., SOUTSCHEK, J., BRAND, T., TUSCHL, T., HEINEKE, J., MARTIN, U., SCHULTE-MERKER, S., ERTL, G., ENGELHARDT, S., BAUERSACHS, J. & THUM, T. 2011. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*, 124, 720-30.
- FISH, J. E., SANTORO, M. M., MORTON, S. U., YU, S., YEH, R. F., WYTHE, J. D., IVEY, K. N., BRUNEAU, B. G., STAINIER, D. Y. & SRIVASTAVA, D. 2008. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*, 15, 272-84.
- FRANGOIANNIS, N. G. 2006. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1907-39.
- FRANGOIANNIS, N. G. 2008. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*, 58, 88-111.
- FRANGOIANNIS, N. G., LINDSEY, M. L., MICHAEL, L. H., YOUKER, K. A., BRESSLER, R. B., MENDOZA, L. H., SPENGLER, R.



## Bibliografia

- N., SMITH, C. W. & ENTMAN, M. L. 1998. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 98, 699-710.
- FRIEDMAN, R. C., FARH, K. K., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, 92-105.
- FRITZ, J. V., HEINTZ-BUSCHART, A., GHOSAL, A., WAMPACH, L., ETHERIDGE, A., GALAS, D. & WILMES, P. 2016. Sources and Functions of Extracellular Small RNAs in Human Circulation. *Annu Rev Nutr*, 36, 301-36.
- FUSTER, V. & KOVACIC, J. C. 2014. Acute coronary syndromes: pathology, diagnosis, genetics, prevention, and treatment. *Circ Res*, 114, 1847-51.
- GERHARDT, T. & LEY, K. 2015. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*, 107, 321-30.
- GIDLOF, O., ANDERSSON, P., VAN DER PALS, J., GOTBERG, M. & ERLINGE, D. 2011. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*, 118, 217-26.
- GIDLOF, O., VAN DER BRUG, M., OHMAN, J., GILJE, P., OLDE, B., WAHLESTEDT, C. & ERLINGE, D. 2013. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*, 121, 3908-17, s1-26.
- GIMBRONE, M. A., JR. & GARCIA-CARDENA, G. 2016. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, 118, 620-36.
- GLINGE, C., CLAUSS, S., BODDUM, K., JABBARI, R., JABBARI, J., RISGAARD, B., TOMSITS, P., HILDEBRAND, B., KAAB, S., WAKILI, R., JESPERSEN, T. & Tfelt-Hansen, J. 2017. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS One*, 12, e0167969.
- GORETTI, E., WAGNER, D. R. & DEVAUX, Y. 2014. miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? *Trends Mol Med*, 20, 716-25.
- GUILLEN, I., BLANES, M., GOMEZ-LECHON, M. J. & CASTELL, J. V. 1995. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol*, 269, R229-35.
- GWECHENBERGER, M., MENDOZA, L. H., YOUKER, K. A., FRANGOGIANNIS, N. G., SMITH, C. W., MICHAEL, L. H. & ENTMAN, M. L. 1999. Cardiac myocytes produce interleukin-6

- in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*, 99, 546-51.
- HADI, H. A., CARR, C. S. & AL SUWAIDI, J. 2005. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 1, 183-98.
- HAMIK, A. & JAIN, M. K. 2012. MicroRNA-mediated regulation of KLF2 and KLF4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 839-40.
- HAO, L., WANG, X. G., CHENG, J. D., YOU, S. Z., MA, S. H., ZHONG, X., QUAN, L. & LUO, B. 2014. The up-regulation of endothelin-1 and down-regulation of miRNA-125a-5p, -155, and -199a/b-3p in human atherosclerotic coronary artery. *Cardiovasc Pathol*, 23, 217-23.
- HARRIS, T. A., YAMAKUCHI, M., FERLITO, M., MENDELL, J. T. & LOWENSTEIN, C. J. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1516-21.
- HARRIS, T. A., YAMAKUCHI, M., KONDO, M., OETTGEN, P. & LOWENSTEIN, C. J. 2010. Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of microRNA-126 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 1990-7.
- HAUSSER, J. & ZAVOLAN, M. 2014. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet*, 15, 599-612.
- HE, B., XIAO, J., REN, A. J., ZHANG, Y. F., ZHANG, H., CHEN, M., XIE, B., GAO, X. G. & WANG, Y. W. 2011. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *J Biomed Sci*, 18, 22.
- HE, F., LV, P., ZHAO, X., WANG, X., MA, X., MENG, W., MENG, X. & DONG, S. 2014. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, 394, 137-44.
- HE, L., THOMSON, J. M., HEMANN, M. T., HERNANDO-MONGE, E., MU, D., GOODSON, S., POWERS, S., CORDON-CARDO, C., LOWE, S. W., HANNON, G. J. & HAMMOND, S. M. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435, 828-33.
- HERGENREIDER, E., HEYDT, S., TREGUER, K., BOETTGER, T., HORREVOETS, A. J., ZEIHNER, A. M., SCHEFFER, M. P., FRANGAKIS, A. S., YIN, X., MAYR, M., BRAUN, T., URBICH, C., BOON, R. A. & DIMMELER, S. 2012. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*, 14, 249-56.
- HERSKOWITZ, A., CHOI, S., ANSARI, A. A. & WESSELINGH, S. 1995. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol*, 146, 419-28.

## Bibliografia

- HINKEL, R., PENZKOFER, D., ZUHLKE, S., FISCHER, A., HUSADA, W., XU, Q. F., BALOCH, E., VAN ROOIJ, E., ZEIHNER, A. M., KUPATT, C. & DIMMELER, S. 2013. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation*, 128, 1066-75.
- HSU, A., CHEN, S. J., CHANG, Y. S., CHEN, H. C. & CHU, P. H. 2014. Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *Biomed Res Int*, 2014, 418628.
- HSU, P. Y., HSI, E., WANG, T. M., LIN, R. T., LIAO, Y. C. & JUO, S. H. 2017. MicroRNA let-7g possesses a therapeutic potential for peripheral artery disease. *J Cell Mol Med*, 21, 519-529.
- HU, D., YU, Y., WANG, C., LI, D., TAI, Y. & FANG, L. 2015. microRNA-98 mediated microvascular hyperpermeability during burn shock phase via inhibiting FIH-1. *Eur J Med Res*, 20, 51.
- HU, H. L., NIE, Z. Q., LU, Y., YANG, X., SONG, C., CHEN, H., ZHU, S., CHEN, B. B., HUANG, J., GENG, S. & ZHAO, S. 2017. Circulating miR-125b but not miR-125a correlates with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and the expressions of inflammatory cytokines. *Medicine (Baltimore)*, 96, e9059.
- HU, N., ZHANG, J., CUI, W., KONG, G., ZHANG, S., YUE, L., BAI, X., ZHANG, Z., ZHANG, W., ZHANG, X. & YE, L. 2011. miR-520b regulates migration of breast cancer cells by targeting hepatitis B X-interacting protein and interleukin-8. *J Biol Chem*, 286, 13714-22.
- HU, Z., DONG, J., WANG, L. E., MA, H., LIU, J., ZHAO, Y., TANG, J., CHEN, X., DAI, J., WEI, Q., ZHANG, C. & SHEN, H. 2012. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*, 33, 828-34.
- HUANG, Y. Q., LI, J., CHEN, J. Y., ZHOU, Y. L., CAI, A. P., HUANG, C. & FENG, Y. Q. 2017. The Association of Circulating MiR-29b and Interleukin-6 with Subclinical Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*, 44, 1537-1544.
- HUNTZINGER, E. & IZAUERLDE, E. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12, 99-110.
- ICLI, B., DORBALA, P. & FEINBERG, M. W. 2014. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 24, 241-8.
- ICLI, B., WARA, A. K., MOSLEHI, J., SUN, X., PLOVIE, E., CAHILL, M., MARCHINI, J. F., SCHISSLER, A., PADERA, R. F., SHI, J., CHENG, H. W., RAGHURAM, S., ARANY, Z., LIAO, R., CROCE, K., MACRAE, C. & FEINBERG, M. W. 2013.

- MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling. *Circ Res*, 113, 1231-41.
- ILIOPOULOS, D., HIRSCH, H. A. & STRUHL, K. 2009. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*, 139, 693-706.
- IZARRA, A., MOSCOSO, I., LEVENT, E., CANON, S., CERRADA, I., DIEZ-JUAN, A., BLANCA, V., NUNEZ-GIL, I. J., VALIENTE, I., RUIZ-SAURI, A., SEPULVEDA, P., TIBURCY, M., ZIMMERMANN, W. H. & BERNAD, A. 2014. miR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. *Stem Cell Reports*, 3, 1029-42.
- JI, X., TAKAHASHI, R., HIURA, Y., HIROKAWA, G., FUKUSHIMA, Y. & IWAI, N. 2009. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*, 55, 1944-9.
- JIN, Y., TYMEN, S. D., CHEN, D., FANG, Z. J., ZHAO, Y., DRAGAS, D., DAI, Y., MARUCHA, P. T. & ZHOU, X. 2013. MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing. *PLoS One*, 8, e64434.
- JONES BUIE, J. N., GOODWIN, A. J., COOK, J. A., HALUSHKA, P. V. & FAN, H. 2016. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors. *Atherosclerosis*, 254, 271-281.
- KAIKKONEN, M. U., LAM, M. T. & GLASS, C. K. 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*, 90, 430-40.
- KANE, N. M., HOWARD, L., DESCAMPS, B., MELONI, M., MCCLURE, J., LU, R., MCCAHILL, A., BREEN, C., MACKENZIE, R. M., DELLES, C., MOUNTFORD, J. C., MILLIGAN, G., EMANUELI, C. & BAKER, A. H. 2012. Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells*, 30, 643-54.
- KANNEL, W. B., DAWBER, T. R., KAGAN, A., REVOTSKIE, N. & STOKES, J., 3RD 1961. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*, 55, 33-50.
- KAUDEWITZ, D., LEE, R., WILLEIT, P., MCGREGOR, R., MARKUS, H. S., KIECHL, S., ZAMPETAKI, A., STOREY, R. F., CHANNON, K. M. & MAYR, M. 2013. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*, 110, 609-15.
- KEMP, M., DONOVAN, J., HIGHAM, H. & HOOPER, J. 2004. Biochemical markers of myocardial injury. *Br J Anaesth*, 93, 63-73.
- KIRSCHNER, M. B., EDELMAN, J. J., KAO, S. C., VALLELY, M. P., VAN ZANDWIJK, N. & REID, G. 2013. The Impact of

## Bibliografia

- Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet*, 4, 94.
- KIRSCHNER, M. B., KAO, S. C., EDELMAN, J. J., ARMSTRONG, N. J., VALLELY, M. P., VAN ZANDWIJK, N. & REID, G. 2011. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*, 6, e24145.
- KOBERLE, V., PLELI, T., SCHMITHALS, C., AUGUSTO ALONSO, E., HAUPENTHAL, J., BONIG, H., PEVELING-OBERHAG, J., BIONDI, R. M., ZEUZEM, S., KRONENBERGER, B., WAIDMANN, O. & PIIPER, A. 2013. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers. *PLoS One*, 8, e75184.
- KONDKAR, A. A. & ABU-AMERO, K. K. 2015. Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. *Biomed Res Int*, 2015, 821823.
- KONG, L., DU, X., HU, N., LI, W., WANG, W., WEI, S., ZHUANG, H., LI, X. & LI, C. 2016. Downregulation of let-7e-5p contributes to endothelial progenitor cell dysfunction in deep vein thrombosis via targeting FASLG. *Thromb Res*, 138, 30-36.
- KOVACIC, J. C., MORENO, P., HACHINSKI, V., NABEL, E. G. & FUSTER, V. 2011. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review. *Circulation*, 123, 1650-60.
- KOZOMARA, A. & GRIFFITHS-JONES, S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42, D68-73.
- KROH, E. M., PARKIN, R. K., MITCHELL, P. S. & TEWARI, M. 2010. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 298-301.
- KROL, J., LOEDIGE, I. & FILIPOWICZ, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
- KUEHBACHER, A., URBICH, C., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2007. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, 101, 59-68.
- KUHNERT, F. & KUO, C. J. 2010. miR-17-92 angiogenesis micromanagement. *Blood*, 115, 4631-3.
- KUMARSWAMY, R. & THUM, T. 2013. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res*, 113, 676-89.
- KUWABARA, Y., ONO, K., HORIE, T., NISHI, H., NAGAO, K., KINOSHITA, M., WATANABE, S., BABA, O., KOJIMA, Y., SHIZUTA, S., IMAI, M., TAMURA, T., KITA, T. & KIMURA, T. 2011. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*, 4, 446-54.

- LAFFONT, B., CORDUAN, A., PLE, H., DUCHEZ, A. C., CLOUTIER, N., BOILARD, E. & PROVOST, P. 2013. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2\*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*, 122, 253-61.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-8.
- LAM, N. Y., RAINER, T. H., CHIU, R. W. & LO, Y. M. 2004. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem*, 50, 256-7.
- LAU, N. C., LIM, L. P., WEINSTEIN, E. G. & BARTEL, D. P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 858-62.
- LEE, R. C. & AMBROS, V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862-4.
- LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-54.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo j*, 23, 4051-60.
- LEIDINGER, P., BACKES, C., RHEINHEIMER, S., KELLER, A. & MEESE, E. 2015. Towards Clinical Applications of Blood-Borne miRNA Signatures: The Influence of the Anticoagulant EDTA on miRNA Abundance. *PLoS One*, 10, e0143321.
- LEWIS, B. P., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
- LEWIS, B. P., SHIH, I. H., JONES-RHOADES, M. W., BARTEL, D. P. & BURGE, C. B. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115, 787-98.
- LEY, K., MILLER, Y. I. & HEDRICK, C. C. 2011. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 1506-16.
- LI, C., CHEN, X., HUANG, J., SUN, Q. & WANG, L. 2015a. Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Eur J Med Res*, 20, 58.
- LI, C., LI, X., GAO, X., ZHANG, R., ZHANG, Y., LIANG, H., XU, C., DU, W., ZHANG, Y., LIU, X., MA, N., XU, Z., WANG, L., CHEN, X., LU, Y., JU, J., YANG, B. & SHAN, H. 2014. MicroRNA-328 as a regulator of cardiac hypertrophy. *Int J Cardiol*, 173, 268-76.
- LI, D., SALDEEN, T., ROMEO, F. & MEHTA, J. L. 2000. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential

## Bibliografia

- role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*, 102, 1970-6.
- LI, D., YANG, P., XIONG, Q., SONG, X., YANG, X., LIU, L., YUAN, W. & RUI, Y. C. 2010. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J Hypertens*, 28, 1646-54.
- LI, J., CHEN, H., REN, J., SONG, J., ZHANG, F., ZHANG, J., LEE, C., LI, S., GENG, Q., CAO, C. & XU, N. 2015b. Effects of statin on circulating microRNAome and predicted function regulatory network in patients with unstable angina. *BMC Med Genomics*, 8, 12.
- LI, L., ZHANG, S., JIANG, X., LIU, Y., LIU, K. & YANG, C. 2018. MicroRNA-let-7e regulates the progression and development of allergic rhinitis by targeting suppressor of cytokine signaling 4 and activating Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Exp Ther Med*, 15, 3523-3529.
- LI, S., LEE, C., SONG, J., LU, C., LIU, J., CUI, Y., LIANG, H., CAO, C., ZHANG, F. & CHEN, H. 2017. Circulating microRNAs as potential biomarkers for coronary plaque rupture. *Oncotarget*, 8, 48145-48156.
- LI, X., WANG, J., JIA, Z., CUI, Q., ZHANG, C., WANG, W., CHEN, P., MA, K. & ZHOU, C. 2013. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1. *PLoS One*, 8, e74504.
- LIANG, X., ZHANG, L., WANG, S., HAN, Q. & ZHAO, R. C. 2016. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci*, 129, 2182-9.
- LIAO, Y. C., WANG, Y. S., GUO, Y. C., LIN, W. L., CHANG, M. H. & JUO, S. H. 2014. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J Am Coll Cardiol*, 63, 1685-94.
- LIBBY, P., TABAS, I., FREDMAN, G. & FISHER, E. A. 2014. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circ Res*, 114, 1867-79.
- LIN, Z., GE, J., WANG, Z., REN, J., WANG, X., XIONG, H., GAO, J., ZHANG, Y. & ZHANG, Q. 2017. Let-7e modulates the inflammatory response in vascular endothelial cells through ceRNA crosstalk. *Sci Rep*, 7, 42498.
- LINDMARK, E., DIDERHOLM, E., WALLENTIN, L. & SIEGBAHN, A. 2001. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *Jama*, 286, 2107-13.

- LIPPI, G., MATTIUZZI, C. & CERVELLIN, G. 2013. Circulating microRNAs (miRs) for diagnosing acute myocardial infarction: meta-analysis of available studies. *Int J Cardiol*, 167, 277-8.
- LIU, M., TAO, G., LIU, Q., LIU, K. & YANG, X. 2017. MicroRNA let-7g alleviates atherosclerosis via the targeting of LOX-1 in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*, 40, 57-64.
- LIU, X., FAN, Z., ZHAO, T., CAO, W., ZHANG, L., LI, H., XIE, Q., TIAN, Y. & WANG, B. 2015. Plasma miR-1, miR-208, miR-499 as potential predictive biomarkers for acute myocardial infarction: An independent study of Han population. *Exp Gerontol*, 72, 230-8.
- LOPEZ-RAMIREZ, M. A., REIJERKERK, A., DE VRIES, H. E. & ROMERO, I. A. 2016. Regulation of brain endothelial barrier function by microRNAs in health and neuroinflammation. *Faseb j*, 30, 2662-72.
- MA, X., BECKER BUSCAGLIA, L. E., BARKER, J. R. & LI, Y. 2011. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol*, 3, 159-66.
- MARTINEZ, M. C., TUAL-CHALOT, S., LEONETTI, D. & ANDRIANTSITOHAINA, R. 2011. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*, 32, 659-65.
- MCCALL, M. N., KENT, O. A., YU, J., FOX-TALBOT, K., ZAIMAN, A. L. & HALUSHKA, M. K. 2011. MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types. *BMC Med Genomics*, 4, 78.
- MCDONALD, J. S., MILOSEVIC, D., REDDI, H. V., GREBE, S. K. & ALGECIRAS-SCHIMNICH, A. 2011. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem*, 57, 833-40.
- MCLAREN, J. E., MICHAEL, D. R., ASHLIN, T. G. & RAMJI, D. P. 2011. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res*, 50, 331-47.
- MENDIS, S., PUSKA, P. & NORRVING, B. 2011. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control. *World Health Organization, Geneva*.
- MIAO, Y. S., ZHAO, Y. Y., ZHAO, L. N., WANG, P., LIU, Y. H., MA, J. & XUE, Y. X. 2015. MiR-18a increased the permeability of BTB via RUNX1 mediated down-regulation of ZO-1, occludin and claudin-5. *Cell Signal*, 27, 156-67.
- MICHELL, D. L. & VICKERS, K. C. 2016. Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochim Biophys Acta*, 1861, 2069-2074.
- MITCHELL, P. S., PARKIN, R. K., KROH, E. M., FRITZ, B. R., WYMAN, S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., PETERSON, A., NOTEBOOM, J., O'BRIANT, K. C., ALLEN, A., LIN, D. W., URBAN, N., DRESCHER, C. W., KNUDSEN, B. S.,



## Bibliografia

- STIREWALT, D. L., GENTLEMAN, R., VESSELLA, R. L., NELSON, P. S., MARTIN, D. B. & TEWARI, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10513-8.
- MOLDOVAN, L., BATTE, K. E., TRGOVCICH, J., WISLER, J., MARSH, C. B. & PIPER, M. 2014. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med*, 18, 371-90.
- MONTGOMERY, R. L., HULLINGER, T. G., SEMUS, H. M., DICKINSON, B. A., SETO, A. G., LYNCH, J. M., STACK, C., LATIMER, P. A., OLSON, E. N. & VAN ROOIJ, E. 2011. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*, 124, 1537-47.
- MORADI, N., FADAEI, R., AHMADI, R., KAZEMIAN, E. & FALLAH, S. 2018. Lower Expression of miR-10a in Coronary Artery Disease and its Association with Pro/Anti-Inflammatory Cytokines. *Clin Lab*, 64, 847-854.
- MORROW, D. A., CANNON, C. P., JESSE, R. L., NEWBY, L. K., RAVKILDE, J., STORROW, A. B., WU, A. H. & CHRISTENSON, R. H. 2007. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*, 115, e356-75.
- MUELLER, C. 2014. Biomarkers and acute coronary syndromes: an update. *Eur Heart J*, 35, 552-6.
- MURAMATSU, F., KIDOYA, H., NAITO, H., SAKIMOTO, S. & TAKAKURA, N. 2013. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene*, 32, 414-21.
- NAVICKAS, R., GAL, D., LAUCEVIČIUS, A., TAPARAUSKAITĖ, A., ZDANYTĖ, M. & HOLVOET, P. 2016. Identifying circulating microRNAs as biomarkers of cardiovascular disease: a systematic review. *Cardiovasc Res*, 111, 322-37.
- NIAN, M., LEE, P., KHAPER, N. & LIU, P. 2004. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*, 94, 1543-53.
- NUNEZ LOPEZ, Y. O., GARUFI, G. & SEYHAN, A. A. 2016. Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes. *Mol Biosyst*, 13, 106-121.
- O'DONNELL, K. A., WENTZEL, E. A., ZELLER, K. I., DANG, C. V. & MENDELL, J. T. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435, 839-43.
- OERLEMANS, M. I., MOSTERD, A., DEKKER, M. S., DE VREY, E. A., VAN MIL, A., PASTERKAMP, G., DOEVENDANS, P. A., HOES, A. W. & SLUIJTER, J. P. 2012. Early assessment of

- acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol Med*, 4, 1176-85.
- OLIVIERI, F., ANTONICELLI, R., LORENZI, M., D'ALESSANDRA, Y., LAZZARINI, R., SANTINI, G., SPAZZAFUMO, L., LISA, R., LA SALA, L., GALEAZZI, R., RECCHIONI, R., TESTA, R., POMPILIO, G., CAPOGROSSI, M. C. & PROCOPPIO, A. D. 2013. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 167, 531-6.
- ONG, S. G., LEE, W. H., HUANG, M., DEY, D., KODO, K., SANCHEZ-FREIRE, V., GOLD, J. D. & WU, J. C. 2014. Cross talk of combined gene and cell therapy in ischemic heart disease: role of exosomal microRNA transfer. *Circulation*, 130, S60-9.
- PAGE, K., GUTTERY, D. S., ZAHRA, N., PRIMROSE, L., ELSHAW, S. R., PRINGLE, J. H., BLIGHE, K., MARCHESE, S. D., HILLS, A., WOODLEY, L., STEBBING, J., COOMBES, R. C. & SHAW, J. A. 2013. Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One*, 8, e77963.
- PAIVA, S. & AGBULUT, O. 2017. MiRroring the Multiple Potentials of MicroRNAs in Acute Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med*, 4, 73.
- PAN, Q., MA, C., WANG, Y., WANG, J., ZHENG, J., DU, D., LIAO, X., CHEN, Y., CHEN, Y., BIHL, J., CHEN, C., YANG, Y. & MA, X. 2018. Microvesicles-mediated communication between endothelial cells modulates endothelial survival, and angiogenic function via transferring of miR-125a-5p. *J Cell Biochem*.
- PARAHULEVA, M. S., EULER, G., MARDINI, A., PARVIZ, B., SCHIEFFER, B., SCHULZ, R. & ASLAM, M. 2017. Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: a pilot study. *Sci Rep*, 7, 15974.
- PASQUINELLI, A. E., REINHART, B. J., SLACK, F., MARTINDALE, M. Q., KURODA, M. I., MALLER, B., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., DEGNAN, B., MULLER, P., SPRING, J., SRINIVASAN, A., FISHMAN, M., FINNERTY, J., CORBO, J., LEVINE, M., LEAHY, P., DAVIDSON, E. & RUVKUN, G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-9.
- PENG, L., CHUN-GUANG, Q., BEI-FANG, L., XUE-ZHI, D., ZI-HAO, W., YUN-FU, L., YAN-PING, D., YANG-GUI, L., WEI-GUO, L., TIAN-YONG, H. & ZHEN-WEN, H. 2014. Clinical impact of circulating miR-133, miR-1291 and miR-663b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Diagn Pathol*, 9, 89.

## Bibliografia

- POLISENO, L., TUCCOLI, A., MARIANI, L., EVANGELISTA, M., CITTI, L., WOODS, K., MERCATANTI, A., HAMMOND, S. & RAINALDI, G. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 108, 3068-71.
- PRABHU, S. D. & FRANGOIANNIS, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119, 91-112.
- PRITCHARD, C. C., CHENG, H. H. & TEWARI, M. 2012. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*, 13, 358-69.
- QIN, B., XIAO, B., LIANG, D., XIA, J., LI, Y. & YANG, H. 2011. MicroRNAs expression in ox-LDL treated HUVECs: MiR-365 modulates apoptosis and Bcl-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 410, 127-33.
- QIN, X., WANG, X., WANG, Y., TANG, Z., CUI, Q., XI, J., LI, Y. S., CHIEN, S. & WANG, N. 2010. MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3240-4.
- RAJPUT, C., TAUSEEF, M., FARAZUDDIN, M., YAZBECK, P., AMIN, M. R., AVIN BR, V., SHARMA, T. & MEHTA, D. 2016. MicroRNA-150 Suppression of Angiopoetin-2 Generation and Signaling Is Crucial for Resolving Vascular Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36, 380-8.
- REN, X. P., WU, J., WANG, X., SARTOR, M. A., JONES, K., QIAN, J., NICOLAOU, P., PRITCHARD, T. J. & FAN, G. C. 2009. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*, 119, 2357-2366.
- RIDKER, P. M., RIFAI, N., STAMPFER, M. J. & HENNEKENS, C. H. 2000. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101, 1767-72.
- ROY, S., KHANNA, S., HUSSAIN, S. R., BISWAS, S., AZAD, A., RINK, C., GNYAWALI, S., SHILO, S., NUOVO, G. J. & SEN, C. K. 2009. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res*, 82, 21-9.
- RUFF, C. T. & BRAUNWALD, E. 2011. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*, 8, 140-7.
- SANTORO, M. M. & NICOLI, S. 2013. miRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs. *Exp Cell Res*, 319, 1324-30.
- SANTULLI, G. 2016. MicroRNAs and Endothelial (Dys) Function. *J Cell Physiol*, 231, 1638-44.

- SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L. & JOHNE, R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113, 1014-26.
- SCHULTE, C., MOLZ, S., APPELBAUM, S., KARAKAS, M., OJEDA, F., LAU, D. M., HARTMANN, T., LACKNER, K. J., WESTERMANN, D., SCHNABEL, R. B., BLANKENBERG, S. & ZELLER, T. 2015. miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS One*, 10, e0145930.
- SENBANERJEE, S., LIN, Z., ATKINS, G. B., GREIF, D. M., RAO, R. M., KUMAR, A., FEINBERG, M. W., CHEN, Z., SIMON, D. I., LUSCINSKAS, F. W., MICHEL, T. M., GIMBRONE, M. A., JR., GARCIA-CARDENA, G. & JAIN, M. K. 2004. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med*, 199, 1305-15.
- SESSA, R., SEANO, G., DI BLASIO, L., GAGLIARDI, P. A., ISELLA, C., MEDICO, E., COTELLI, F., BUSSOLINO, F. & PRIMO, L. 2012. The miR-126 regulates angiopoietin-1 signaling and vessel maturation by targeting p85beta. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 1925-35.
- SHALABY, S. M., EL-SHAL, A. S., SHOUKRY, A., KHEDR, M. H. & ABDELRAHEIM, N. 2016. Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome. *IUBMB Life*, 68, 673-82.
- SHEEDY, F. J. & O'NEILL, L. A. 2008. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*, 67 Suppl 3, iii50-5.
- SHUKLA, G. C., SINGH, J. & BARIK, S. 2011. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol*, 3, 83-92.
- SMALL, E. M., SUTHERLAND, L. B., RAJAGOPALAN, K. N., WANG, S. & OLSON, E. N. 2010. MicroRNA-218 regulates vascular patterning by modulation of Slit-Robo signaling. *Circ Res*, 107, 1336-44.
- SONG, C. L., LIU, B., DIAO, H. Y., SHI, Y. F., ZHANG, J. C., LI, Y. X., LIU, N., YU, Y. P., WANG, G., WANG, J. P. & LI, Q. 2016. Down-regulation of microRNA-320 suppresses cardiomyocyte apoptosis and protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by targeting IGF-1. *Oncotarget*, 7, 39740-39757.
- SONKOLY, E., STAHL, M. & PIVARCSI, A. 2008. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol*, 18, 131-40.
- STEG, P. G., GOLDBERG, R. J., GORE, J. M., FOX, K. A., EAGLE, K. A., FLATHER, M. D., SADIQ, I., KASPER, R., RUSHTON-

## Bibliografía

- MELLOR, S. K. & ANDERSON, F. A. 2002. Baseline characteristics, management practices, and in-hospital outcomes of patients hospitalized with acute coronary syndromes in the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am J Cardiol*, 90, 358-63.
- SU, Q., LI, L., ZHAO, J., SUN, Y. & YANG, H. 2017. MiRNA Expression Profile of the Myocardial Tissue of Pigs with Coronary Microembolization. *Cell Physiol Biochem*, 43, 1012-1024.
- SUAREZ, Y., FERNANDEZ-HERNANDO, C., POBER, J. S. & SESSA, W. C. 2007. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*, 100, 1164-73.
- SUAREZ, Y., FERNANDEZ-HERNANDO, C., YU, J., GERBER, S. A., HARRISON, K. D., POBER, J. S., IRUELA-ARISPE, M. L., MERKENSCHLAGER, M. & SESSA, W. C. 2008. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 14082-7.
- SUAREZ, Y., WANG, C., MANES, T. D. & POBER, J. S. 2010. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol*, 184, 21-5.
- SUN, H. X., ZENG, D. Y., LI, R. T., PANG, R. P., YANG, H., HU, Y. L., ZHANG, Q., JIANG, Y., HUANG, L. Y., TANG, Y. B., YAN, G. J. & ZHOU, J. G. 2012a. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*, 60, 1407-14.
- SUN, X., BELKIN, N. & FEINBERG, M. W. 2013a. Endothelial microRNAs and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 15, 372.
- SUN, X., ICLI, B., WARA, A. K., BELKIN, N., HE, S., KOBZIK, L., HUNNINGHAKE, G. M., VERA, M. P., BLACKWELL, T. S., BARON, R. M. & FEINBERG, M. W. 2012b. MicroRNA-181b regulates NF-kappaB-mediated vascular inflammation. *J Clin Invest*, 122, 1973-90.
- SUN, Y. M., LIN, K. Y. & CHEN, Y. Q. 2013b. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol*, 6, 6.
- SVENSSON, D., GIDLOF, O., TURCZYNSKA, K. M., ERLINGE, D., ALBINSSON, S. & NILSSON, B. O. 2014. Inhibition of microRNA-125a promotes human endothelial cell proliferation and viability through an antiapoptotic mechanism. *J Vasc Res*, 51, 239-45.
- SWIRSKI, F. K. & NAHRENDORF, M. 2013. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*, 339, 161-6.

- TABAS, I., WILLIAMS, K. J. & BOREN, J. 2007. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, 116, 1832-44.
- TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHANG, K. J. & BALTIMORE, D. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12481-6.
- TANG, E. W., WONG, C. K. & HERBISON, P. 2007. Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) hospital discharge risk score accurately predicts long-term mortality post acute coronary syndrome. *Am Heart J*, 153, 29-35.
- TANINDI, A. & CEMRI, M. 2011. Troponin elevation in conditions other than acute coronary syndromes. *Vasc Health Risk Manag*, 7, 597-603.
- THOMAS, M. R. & LIP, G. Y. 2017. Novel Risk Markers and Risk Assessments for Cardiovascular Disease. *Circ Res*, 120, 133-149.
- THUM, T., CATALUCCI, D. & BAUERSACHS, J. 2008. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*, 79, 562-70.
- THUM, T. & CONDORELLI, G. 2015. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circ Res*, 116, 751-62.
- TREIBER, T., TREIBER, N. & MEISTER, G. 2012. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost*, 107, 605-10.
- TSUI, N. B., NG, E. K. & LO, Y. M. 2002. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*, 48, 1647-53.
- TURCATEL, G., RUBIN, N., EL-HASHASH, A. & WARBURTON, D. 2012. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-beta induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PLoS One*, 7, e31032.
- TURCHINOVICH, A., SAMATOV, T. R., TONEVITSKY, A. G. & BURWINKEL, B. 2013. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*, 4, 119.
- UCHIDA, S. & DIMMELER, S. 2015. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res*, 116, 737-50.
- URBICH, C., KUEHBACHER, A. & DIMMELER, S. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 79, 581-8.
- VALADI, H., EKSTROM, K., BOSSIOS, A., SJOSTRAND, M., LEE, J. J. & LOTVALL, J. O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.

## Bibliografia

- VAN DER HEIDEN, K., GIJSEN, F. J., NARRACOTT, A., HSIAO, S., HALLIDAY, I., GUNN, J., WENTZEL, J. J. & EVANS, P. C. 2013. The effects of stenting on shear stress: relevance to endothelial injury and repair. *Cardiovasc Res*, 99, 269-75.
- VAN ROOIJ, E. & OLSON, E. N. 2007. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*, 117, 2369-76.
- VARGA, Z. V., ZVARA, A., FARAGO, N., KOCSIS, G. F., PIPICZ, M., GASPARI, R., BENCSIK, P., GORBE, A., CSONKA, C., PUSKAS, L. G., THUM, T., CSONT, T. & FERDINANDY, P. 2014. MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: protectomiRs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307, H216-27.
- VICKERS, K. C., PALMISANO, B. T., SHOUCRI, B. M., SHAMBUREK, R. D. & REMALEY, A. T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13, 423-33.
- VIERECK, J., BANG, C., FOINQUINOS, A. & THUM, T. 2014. Regulatory RNAs and paracrine networks in the heart. *Cardiovasc Res*, 102, 290-301.
- VIERECK, J. & THUM, T. 2017. Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res*, 120, 381-399.
- WANG, A., KWEE, L. C., GRASS, E., NEELY, M. L., GREGORY, S. G., FOX, K. A. A., ARMSTRONG, P. W., WHITE, H. D., OHMAN, E. M., ROE, M. T., SHAH, S. H. & CHAN, M. Y. 2017a. Whole blood sequencing reveals circulating microRNA associations with high-risk traits in non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 261, 19-25.
- WANG, F., LONG, G., ZHAO, C., LI, H., CHAUGAI, S., WANG, Y., CHEN, C. & WANG, D. W. 2013a. Plasma microRNA-133a is a new marker for both acute myocardial infarction and underlying coronary artery stenosis. *J Transl Med*, 11, 222.
- WANG, F., LONG, G., ZHAO, C., LI, H., CHAUGAI, S., WANG, Y., CHEN, C. & WANG, D. W. 2014a. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PLoS One*, 9, e105734.
- WANG, G. K., ZHU, J. Q., ZHANG, J. T., LI, Q., LI, Y., HE, J., QIN, Y. W. & JING, Q. 2010a. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*, 31, 659-66.
- WANG, J., JIA, Z., ZHANG, C., SUN, M., WANG, W., CHEN, P., MA, K., ZHANG, Y., LI, X. & ZHOU, C. 2014b. miR-499 protects cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via its effects on Pcd4 and Pcs2. *RNA Biol*, 11, 339-50.

- WANG, K., LIU, F., ZHOU, L. Y., DING, S. L., LONG, B., LIU, C. Y., SUN, T., FAN, Y. Y., SUN, L. & LI, P. F. 2013b. miR-874 regulates myocardial necrosis by targeting caspase-8. *Cell Death Dis*, 4, e709.
- WANG, K., YUAN, Y., CHO, J. H., MCCLARTY, S., BAXTER, D. & GALAS, D. J. 2012. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*, 7, e41561.
- WANG, K., ZHANG, S., WEBER, J., BAXTER, D. & GALAS, D. J. 2010b. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 38, 7248-59.
- WANG, P., ZHANG, X., LI, F., YUAN, K., LI, M., ZHANG, J., LI, B. & LIANG, W. 2017b. MiR-130b attenuates vascular inflammation via negatively regulating tumor progression locus 2 (Tpl2) expression. *Int Immunopharmacol*, 51, 9-16.
- WANG, R., LI, N., ZHANG, Y., RAN, Y. & PU, J. 2011. Circulating microRNAs are promising novel biomarkers of acute myocardial infarction. *Intern Med*, 50, 1789-95.
- WANG, S., AURORA, A. B., JOHNSON, B. A., QI, X., MCANALLY, J., HILL, J. A., RICHARDSON, J. A., BASSEL-DUBBY, R. & OLSON, E. N. 2008. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, 15, 261-71.
- WANG, X., HA, T., ZOU, J., REN, D., LIU, L., ZHANG, X., KALBFLEISCH, J., GAO, X., WILLIAMS, D. & LI, C. 2014c. MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6. *Cardiovasc Res*, 102, 385-95.
- WANG, X., HUANG, W., LIU, G., CAI, W., MILLARD, R. W., WANG, Y., CHANG, J., PENG, T. & FAN, G. C. 2014d. Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 139-50.
- WARD, J. A., ESA, N., PIDIKITI, R., FREEDMAN, J. E., KEANEY, J. F., TANRIVERDI, K., VITSEVA, O., AMBROS, V., LEE, R. & MCMANUS, D. D. 2013. Circulating Cell and Plasma microRNA Profiles Differ between Non-ST-Segment and ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Fam Med Med Sci Res*, 2, 108.
- WEBER, J. A., BAXTER, D. H., ZHANG, S., HUANG, D. Y., HUANG, K. H., LEE, M. J., GALAS, D. J. & WANG, K. 2010a. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56, 1733-41.
- WEBER, M., BAKER, M. B., MOORE, J. P. & SEARLES, C. D. 2010b. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 393, 643-8.



## Bibliografia

- WEBER, M., BAKER, M. B., PATEL, R. S., QUYYUMI, A. A., BAO, G. & SEARLES, C. D. 2011. MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB. *Cardiol Res Pract*, 2011, 532915.
- WHO 2018. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization.
- WIDERA, C., GUPTA, S. K., LORENZEN, J. M., BANG, C., BAUERSACHS, J., BETHMANN, K., KEMPF, T., WOLLERT, K. C. & THUM, T. 2011. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 872-5.
- WIGHTMAN, B., HA, I. & RUVKUN, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-62.
- WILLEIT, P., ZAMPETAKI, A., DUDEK, K., KAUDEWITZ, D., KING, A., KIRKBY, N. S., CROSBY-NWAObI, R., PROKOPI, M., DROZDOV, I., LANGLEY, S. R., SIVAPRASAD, S., MARKUS, H. S., MITCHELL, J. A., WARNER, T. D., KIECHL, S. & MAYR, M. 2013. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res*, 112, 595-600.
- WILLIAMS, Z., BEN-DOV, I. Z., ELIAS, R., MIHAILOVIC, A., BROWN, M., ROSENWAKS, Z. & TUSCHL, T. 2013. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4255-60.
- WU, C. Y., ZHOU, Z. F., WANG, B., KE, Z. P., GE, Z. C. & ZHANG, X. J. 2018a. MicroRNA-328 ameliorates oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial cells injury through targeting HMGB1 in atherosclerosis. *J Cell Biochem*.
- WU, H. & ZHANG, J. 2018. miR-126 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Negatively Correlates with Risk and Severity and is Associated with Inflammatory Cytokines as well as Intercellular Adhesion Molecule-1 in Patients with Coronary Artery Disease. *Cardiology*, 139, 110-118.
- WU, W., XIAO, H., LAGUNA-FERNANDEZ, A., VILLARREAL, G., JR., WANG, K. C., GEARY, G. G., ZHANG, Y., WANG, W. C., HUANG, H. D., ZHOU, J., LI, Y. S., CHIEN, S., GARCIA-CARDENA, G. & SHYY, J. Y. 2011. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation*, 124, 633-41.
- WU, X. Y., FAN, W. D., FANG, R. & WU, G. F. 2014. Regulation of microRNA-155 in endothelial inflammation by targeting nuclear factor (NF)-kappaB P65. *J Cell Biochem*, 115, 1928-36.

- WU, Y., HE, H., DING, Y., LIU, S., ZHANG, D., WANG, J., JIANG, H., ZHANG, D., SUN, L., YE, R. D. & QIAN, F. 2018b. MK2 mediates macrophage activation and acute lung injury by regulating let-7e miRNA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 315, L371-I381.
- YAN, H., MA, F., ZHANG, Y., WANG, C., QIU, D., ZHOU, K., HUA, Y. & LI, Y. 2017. miRNAs as biomarkers for diagnosis of heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96, e6825.
- YANG, K., GAO, B., WEI, W., LI, Z., PAN, L., ZHANG, J., ZHAO, Q., CHEN, W. & XU, Z. 2015. Changed profile of microRNAs in acute lung injury induced by cardio-pulmonary bypass and its mechanism involved with SIRT1. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 1104-15.
- YANG, L., WANG, Y., SHI, S., XIE, L., LIU, T., WANG, Y. & MU, H. 2018. The TNF-alpha-induced expression of miR-130b protects cervical cancer cells from the cytotoxicity of TNF-alpha. *FEBS Open Bio*, 8, 614-627.
- YANG, W. J., YANG, D. D., NA, S., SANDUSKY, G. E., ZHANG, Q. & ZHAO, G. 2005. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*, 280, 9330-5.
- YELIGAR, S., TSUKAMOTO, H. & KALRA, V. K. 2009. Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199. *J Immunol*, 183, 5232-43.
- YOUNG, J. A., TING, K. K., LI, J., MOLLER, T., DUNN, L., LU, Y., MOSES, J., PRADO-LOURENCO, L., KHACHIGIAN, L. M., NG, M., GREGORY, P. A., GOODALL, G. J., TSYKIN, A., LICHTENSTEIN, I., HAHN, C. N., TRAN, N., SHACKEL, N., KENCH, J. G., MCCAUGHAN, G., VADAS, M. A. & GAMBLE, J. R. 2013. Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27. *Blood*, 122, 2911-9.
- YU, B., GONG, M., WANG, Y., MILLARD, R. W., PASHA, Z., YANG, Y., ASHRAF, M. & XU, M. 2013. Cardiomyocyte protection by GATA-4 gene engineered mesenchymal stem cells is partially mediated by translocation of miR-221 in microvesicles. *PLoS One*, 8, e73304.
- YUSUF, S., HAWKEN, S., OUNPUU, S., DANS, T., AVEZUM, A., LANAS, F., MCQUEEN, M., BUDAJ, A., PAIS, P., VARIGOS, J. & LISHENG, L. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364, 937-52.

## Bibliografia

- ZAMPETAKI, A., WILLEIT, P., TILLING, L., DROZDOV, I., PROKOPI, M., RENARD, J. M., MAYR, A., WEGER, S., SCHETT, G., SHAH, A., BOULANGER, C. M., WILLEIT, J., CHOWIENCZYK, P. J., KIECHL, S. & MAYR, M. 2012. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 60, 290-9.
- ZERNECKE, A., BIDZHEKOV, K., NOELS, H., SHAGDARSUREN, E., GAN, L., DENECKE, B., HRISTOV, M., KOPPEL, T., JAHANTIGH, M. N., LUTGENS, E., WANG, S., OLSON, E. N., SCHOBER, A. & WEBER, C. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2, ra81.
- ZHANG, L., CHEN, X., SU, T., LI, H., HUANG, Q., WU, D., YANG, C. & HAN, Z. 2015a. Circulating miR-499 are novel and sensitive biomarker of acute myocardial infarction. *J Thorac Dis*, 7, 303-8.
- ZHANG, R., LAN, C., PEI, H., DUAN, G., HUANG, L. & LI, L. 2015b. Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*, 15, 51.
- ZHANG, X., TANG, J., ZHI, X., XIE, K., WANG, W., LI, Z., ZHU, Y., YANG, L., XU, H. & XU, Z. 2015c. miR-874 functions as a tumor suppressor by inhibiting angiogenesis through STAT3/VEGF-A pathway in gastric cancer. *Oncotarget*, 6, 1605-17.
- ZHANG, Y., CHEN, N., ZHANG, J. & TONG, Y. 2013. Hsa-let-7g miRNA targets caspase-3 and inhibits the apoptosis induced by ox-LDL in endothelial cells. *Int J Mol Sci*, 14, 22708-20.
- ZHANG, Y., CHENG, J., CHEN, F., WU, C., ZHANG, J., REN, X., PAN, Y., NIE, B., LI, Q. & LI, Y. 2017. Circulating endothelial microparticles and miR-92a in acute myocardial infarction. *Biosci Rep*, 37.
- ZHANG, Y., LIU, Y. J., LIU, T., ZHANG, H. & YANG, S. J. 2016. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20, 323-9.
- ZHANG, Y., QIN, W., ZHANG, L., WU, X., DU, N., HU, Y., LI, X., SHEN, N., XIAO, D., ZHANG, H., LI, Z., ZHANG, Y., YANG, H., GAO, F., DU, Z., XU, C. & YANG, B. 2015d. MicroRNA-26a prevents endothelial cell apoptosis by directly targeting TRPC6 in the setting of atherosclerosis. *Sci Rep*, 5, 9401.
- ZHANG, Y., ZHANG, Q., GUI, L., CAI, Y., DENG, X., LI, C., GUO, Q., HE, X. & HUANG, J. 2018. Let-7e inhibits TNF-alpha expression by targeting the methyl transferase EZH2 in DENV2-infected THP-1 cells. *J Cell Physiol*, 233, 8605-8616.
- ZHAO, D., LI, C., YAN, H., LI, T., QIAN, M., ZHENG, N., JIANG, H., LIU, L., XU, B., WU, Q., LI, X., LIANG, H. & SHAN, H. 2018.

- Cardiomyocyte Derived miR-328 Promotes Cardiac Fibrosis by Paracrinely Regulating Adjacent Fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, 46, 1555-1565.
- ZHOU, Q., GALLAGHER, R., UFRET-VINCENTY, R., LI, X., OLSON, E. N. & WANG, S. 2011. Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23~27~24 clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 8287-92.
- ZHU, H., HAN, C., LU, D. & WU, T. 2014. miR-17-92 cluster promotes cholangiocarcinoma growth: evidence for PTEN as downstream target and IL-6/Stat3 as upstream activator. *Am J Pathol*, 184, 2828-39.
- ZHU, N., ZHANG, D., CHEN, S., LIU, X., LIN, L., HUANG, X., GUO, Z., LIU, J., WANG, Y., YUAN, W. & QIN, Y. 2011a. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*, 215, 286-93.
- ZHU, N., ZHANG, D., XIE, H., ZHOU, Z., CHEN, H., HU, T., BAI, Y., SHEN, Y., YUAN, W., JING, Q. & QIN, Y. 2011b. Endothelial-specific intron-derived miR-126 is down-regulated in human breast cancer and targets both VEGFA and PIK3R2. *Mol Cell Biochem*, 351, 157-64.
- ZHUANG, Y., PENG, H., MASTEJ, V. & CHEN, W. 2016. MicroRNA Regulation of Endothelial Junction Proteins and Clinical Consequence. *Mediators Inflamm*, 2016, 5078627.
- ZILE, M. R., MEHURG, S. M., ARROYO, J. E., STROUD, R. E., DESANTIS, S. M. & SPINALE, F. G. 2011. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*, 4, 614-9.
- ZONG, R., ZHOU, T., LIN, Z., BAO, X., XIU, Y., CHEN, Y., CHEN, L., MA, J. X., LIU, Z. & ZHOU, Y. 2016. Down-Regulation of MicroRNA-184 Is Associated With Corneal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57, 1398-407.